



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ZARAGOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL**

**EL PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF-2 EN LA PROTECCIÓN CELULAR EN
RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS ORGÁNICOS
VOLÁTILES Y OZONO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

VERÓNICA MONTESINOS CRUZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO**

NOVIEMBRE DE 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A Mama...

C i r í

*Sé que al pasar de los años el tiempo como a todos nos envejece...
Que pone en nuestra espalda recuerdos demasiado pesados
como para no encorvarse ante ellos...
Y sé también, que después de muchos años viviendo a tu lado, estarás demasiada cansada
para hablar de mis cuentos sin fin...*

*Y aún así te seguiré viendo como el árbol más enraizado sosteniéndose firme ante un risco,
aferrándose a soportar las brisas más fuertes provenientes del gran mar...
Todo por nosotros.*

*Pero siempre tendrás que saber,
que ahí estaré yo para velar por ti,
cuidando de tu ser, cobijada bajo la sombra,
de tus recuerdos y de todo lo que sigas emanando,
hasta la palabra final, que será un nuevo inicio para ambas;
en la espera de comenzar de nuevo juntas.*

AGRADECIMIENTOS

A mi mamita:

No necesito decirlo, pero todo lo que he logrado es gracias a ti, Cirina Pedro Cruz, mi mamita!!!

Tu paciencia, comprensión, apoyo, amor, chistes y risas!!! Sin ellas no hubiera logrado mucho...

A mis hermanos *Fran* y *Max*:

Con su mal genio y ayuda innegable... que fuera de mi sin ellos!!!

A mi hermana *Ney*:

Mi 24/7, que siempre me ayudo en todo lo humanamente posible... gracias hermanita.

A los Doc's Emilio Rojas y Mahara A. Valverde:

Que confiaron en mí, y me enseñaron que formar parte de un equipo de trabajo, no solo implica eso, si no también amistad y compromiso.

A mis amigos del Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, que me enseñaron a trabajar, escuchar, buscar y opinar abiertamente:

QFB. Paulina Ramos Espinoza

Biólogo. Pablo Hernández Franco

QFB. Nahum Zepeta

QFB. Martin Enrique Silva

QFB. Brenda Edith Loaiza

Biol. Vicente Sanchez Valle

QFB. Grisel Gutierrez

A mis amigos de la Facultad, *Raúl, Carla y Bety* que sin ellos, la estancia hubiera sido insoportable!!!

A los profes que me hacían reír inconteniblemente!!!, que me regañaban cuando cometía errorcillos; los que me enseñaron a ser todo un biólogo de campo!!!

A todos los que han confiado en mi... sin antes cuestionarme nada!!!

A aquellos que aceptaron mi amistad sin preguntas!!!!

A las malas personas que hicieron de mi estancia frustrante e inolvidable... me hicieron entender que la vida sin ellos, no es vida!!! Si fuera perfecto... que aburrido!!!!

Y todos amigos que a lo largo de la carrera fueron apareciendo y mostrándome lo bueno de ser yo 😊 !!!

***A mi hermosa UNAM!!! Que es lo mejor que me ha pasado en la vida!!!!
Si pudiera volver a ingresar como la niña que fui... volvería a hacerlo...***

En resumen a toda esa gente que ha aparecido a lo largo de mi vida y que me ha enseñado una parte diferente del mundo.

Hantale

Gracias

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Fisiografía de la Zona Metropolitana del valle de México	2
1.2 Ozono y compuestos orgánicos volátiles	5
1.3 Efectos en el cuerpo inducidos por contaminantes	8
1.3.1 Sistema nervioso	10
1.3.2 Sistema reproductor masculino	10
1.4 Enzimas detoxificantes y antioxidantes	11
1.4.1 Glutamato cisteina ligasa	12
1.4.2 Hemo-oxigenasa-1	13
1.5 Elemento de respuesta antioxidante	14
1.6 El Factor de transcripción Nrf2	14
1.6.1 Keap1	15
1.6.2 Nrf2-Keap1	16
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVO GENERAL	22
4.1 Objetivos particulares	22
V. MÉTODOS	23
5.1 Extracción proteica de tejidos	25
5.2 Western blot	25
5.3 Lipoperoxidación	26
5.4 Análisis estadístico	27
VI. RESULTADOS	28
6.1 Cargado de geles	28
6.2 Expresión de Nrf2.	28
6.3 Expresión protéica	29
6.4 Lipoperoxidación	32
6.5 Correlación lineal	33
VII. DISCUSIÓN	34
7.1 Cerebro	34
7.2 Testículo	35
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Los seres vivos se encuentran normalmente expuestos a un sinnúmero de agresiones originadas por toda clase de xenobióticos, como los contaminantes ambientales, entre ellos, los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) y ozono. En la actualidad, se reporta que la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) supera diariamente la norma establecida para este último contaminante, provocando que los pobladores de esta zona se encuentren expuestos de forma aguda y crónica.

Se sabe que estos tipos de compuestos inducen la formación de moléculas oxidantes y electrófilas que tienen la capacidad de interaccionar y dañar a las biomoléculas del organismo, lo que puede desencadenar el desarrollo de diversas enfermedades. De lo anterior se desprende el hecho de que las células cuentan con sistemas de defensa para contender contra el estrés generado, como lo es Nrf2 (del inglés Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor), un factor de transcripción ubicuo, que se activa en defensa a diversos xenobióticos, uniéndose a un sitio ARE (Antioxidant Response Element) en la región promotora de varios genes para poder llevar a cabo la codificación de enzimas de fase II; las cuales facilitan la detoxificación celular.

Con base en lo anterior es que el presente proyecto estudia el papel del factor de transcripción Nrf2 en la protección celular en respuesta a la exposición vía inhalatoria a COV y ozono en órganos como el cerebro y el testículo de ratones CD-1.

Los resultados obtenidos muestran que la exposición aguda a COV, ozono y la mezcla de ambos activan la vía de Nrf2 en cerebros y testículos, mostrando repuestas diferenciales entre órganos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Fisiografía de la zona metropolitana del valle de México

Durante el desarrollo de la Ciudad de México, las actividades vitales para el progreso de nuestra nación se compensaron cada vez con mayor rapidez. A causa de ello el continuo acercamiento de comunidades rurales con necesidades primordiales, como la obtención de trabajos bien remunerados para el sostén familiar; se hizo presente de manera drástica; en la actualidad a esta aglomeración se le conoce como la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM); la cual está conformada por las 16 delegaciones del Distrito Federal y la totalidad o partes de 59 municipios del Estado de México (figura 1 y tabla 1).

El valle de México ocupa un área de 3,540 km² del cual 1,500 Km² están urbanizados; se ubica en la región subtropical de la Tierra, donde la radiación solar es constante e intensa todo el año. Esta zona, está rodeada por montañas en tres de sus lados, lo que conforma una barrera natural que dificulta la libre circulación del viento y la dispersión de contaminantes. Tiene una altitud de 2,240 msnm lo que hace que el contenido de oxígeno en el aire sea 23% menor que a nivel del mar, situación que provoca que las personas tengan que respirar mayor cantidad de aire para obtener la misma cantidad de oxígeno y en consecuencia están expuestos a una mayor absorción de contaminantes (Molina y Molina, 2002).

Por ser un valle su clima se caracteriza por madrugadas frías y medios días calurosos. En invierno durante la noche la temperatura en las laderas de las montañas aumenta a medida que pasa la noche, lo cual guarda una relación inversa al comportamiento habitual. Este fenómeno es conocido como inversión térmica ya que determina la inmovilidad de la capa de aire frío próxima al suelo, la cual concentra los contaminantes generados por la actividad industrial y el tránsito vehicular del día anterior y los generados en las primeras horas de la madrugada. Esta capa se empieza a movilizar hasta que el sol la calienta, se eleva y se

dispersan los contaminantes, desapareciendo así la inversión térmica (Munguía, 2003).

En verano, la reacción fotoquímica que da origen al ozono se condiciona por la intensidad de la radiación solar. Esta se origina cuando los óxidos de nitrógeno (NOx) y los compuestos orgánicos volátiles (COV) reaccionan con la luz solar, produciendo un átomo libre de oxígeno que a su vez puede adicionarse a una molécula de oxígeno y formar una molécula de ozono. De esta manera, el ozono es el contaminante más abundante, especialmente en la zona suroeste (Munguía, 2003).

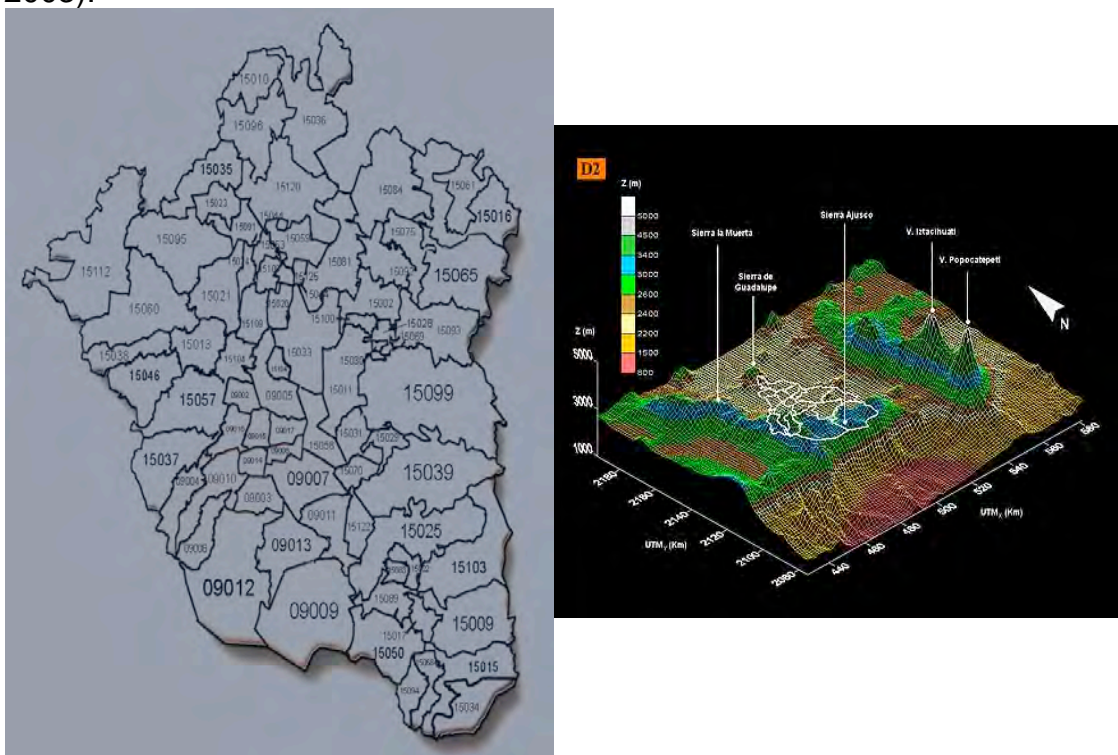


Figura 1. La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), comprende todo el Distrito Federal (con 16 delegaciones) y la totalidad o partes de 59 municipios del Estado de México. Tomado del INEGI, 2002.

Tabla 1. Delegaciones y municipios que integran a la ZMVM. Tomado del Inventario de Emisiones de la ZMVM, 2006.

Cve	Delegación	Cve	Municipio	Cve	Municipio	Cve	Municipio
09010	Álvaro Obregón	15002	Acolman	15035	Huehuetoca	15083	Temamallá
09002	Azcapotzalco	15009	Amecameca	15036	Hueypoxtla	15084	Temascalapa
09014	Benito Juárez	15010	Apaxco	15037	Huixquilucan	15089	Tenango del Aire
09003	Coyoacán	15011	Atenco	15038	Isidro Fabela	15091	Teoloyucán
09004	Cuajimalpa	15013	Atizapán de Zaragoza	15039	Ixtapaluca	15092	Teotihuacán
09015	Cuauhtémoc	15015	Atlautla	15044	Jaltenco	15093	Tepetlaoxtoc
09005	Gustavo A. Madero	15016	Axapusco	15046	Jilotzingo	15094	Tepetlixpa
09006	Iztacalco	15017	Ayapango	15050	Juchitepec	15095	Tepoztlán
09007	Iztapalapa	15020	Coacalco de Berrozábal	15070	La Paz	15098	Tequixquiac
09008	M. Contreras	15022	Cocotlán	15053	Melchor Ocampo	15099	Texcoco
09016	Miguel Hidalgo	15023	Coyotepec	15057	Naucalpan de Juárez	15100	Tezoyuca
09009	Milpa Alta	15024	Cuautitlán	15059	Nextlalpan	15103	Tlaimanalco
09011	Tláhuac	15121	Cuautitlán Izcalli	15058	Nezahualcóyotl	15104	Tlalnepantla de Baz
09012	Tlalpan	15025	Chalco	15060	Nicolás Romero	15125	Tonanitla
09017	Verustiano Carranza	15028	Chiautla	15061	Nopaltepec	15108	Tultepec
09013	Xochimilco	15029	Chicoloapan	15065	Otumba	15109	Tultitlán
		15030	Chiconcuac	15068	Ozumba	15122	Valle de Chalco Solidaridad
		15031	Chimalhuacán	15069	Papalotla	15112	Villa del carbón
		15033	Ecatepec de Morelos	15075	San Martín de las Pirámides	15120	Zumpango
		15034	Ecatzingo	15081	Tecámac		

La ZMVM está considerada como una de las áreas más contaminadas del mundo. Según datos del segundo conteo de población y vivienda 2005, la ZMVM registró para este año, alrededor de 20 millones de habitantes cifra que representa el 19% del total nacional. De ellos, el 44% vive en las 16 delegaciones del Distrito Federal y el 56% en los 59 municipios del Estado de México (Sistema de Monitoreo Atmosferico, 2006).

Las actividades cotidianas de su población, las 53 000 industrias ahí asentadas y los 3.5 millones de vehículos que la circulan diariamente provocan altos niveles de contaminación del aire generando una liberación aproximada anual de 175 000 toneladas de contaminantes tóxicos (Sistema de Monitoreo Atmosferico, 2006). Esto provoca que los habitantes de esta metrópoli se expongan diariamente a los efectos de diversos contaminantes como lo son las partículas suspendidas totales (PST), partículas menores a 10 micrómetros (PM₁₀ y PM_{2.5}), óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO), bióxido de azufre (SO₂), plomo (Pb), COV y ozono (Inventario de Emisiones de la ZMVM, 2006). Dentro del grupo de los COV

se encuentran compuestos que están clasificados como potencialmente mutagénicos. En un estudio realizado por Tovalin y colaboradores en 2006, encontraron que las concentraciones de COV y ozono, en especial de benceno, metil tert-butil éter, y tolueno, a las que están expuestos los habitantes de la ZMVM son muy altas, en comparación con sitios menos contaminados.

1.2 Ozono y compuestos orgánicos volátiles

El ozono se produce de manera natural en la atmósfera; su existencia fue supuesta desde 1871 por Van Marum; el nombre “ozono” proviene del término “*ozein*” que significa “oler”; su formación es a partir de emisiones procedentes de la vegetación, procesos de fermentación, volcanes, entre otros factores y se encuentra tanto en la troposfera (de 0 a 17 km a partir de la superficie de la tierra) como en la estratosfera en donde se extiende de 17 a 50 km por arriba de la superficie terrestre (Mustafa,1990), donde cumple su conocido papel protector contra los letales rayos ultravioleta. Sin embargo, cuando el ozono troposférico alcanza mayores cantidades, se convierte en un contaminante tóxico (Mustafa, 1990).

Su impacto en la salud se debe a su capacidad de oxidación, por ejemplo, daña a las células de las vías respiratorias causando inflamación, además reduce los mecanismos de defensa provocando la disminución de la capacidad del aparato respiratorio para combatir las infecciones (Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la ZMVM 2002-2010). A diferencia de otros contaminantes que son emitidos directamente por sus fuentes, el ozono surge a partir de otros productos, por lo que se le define como contaminante secundario. Los precursores de este oxidante fotoquímico (contaminantes primarios) son los COV (figura 2). Los COV son todos aquellos hidrocarburos que se presentan en estado gaseoso a la temperatura ambiente normal o que son muy volátiles a dicha temperatura (Mustafa, 1990). Suelen presentar una cadena con un número de carbonos inferior a doce y contienen otros elementos como oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno. Su número supera el millar, pero los más abundantes en el aire son

metano, tolueno, n-butano, i-pentano, n-pentano, etano, benceno, propano y etileno; tienen un origen tanto natural como antropogénico (NOM-075-SEMARNAT-1995). Además contribuyen a la formación del smog fotoquímico y efecto invernadero. Según el SMA 2006 de las 566,061 toneladas de COV que se generan en la ZMVM, las fuentes móviles son las principales emisoras, le siguen en importancia el uso de solventes y la industria de sustancias químicas.

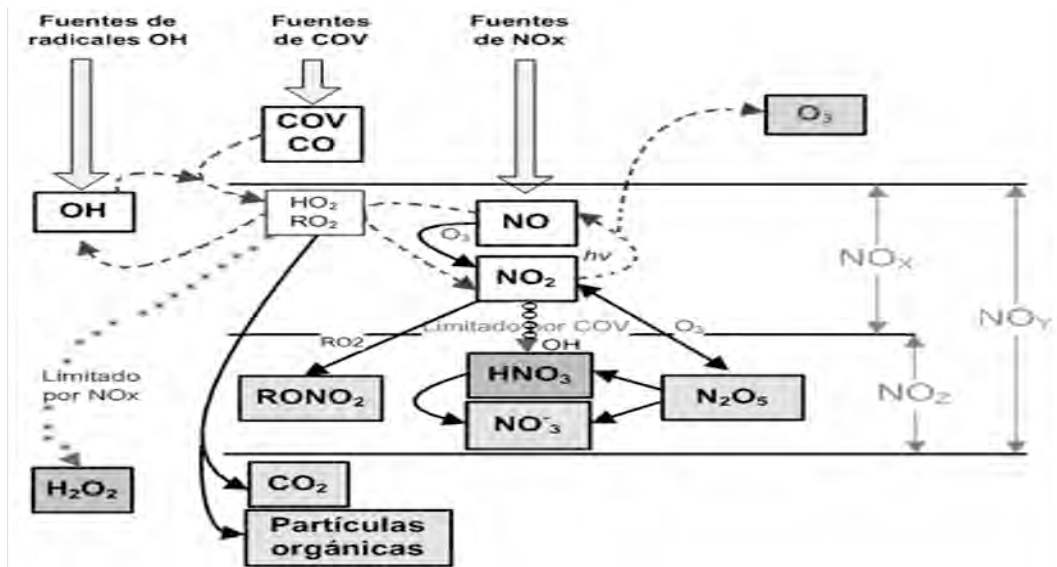


Figura 2. Rutas fotoquímicas involucradas en la producción de ozono (línea punteada) y pasos de terminación que dominan bajo limitación por NO_x (línea con asteriscos) o limitación por COV (línea con círculos). En términos generales la formación de ozono puede estar limitada por los COV o los NO_x. La existencia de estos dos regímenes puede entenderse mecánicamente en términos de las fuentes relativas de oxidrilo (OH) y NO_x. Cuando la fuente de OH es mayor que la fuente de NO_x la terminación está dominada por la formación de peróxido de hidrogeno (H₂O₂), línea con asteriscos. Bajo estas condiciones la formación de(H₂O₂) es mucho mayor que la formación de ácido nítrico (HNO₃), la concentración de NO_x es baja y como resultado la velocidad de producción está limitada por NO_x. Esto significa que la concentración de ozono se reduce de manera efectiva disminuyendo la emisión/concentración de NO_x en lugar de los COV. Cuando la fuente de OH es menor que la fuente de NO_x, la terminación procede predominantemente vía la formación de HNO₃, la formación de este compuesto es mayor que la de H₂O₂, el NO_x es relativamente abundante y la producción de ozono está limitada por COV. Entre estos extremos existe una región en donde la producción de ozono es igualmente sensible a los COV y los NO_x. Tomado y modificado de "An assessment of Tropospheric Ozone Pollution".

Si bien es conocida la función de los COV como precursores del ozono y otros oxidantes, aún no se cuenta con un programa continuo y de amplia cobertura para su monitoreo; tampoco existe alguna norma de calidad del aire para compuestos

tóxicos como el benceno, formaldehído, acetaldehído y 1,3 butadieno (Instituto Nacional de Ecología, 2005).

Por ello, en México existen instrumentos regulatorios para la calidad del aire en donde se incluyen la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA), el Reglamento en Materia de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica y las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y para el control de los niveles de emisiones de contaminantes a la atmósfera provenientes de fuentes determinadas (Instituto Nacional de Ecología, 2005). Gracias a estas, se crearon una serie de normas que estandarizan los niveles máximos permitidos para cada uno de los contaminantes antes mencionados, estos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores límite para los contaminantes atmosféricos normados en México

Contaminantes Atmosféricos	Valores límite			Normas Oficiales Mexicanas
	Exposición aguda		Exposición crónica	
	Concentración y tiempo promedio	Frecuencia máxima aceptable	Para protección de la población susceptible	
Ozono (O ₃)	0.11 ppm (1 hora) 216 µg/m ³	1 vez cada 3 años	-	Modificación a NOM-020-SSA-1993
	0.08 ppm (8 horas)	Quinto máximo en un año		
Bióxido de azufre (SO ₂)	0.13 ppm (24 horas) 341 µg/m ³	1 vez al año	0.03 ppm *	NOM-022-SSA1-1993
Bióxido de nitrógeno (NO ₂)	0.21 ppm (1 hora) 395 µg/m ³	1 vez al año	-	NOM-023-SSA1-1993
Monóxido de carbono (CO)	11 ppm (8 horas) 125 95 µg/m ³	1 vez al año	-	NOM-021-SSA1-1993
Partículas suspendidas totales (PST)	260 µg/m ³ (24 horas)	1 vez al año	75 µg/m ³ *	NOM-024-SSA1-1993
Partículas fracción respirable (PM ₁₀)	150 µg/m ³ (24 horas)	1 vez al año	50 µg/m ³ *	NOM-025-SSA1-1993
Plomo (Pb)	-	-	1.5 µg/m ³ **	NOM-026-SSA1-1993

*Medida Aritmética Anual, **Promedio Aritmético Trimestral, - No establecido. Tomado: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales – Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT- INE 2006.

1.3 Efectos en el cuerpo inducidos por contaminantes

Una vez que un agente xenobiótico del tipo de los contaminantes ambientales ingresa al organismo, ya sea a través del tracto gastrointestinal o por vía aérea, se distribuye sistémicamente a través del sistema circulatorio, alcanzando órganos con actividad metabólica donde se pueden generar metabolitos secundarios con mayor o menor potencial tóxico. En la figura 3, se muestran las vías generales de absorción, distribución, metabolismo y excreción de algunas sustancias al contacto con el cuerpo.

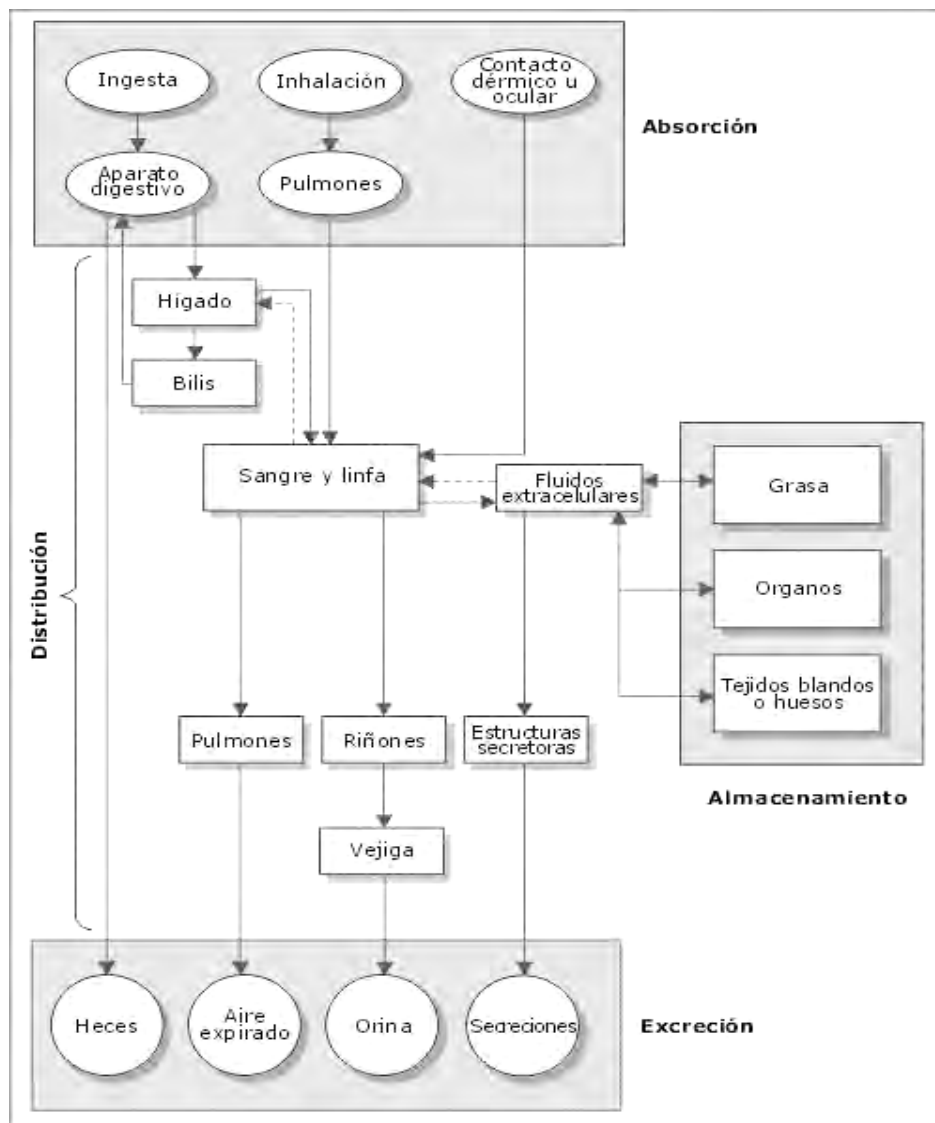


Figura 3. Vías de absorción, distribución, metabolismo y excreción de diferentes sustancias en el cuerpo. Tomado de www.cepis.org.

En la actualidad la exposición a compuestos ambientales causan diversos daños en la salud humana; por ejemplo problemas respiratorios (Lebowitz, 1996; Borja-Aburto *et al*, 1997; Curtis *et al*, 2006), cardiovasculares (Borja-Aburto *et al*, 1997; Bhatnagar, 2006), cáncer (Armstrong *et al*, 2004), trastornos neurológicos (Calderón-Garcidueñas *et al*, 2002; Campbell, 2004), reproductivos (Duty *et al*, 2003; Tortolero *et al*, 2005; Hu *et al*, 2006; Lewtas, 2007) y efectos sobre el desarrollo (Maisonet *et al*, 2004; Wang y Pinkerton, 2007). Dichos efectos, dependen de sus propiedades físicas y químicas, de la dosis que se inhala y del tiempo de exposición. El nivel de riesgo individual está determinado por diversos factores que incluyen: la predisposición genética, edad, estado nutricional, presencia y severidad de condiciones cardíacas y respiratorias, la actividad y el lugar de trabajo y el uso de medicamentos (Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la ZMVM 2002-2010). En la figura 4 se muestra un esquema general de los mecanismos de toxicidad inducidos por xenobióticos en el cuerpo.

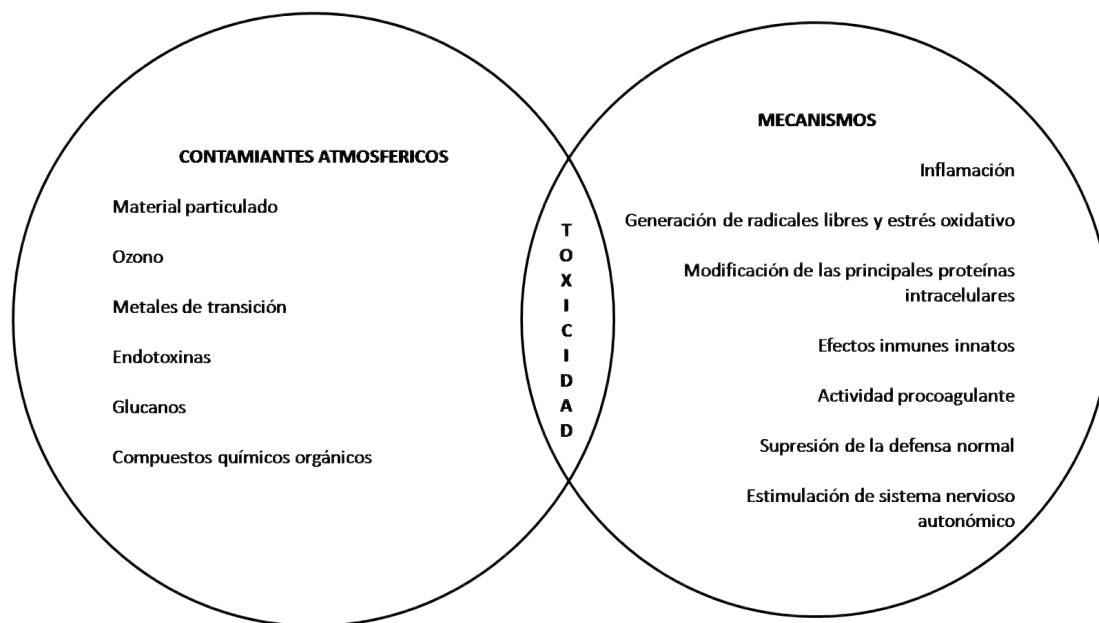


Figura 4. Mecanismo de toxicidad de los contaminantes ambientales. Tomado de Rubio *et al*, 2009.

1.3.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso cumple diversas funciones, como la percepción y transmisión de información sobre los medios externos e internos que provocan diversas reacciones, así como el monitoreo y control de diversos mecanismos; además de la descarga de sustancias químicas. Este sistema tiene dos divisiones principales, el sistema nervioso periférico, y el sistema nervioso central; este último conformado principalmente por la médula espinal y el cerebro, el cual tiene una eficiente barrera de protección.

Por otra parte, los contaminantes atmosféricos son gases que interaccionan fácilmente con biomoléculas, es decir, al entrar en contacto con el tejido respiratorio, inmediatamente reaccionan, activando mecanismos de defensa que no permiten que se transporten ni se absorban. Sin embargo, aunque el aparato respiratorio funcione como un eficiente filtro del aire inhalado, es un hecho que los contaminantes ingresan en los fluidos internos hasta llegar a invadir todo el cuerpo. Por ello, es curioso como el cerebro, un órgano tan protegido de las influencias externas, pueda ser alterado por el aire que se respira. Para llegar a éste, el contaminante debe traspasar la barrera pulmonar, transportarse por la sangre y luego cruzar la barrera hematoencefálica, una de las más selectivas del organismo (Pascual *et al*, 2004).

La generación de radicales libres y estrés oxidativo, resultado del metabolismo de estos contaminantes en el cerebro, han sido asociados a diferentes padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Schipper, 1999).

1.3.2 Sistema reproductor masculino

Los contaminantes tóxicos del aire pueden interferir en diversos procesos del sistema reproductor femenino y masculino. Sin embargo, en las últimas décadas parece que la calidad del semen de los varones que viven en países

industrializados ha disminuido, lo que causa cierta inquietud respecto al futuro de la fertilidad humana (Skakkebaek y Keiding, 1994). Se ha reportado que desde el año de 1995 del 30 al 50% de los casos de infertilidad se debe al factor masculino, afectando a uno de cada 20 varones (Howards, 1995; Sherins, 1995). *García y García (1996)* mencionan diversos factores implicados en la alteración del semen, entre los que se encuentra la contaminación ambiental.

Entre los posibles daños celulares, el espermatozoide ha mostrado ser una célula muy sensible, ya que posee una membrana plasmática con un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados necesaria para mantener la fluidez en la fusión de la membrana celular durante la fertilización; la cual es vulnerable a procesos de peroxidación ocasionados por contaminantes ambientales, en consecuencia los daños a esta membrana pueden causar anomalías espermáticas desencadenantes de infertilidades (Tortolero, 2005).

1.4 Enzimas detoxificantes y antioxidantes

Las células cuentan con diversos mecanismos de defensa, tales como enzimas desintoxicantes de fase I y II, las cuales contrarrestan las agresiones ambientales (Rubio *et al*, 2009).

Por un lado, en la fase I participan enzimas que metabolizan carcinógenos y xenobióticos (principalmente enzimas de la familia de los citocromos P450), y llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción que introducen o exponen grupos funcionales en dichas moléculas. En la fase II participan las enzimas que reducen la electrofilicidad de los metabolitos carcinógenos y xenobióticos modificados mediante su conjugación enzimática con ligandos endógenos (Königsberg, 2007). Algunas de las proteínas que participan en esta fase son:

Enzimas del metabolismo:

- Glutatión-S-Transferasa (GST)
- NADPH: quinona-oxidoreductasa-1 (NQO1)
- UDP-Glucuronosil-Transferasa (UGT)

- Sulfurotransferasas
- Aflatoxina B1 aldehído reductasa
- Peroxiredoxina1
- Hidrolasa epoxida microsomal

Enzimas antioxidantes:

- Catalasa (CAT)
- Superóxido Dismutasa (SOD)
- Hemo Oxigenada-1 (HO-1)
- Glutamato Cisteína Ligasa antes conocida como γ -gama-cistein-ligasa, (GCL)
- Glutathión Peroxidasa (GPx)
- Tioredoxina
- Proteínas de choque térmico
- Subunidad 26 del proteosoma

Tomado de Itoh *et al*, 2004; Kobayashi y Yamamoto, 2005; Wook *et al*, 2005; Königsberg, 2007.

1.4.1 Glutamato cisteína ligasa

El glutathión es un tripéptido que se encuentra presente en elevadas concentraciones dentro del eritrocito. Su función fundamental es proteger a la célula contra la acción de agentes oxidantes endógenos y exógenos, así como mantener la estabilidad de la membrana. También participa en el mantenimiento de la estructura de la hemoglobina, en la síntesis de proteínas de los reticulocitos, así como preservando la integridad de algunas enzimas y proteínas de la membrana. Se sintetiza en dos pasos dependientes de ATP; en primer lugar, se sintetiza gamma-glutamilcisteína a partir de L-glutamato y cisteína, mediante la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL). Esta reacción es el paso limitante en la síntesis del glutathión y su función radica en su unión con el glutathión sintetasa para formar la primera línea de defensa de la célula en contra del daño oxidativo, causado entre otros, por las especies reactivas de oxígeno. La GCL es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad catalizadora (GCLC) y otra

moduladora (GCLM). La GCLC lleva a cabo toda la actividad enzimática, mientras que la GCLM aumenta la eficiencia catalítica de la GCLC; en segundo lugar, la glicina une a la gamma-glutamilcisteína mediante la enzima glutatión sintetasa (Estrada *et al*, 1999; Johnson *et al*, 2008).

1.4.2 Hemo-oxigenasa 1

La enzima hemo-oxigenasa (HO) debuta en la comunidad científica en 1964 cuando Wise y colaboradores demuestran la degradación *in vitro* del grupo hemo a biliverdina (BV). Estos descubrimientos fueron confirmados por Tenhuen y colaboradores en 1968 y 1969, quienes identificaron a la HO como la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo y se dieron a la tarea de caracterizarla, para demostrar su localización celular. La HO es la principal enzima implicada en el catabolismo oxidativo del grupo hemo, rindiendo como consecuencia tres productos, los cuales son BV [la cual es convertida a bilirrubina (BR)], monóxido de carbono (CO) y hierro (Fe^{2+}). Esta enzima permaneció relativamente en la oscuridad hasta finales de los años 80, cuando una isoforma inducible fue descubierta. Esta isoforma fue denominada hemo oxigenasa-1 (HO-1), la cual es conocida también como HSP-32 (del inglés heat shock protein-32). A esta proteína se le atribuyen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas, no sólo por su actividad propiamente, sino por los productos que ella es capaz de generar. Su expresión se incrementa considerablemente en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citocinas, especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno, metales pesados, factores de crecimiento, entre otros. Por lo que, diferentes autores la consideran la enzima más inducida por diversos estímulos que cualquier otra descrita hasta el momento. La HO-1 juega un papel importante en el sistema de defensa antioxidante del organismo y la homeostasis del Fe. Provocando que la BR y la BV prevengan la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados con igual efectividad que el α -tocoferol, además de impedir su consumo; ambos productos son secuestradores de ERO como el hidroxilo, oxígeno singlete y ácido hipocloroso; aunque la BR

también secuestra el superóxido, el peróxido y el peroxinitrito. Así mismo, la BR exógena previene la peroxidación lipídica en el plasma después de la depleción de antioxidantes endógenos, el daño foto-oxidativo a proteínas y es capaz de inhibir la quimioluminiscencia en macrófagos activados. Por lo tanto, la inducción de la HO-1 bajo condiciones de estrés oxidante, puede ocurrir para degradar el exceso liberado de hemo intracelular y que no es necesario para la síntesis de proteínas y en consecuencia prevenir la acumulación del hemo en las membranas biológicas (Fang *et al*, 2004; Sánchez *et al*, 2005).

1.5 Elemento de respuesta antioxidante

Uno de los mecanismos por la cual las enzimas detoxificantes y antioxidantes son activadas es mediante un elemento cis localizado en su región promotora del ADN, llamado elemento de respuesta antioxidante (por sus siglas en inglés Antioxidant Response Element).

ARE puede ser activado por diversos inductores como antioxidantes fenólicos, hidroperóxidos, aceptores de la reacción de Michael, quinonas, isotiocianatos, flavonoides, 1,2-ditiol-3-tiona, metales pesados, derivados trivalentes de arsénicos, carotenoides, óxido nítrico, prostaglandinas, factores de crecimiento, lipoproteínas de baja densidad y otros conjugados polienos (Rushmore *et al*, 1991; Prester *et al*, 1993; Dinkova-Kostova *et al*, 2006; Nguyen *et al*, 2003; Kobayashi *et al*, 2005).

1.6 El factor de transcripción nrf2

Nrf2 (por sus siglas en inglés: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor) ha mostrado ser un factor de transcripción crítico que se une al sitio ARE en la región promotora de varios genes, para poder llevar a cabo la activación de la transcripción de enzimas antioxidantes de fase II en varios tipos de células y tejidos. Pertenece a una familia que poseen una región homóloga a la proteína

“cap-n-collar” (CNC) de *Drosophila*, en donde también se incluyen p45/NF-E2, Bach 1, Bach 2, Nrf1, Nrf2 y Nrf3 (Kobayashi *et al*, 2004).

Además de pertenecer a una familia de proteínas básicas, tienen un característico “zipper” o también llamado cierre de leucinas (bZip) en su región C-terminal. La región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN; mientras que la región acídica al parecer se requiere para la activación transcripcional (Königsberg, 2007).

Kobayashi y colaboradores en 2004, reportan 6 dominios conservados asociados a su regulación negativa, los cuales han sido denominados como Neh (Nrf2, ECH [chicken Nrf2] homologous domain), ubicados en la región N-terminal; algunos autores mencionan que al eliminar el dominio Neh2 la actividad del factor se incrementa proponiendo a dicho dominio como el sitio de interacción para unirse al represor en la célula, keap1.

1.6.1 Keap1

Es una proteína formada por 624 aminoácidos; que consta de 5 dominios los cuales se consideran canónicos. El primero de ellos es el dominio BTB/POZ (Bric-a-brac, Tamtrack, Broad-complex/POxovirus Zinc finger), que es un motivo conservado evolutivamente, este participa en las interacciones proteína-proteína y se encuentra presente en proteínas que se unen a actina y en factores de transcripción con estructura de dedos de zinc. El otro dominio conservado se conoce como Kelch (a veces nombrado dominio de repeticiones de doble glicina DGR) y su nombre proviene de su semejanza con la proteína reguladora Kelch de *Drosophila* de donde se identificó por primera vez; este motivo aparece repetido seis veces tanto en Kelch como en Keap1 formando así la estructura de β -hélice y es a través de este dominio que se une con el dominio Neh2 de Nrf2. Los otros tres dominios de Keap1 son la región N-terminal (NTR), la región C-terminal (CTR) y la región de intervención (IVR) como se muestra en la figura 5 (Königsberg, 2007).

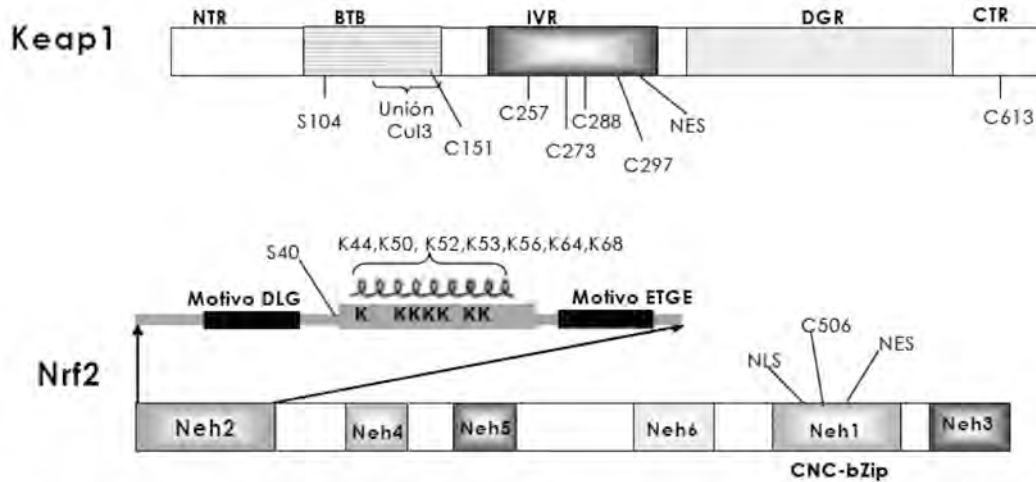


Figura 5. Dominios de interacción entre Keap1 y Nrf2. En Nrf2, el dominio Neh2 que se ha propuesto como sitio de unión a Keap1 mediante los motivos ETGE y DLG. Cabe aclarar que el motivo DLG se encuentra en la región hidrofóbica, (D, L y G son los aminoácidos ácido aspártico, leucina y glicina respectivamente), mientras que el motivo ETGE está formado a su vez por ácido glutámico, treonina, glicina y ácido glutámico, respectivamente. En el dominio Neh también se encuentran siete residuos de lisina (K44, K50, K52, K53, K56, K64, K68) que son importantes para su ubiquitinación y degradación. En Keap1, el dominio DGR provee el sitio de unión a Nrf2 y a actina, mientras que IVR contiene a los residuos de cisteína (C) capaces de oxidarse y registrar el estado oxidativo de la célula (C151, C257, C273, C288, C297). Cul3 es la ligasa E3 que sirve de adaptador para unirse al proteosoma. Tomado de Königsberg, 2007.

1.6.2 Nrf2-keap1

Nrf2 se encuentra de manera ubicua en todas las células, ubicado en el citoplasma, unido al citoesqueleto y a filamentos de actina; suprimido hasta en un 80% por la proteína Keap1, la cual se encuentra como homodimero uniéndose a Nrf2 mediante un sitio de reconocimiento en Neh, de alta afinidad ETGE (enlace tipo bisagra) y baja afinidad DLG (enlace tipo pestillo). El reconocimiento por los dos sitios tiene importancia fisiológica, pues se ha demostrado que la delección del motivo DLG obstaculiza la ubiquitinación dependiente de Keap1 y la degradación por el proteosoma (Königsberg, 2007), la localización de estos sitios se muestra en la figura 6.

La exposición, a electrófilos y ERO, causan el rompimiento del complejo Nrf2-Keap1 provocando la translocación de Nrf2 al núcleo; en donde algunos autores sugieren un tiempo promedio de vida de 10 a 30 min (Cople *et al*, 2007). El uso

de inhibidores del proteosoma indica que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma (Kobayashi *et al*, 2005).

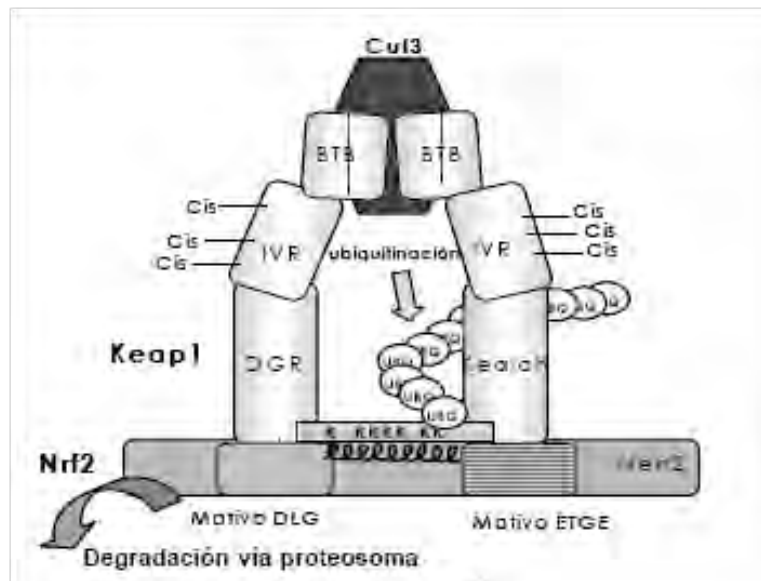


Figura 6. Modelo de activación de Nrf2. La homodimerización de Keap1 facilita la interacción de Cul3 con los dominios BTB e IVR lo cual induce la ubiquitinación de los residuos de lisina de Nrf2 y promueve su degradación vía proteosoma. Tomado y modificado de Kobayashi, 2005.

Hasta ahora se han mencionado algunos mecanismos por los cuales el complejo Keap1-Nrf2 es disociado, entre ellos está el reportado por el estrés oxidante, el cual consiste en la degradación de proteínas a través de otra proteína selectiva llamada ubiquitina (UBQ). Las proteínas ubiquitinadas o poliubiquitinadas son reconocidas por el proteosoma 26 (conocido como un complejo de proteasas) que desdobra y digiere a las proteínas. Este proceso de poliubiquitinación y reconocimiento requiere de varias enzimas, entre ellas la E1 (que activa a la UBQ), E2 (para la conjugación de la UBQ) y la E3 (para su unión). Las ligasas E3 denominadas “Cullin-based” (Cul) juegan un papel importante como andamios o adaptadores; de tal manera que Keap1 es un adaptador de Nrf2 con una Cul3, de forma que la activación de Nrf2 y su translocación al núcleo dependen de la disociación de Keap1.

Por otro lado, los inductores de la vía mediada por ARE poseen la particularidad química de interactuar con los grupos sulfhidrilos, ya sea por oxidación o alquilación. Esto sugiere que los grupos sulfhidrilos reactivos dentro de estas

proteínas podrían actuar como sensores para la activación de la vía ARE. De modo que Keap1, por poseer un alto contenido de cisteínas sería un candidato excelente como indicador de estos inductores. Hasta ahora, no se han determinado cuales son las cisteínas que se modifican como respuesta a los inductores de estrés y electrófilos, aunque se ha sugerido a las cisteínas 183, 273 y 288 (Königsberg, 2007).

Una vez que Nrf2 se encuentra en el núcleo, forma heterodímeros con otras proteínas, por ejemplo miembros de la familia Small Maf (del inglés Musculo aponeurotic Fibrosarcoma Oncogen), la familia Jun, entre otros; facilitando su interacción con las regiones del sitio ARE, activando subsecuentemente la transcripción de enzimas detoxificantes y antioxidantes de la fase II (figura 7).

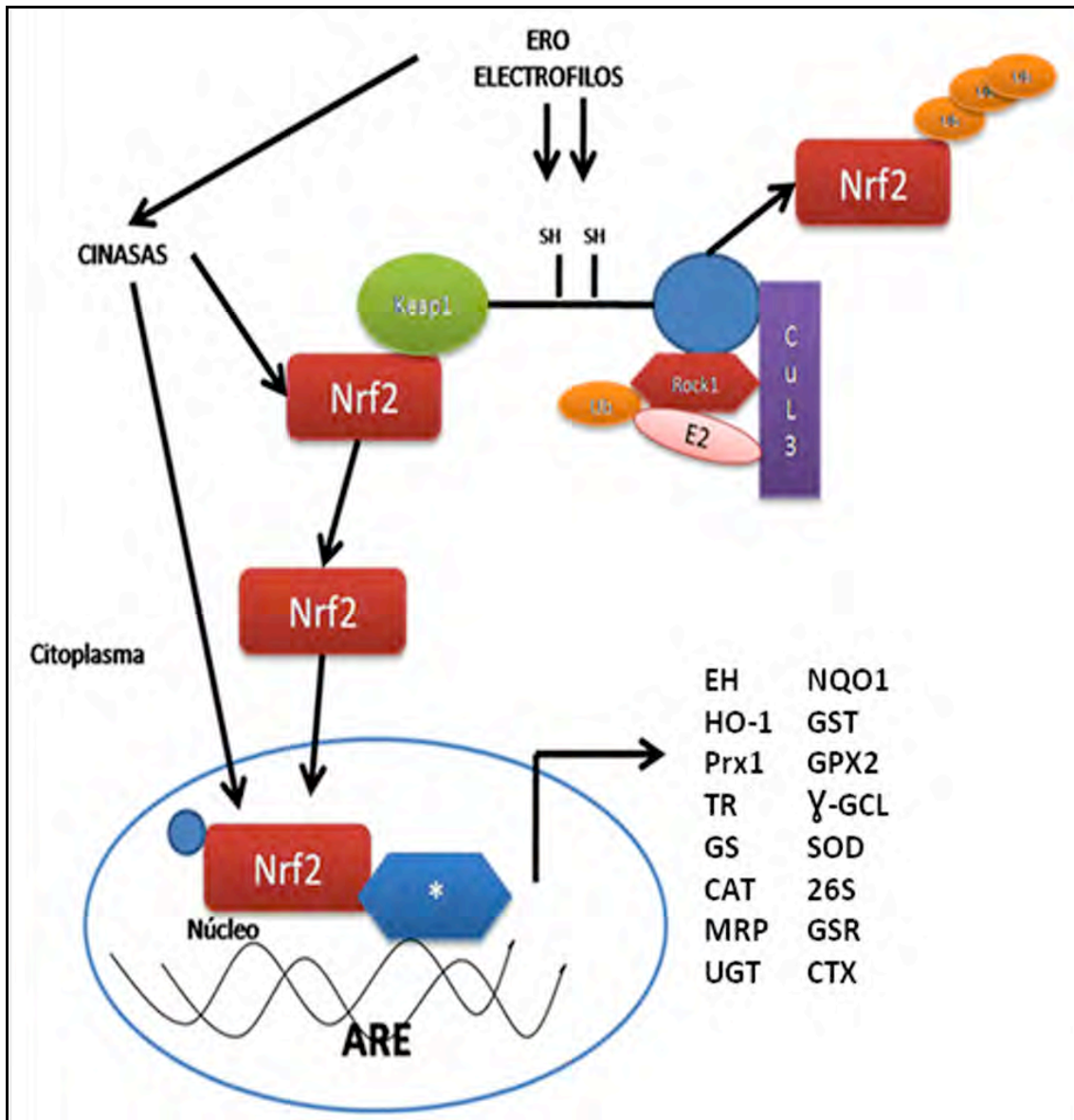


Figura 7. Vía Nrf2-Keap1. La exposición a compuestos electrófilos y ERO o la activación de diferentes cinasas libres provoca la disociación del complejo. Este se transloca al interior del núcleo donde se dimeriza y activa la transcripción de genes blanco. El Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE), Epóxido Hidrolasa (EH), quinona oxidoreductasa 1 (NQO1 NAD(P)H), Hemo-oxigenasa 1 (HO-1), peroxiredoxina 1 (Prx1), glutatión S-transferasa Ya Yc (GST), glutatión peroxidasa 2 (GPX2), tioredoxina reductasa (TR), γ - glutamil-cistein-sintetasa subunidad modificada y subunidad catalítica (γ -GCL), Glutathion Sintetasa (GS), superóxido dismutasa (SOD), proteína 1 multi-droga de resistencia (MRP1), glutatión reductasa (GSR), UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 (UGT), sub-unidad de proteosoma (26S). Asterisco: miembros de la familia Small Maf, ATF4, PMF1 o un miembro de la familia Jun. Tomado de Rubio *et al*, 2009.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Borja y colaboradores en 1997; reportan que en los años de 1990 -1992 en la Ciudad de México y Zona Metropolitana, los incrementos de ozono atmosférico estuvieron un 75% de los días totales por arriba de la norma permitida para los Estados Unidos, relacionando directamente al ozono como responsable de la mortalidad por problemas cardiovasculares en la población, después de la exposición a una hora máxima de ozono. De lo anterior se desprende el hecho de que son pocos los estudios realizados sobre los daños ocasionados por los COV de manera individual o combinados con otros contaminantes. De ahí la importancia de elucidar la función del factor Nrf2 en la defensa celular ante la exposición a concentraciones agudas permisibles a COV y ozono, lo cual ayudará a establecer el grado de expresión de las enzimas desintoxicantes de fase II, reguladas por el factor de transcripción Nrf2 en cerebros y testículos de ratón, lo que podría explicar los daños neurológicos y posibles causas de infertilidad reportados por efecto de la contaminación ambiental.

III. HIPÓTESIS

Si los COV, ozono y la mezcla de éstos sobre-expresan al factor de transcripción Nrf2, entonces el mecanismo de protección mediado por ARE permitirá la expresión de enzimas desintoxicantes de la fase II, provocando estrés oxidativo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del factor de transcripción Nrf2, en el cerebro y los testículos de ratón, como mecanismo de protección celular mediado por ARE, ante la exposición a COV, ozono y su mezcla.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar la expresión de Nrf2 en cerebro y testículos de ratón ante la exposición a COV, ozono y su mezcla.
- Evaluar los cambios en la expresión de enzimas desintoxicantes de fase II en cerebro y testículos de ratón con sitio ARE, HO-1 y GCL tras la exposición a COV, ozono y su mezcla.
- Analizar la existencia de una posible correlación entre la expresión de enzimas desintoxicantes de fase II y el estrés oxidativo en cerebros y testículos de ratón como daño celular generado por la exposición a COV, ozono y su mezcla.

V. MÉTODOS

Se trabajo con 12 ratones machos de la cepa CD-1, de seis a siete semanas de edad, clasificados como jóvenes maduros y de peso aproximado de 35 g, proporcionados por el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, los cuales se mantuvieron en condiciones controlas del mismo; con 12 h de luz y 12 h de oscuridad con ventilación por filtro de aire HEPA (del inglés High Efficiency Particle Arresting) 99.9 % de alta eficiencia con 20 cambios por hora de volumen por cuarto; la temperatura de 16-24 °C y humedad del 40%. El alimento proporcionado fue estéril de la marca HARLAN; el agua proporcionada fue filtrada, acidificada, esterilizada; ambos de libre acceso.

Los animales se trataron con COV, ozono y la mezcla de ambos, utilizando una cámara de exposición de gases, con las siguientes dimensiones (figura 8).

Altura = 41 cm

Longitud: 51 cm

Profundidad: 31 cm



Figura 8. Cámara de exposición de gases.

La exposición se realizó de manera aguda (1 hora), según ATSDR (por sus siglas en ingles Agency for Toxic Substances and Disease Registry), siguiendo las

concentraciones establecidas por la OSHA (por sus siglas en inglés Occupational Safety and Health Administration), para personas ocupacionalmente expuestas, de 5 ppm en exposiciones agudas para la mezcla de orgánicos volátiles. Los COV utilizados fueron Benceno, Tolueno, Xileno, Etil-benceno y Metil-terbutil-eter (MTBE).

Para el caso del ozono, la Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-1993 de Salud Ambiental, establece un límite máximo normado de 0.11 ppm, equivalente a 216 µg/m³ en una hora, una vez al año, en un periodo de tres años, para protección a la salud de la población susceptible. En este trabajo se utilizó esa concentración en los tratamientos individuales con ozono y una concentración de 1 ppm cuando fue en mezcla con volátiles; que corresponde a la concentración donde se empiezan a observar cambios en la lactato dehidrogenasa en células epiteliales de pulmón para activar la vía Nrf2 (Postlethwait, 1994). A continuación se muestra la tabla 3 que especifica el tratamiento, la concentración y el número de animales utilizados.

Tabla 3. Tabla de tratamientos

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN ppm	NÚMERO DE ANIMALES
Control	---	3
Ozono	0.11	3
Mezcla de Volátiles (Benceno, Tolueno, Xileno, Etil- benceno y MTBE)	5.0**	3
Ozono + Mezcla de Volátiles	1* + 5.0**	3
Total de animales: 9		
Tiempo de exposición: 1 hora		

*Activación de la vía Nrf2 (Postlethwait, 1994), ** Concentración máxima de benceno (OSHA)

Inmediatamente después, se realizó el sacrificio de los animales por dislocación cervical y se procedió a la extracción de los órganos de interés.

5.1 Extracción proteica de tejidos

Una vez extraídos los tejidos (cerebro y testículos) se lavaron con solución salina. Con la ayuda de un macerador se disgregaron por separado los tejidos, agregando 1.5 ml de PBS complementado con inhibidores de proteasas; todo esto a 4 °C. Posteriormente se centrifugo el homogenizado a 10 000 rpm, 4 °C durante 10 min. Se obtuvo el sobrenadante y se repitió el último paso. Posteriormente se determinó la cantidad de proteína total por medio del método de ácido bicinconinico (BCA Protein Assay Kit, Termo Scientific Prod#23225).

5.2 Western blot

Para determinar los cambios en la expresión proteica, se utilizó la técnica de Western blot, la cual consiste en la separación de proteínas en un gel de acrilamida dependiendo de su peso molecular, bajo condiciones desnaturalizantes. De la proteína cuantificada, se tomaron 40 µg y se cargaron en un gel de acrilamida al 12%, el cual se hizo correr 1 h, 30 min a 500 amperes y 100 Volts. La transferencia de proteínas del gel, se hizo a través de una membrana de PVDF (del inglés Polyvinylidene Fluoride), haciendo pasar 500 amperes y 100 Volts durante el mismo tiempo en que realizó la electroforesis. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, esta se bloqueó una noche a 4 °C con solución de bloqueo (0.2 g de BSA, 1 g de leche descremada, disueltos en 20 ml de TBS-TWEEN 0.1 %).

Para las inmunodetecciones se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Nrf2 (T-19 sc-30915, goat policlonal IgG Santa Cruz Biotechnology), Keap1 (E-20,sc-15246, goat policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), HO-1 (C-18, sc-1796, goat policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), γ -GCS (T-16, sc-22663, goat policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) y actina (C-11,sc-1615, goat policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology).

Las diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios, fueron de 1:250, exceptuando actina la cual fue de 1:2000; estos se incubaron 1 h 30 min a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación; la membrana fue lavada con TBS-TWEEN al 0.1% (este paso también se repitió al finalizar la incubación de anticuerpo secundario). Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario [(Rabbit anti-Goat IgG (H+L) conjugado con HRP (peroxidasa de rabano ZIMED 81-1620)] 1 h, 30 min a 37 °C, en una dilución de 1:20 000.

Finalmente se reveló la membrana por medio de una autoradiografía con la ayuda del reactivo ELC-Western Blotting Analysis System el cual provoca una reacción quimioluminiscente que es catalizada por la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario y se hace evidente al quemar la placa de revelado, marcando el bandeo de las proteínas de interés con un color oscuro.

El análisis densitométrico se realizó con el programa EDAS Kodak 1D, versión 3.5.3.

5.3 Lipoperoxidación

La oxidación de lipoproteínas o lipoperoxidación (Lpx), es un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Tortolero *et al*, 2005). La técnica fue utilizada para detectar el posible daño a la membrana celular midiendo la concentración de malondialdehído (MDA), producto de la Lpx, esto a través del método del ácido tiobarbitúrico descrito por Buege y Aust en 1978.

Para realizar este ensayo, se tomaron aproximadamente 20 µl de las muestras, lo que fue equivalente a 50 µg de proteína; y se le agregó el volumen equivalente de ácido tricloroacético (TBA) al 20 %. Se centrifugó a 3 000 g, 4 °C por 10 min.

Al sobrenadante obtenido de cada muestra, se le agregó 1 ml de reactivo TBA (0.375% TBA y 2% ácido acético), una vez realizado este paso, se pusieron a ebullición en baño María a 92 °C por 45 min. Finalmente se tomó de cada una, 200 µl que se colocaron en una placa de ELISA y se leyeron a 532 nm. Los resultados se interpolaron con una curva patrón de 1,1,3,3-tetraetoxipropano

(MDA), el cual es sometido a toda la reacción con el TBA, en concentraciones de 0-10 nM.

5.4 Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística de la cuantificación de Lpx y las densitometrías del Western blot entre los órganos tratados con COV, ozono y la mezcla de ambos, se utilizó la prueba estadística paramétrica *t de Student*, tomando como significativa una $P \leq 0.05$. Mientras que las correlaciones se realizaron mediante la prueba de Pearson. Todo se realizó a través del programa estadístico Graph PAD In Stat 1.14 (1990).

VI. RESULTADOS

6.1 Cargado de geles

Los controles de carga para los geles de acrilamida se hicieron mediante la tinción con azul de Cumassie posterior a la electroforesis y previo a la transferencia, una muestra representativa se muestra en la figura 9.

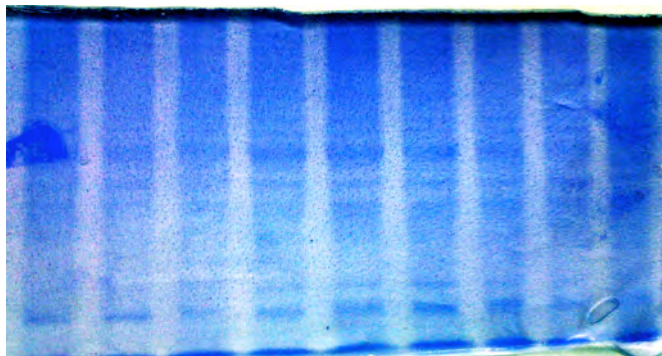


Figura 9. Gel de acrilamida teñido con azul de Cumassie, mostrando el cargado de las muestras.

6.2 Expresión de nrf2.

Para determinar la inducibilidad de la expresión protéica de Nrf2 en cerebros y testículos de ratón CD-1, se dieron tratamientos *in vivo* con butilhidroxitolueno (BHT) el cual es un inductor del factor de transcripción (Chan y Kan, 1999); a continuación se muestran las bandas del Western blot en dichos órganos (figura 10).

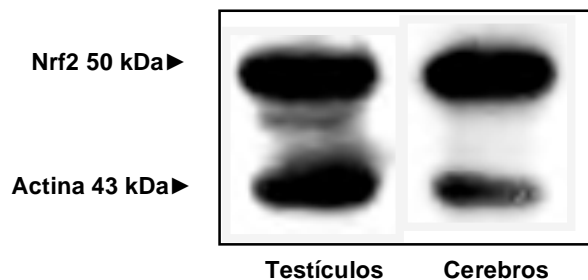


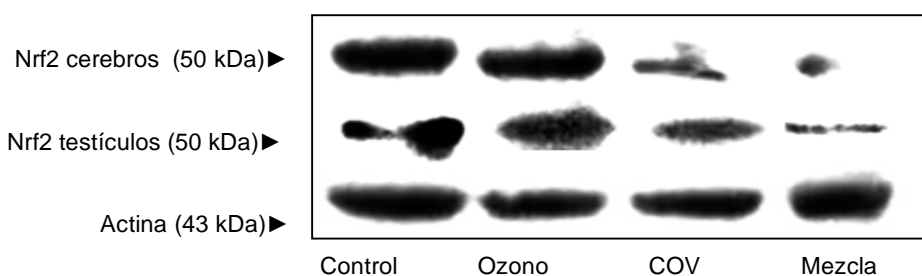
Figura 10. Expresión protéica de Nrf2 en extractos celulares totales en cerebros y testículos. Western blot tanto para Nrf2 como para actina tras el tratamiento vía intraperitoneal con butilhidroxitolueno (BHT), metabolito inductor de la vía de Nrf2.

6.3 Expresión protéica

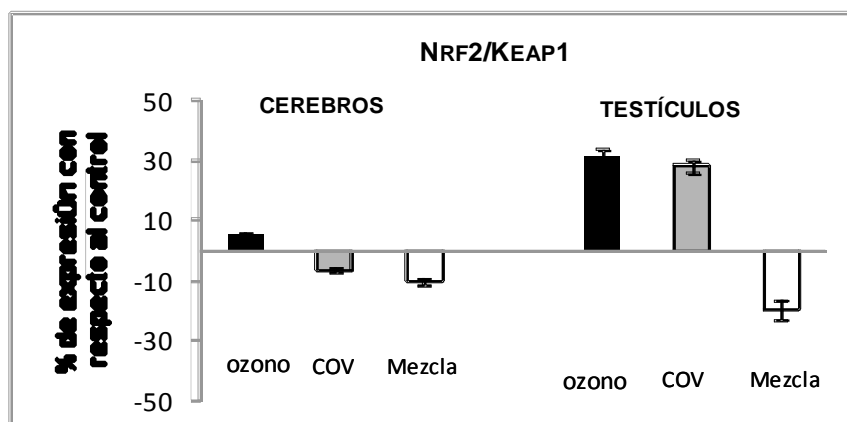
En la figura 11A, se muestra el porcentaje de expresión protéica de extractos celulares totales de Nrf2 realizado por medio de un cociente con Keap1; es importante mencionar que todos los experimentos se realizaron con una réplica.

En cerebros el factor muestra una tendencia a sobre-expresarse únicamente ante el ozono. En testículos se muestra la misma tendencia ante el tratamiento con ozono y con los COV, sin embargo, ningún valor llega a ser estadísticamente significativo.

A)



B)

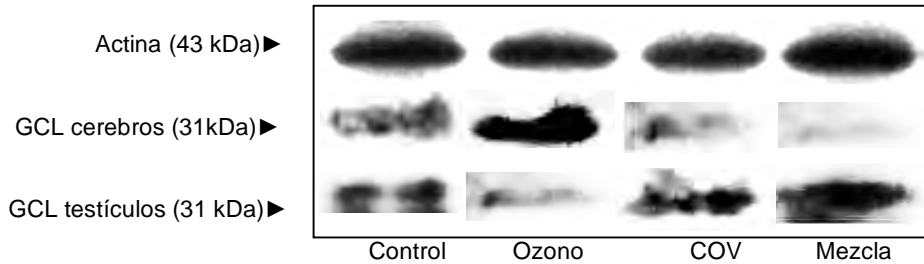


Nrf2/Keap1	n	Cerebros (%)	DS	EE	Testículos (%)	DS	EE
Ozono	6	5.45	0.94	0.47	31.48	4.51	2.25
COV	6	6.20	1.17	0.58	27.98	4.40	2.20
Mezcla	6	10.10	2.02	1.01	19.55	5.88	2.94

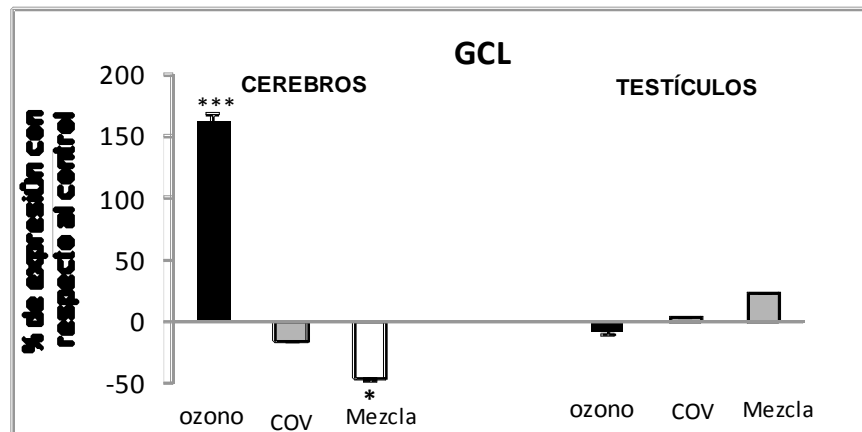
Figura 11. A) Autorradiografía de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Muestra las bandas de actina y Nrf2, ante el control y las tres condiciones utilizadas, tanto para cerebros como para testículos. **B)** Muestra el porcentaje de expresión protéica en extractos celulares totales de la banda activa de Nrf2 (50 kDa) con respecto al control, ante una exposición aguda; las barras representan la media del EE, en cerebros y testículos. El anticuerpo utilizado para la detección de Nrf2 reporta un peso de 50/100 kDa.

En las expresiones protéicas obtenidas para GCL en cerebros se obtuvo una sobre-expresión significativa ($P \leq 0.001$) ante el tratamiento con ozono, además de una sub-expresión ante la mezcla, también significativa ($P \leq 0.05$). En el caso de los testículos se muestra una tendencia de sobre-expresión ante los tratamientos con los COV y la mezcla (figura 12).

A)



B)



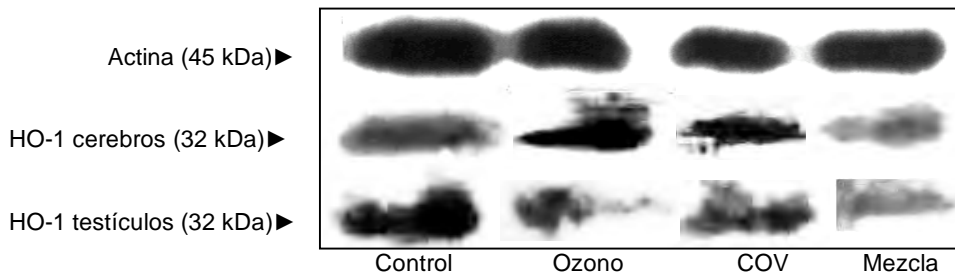
GCL	n	Cerebros (%)	DS	EE	Testiculos (%)	DS	EE
Ozono	6	164.07	7.29	4.20	-6.73	2.92	1.68
COV	6	-16.00*	0.30	0.17	3.31	1.10	0.63
Mezcla	6	-46.15***	0.68	0.39	22.96	0.05	0.03

Figura 12. A) Autoradiografía de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes. Muestra las bandas de actina y GCL, ante el control y las tres condiciones utilizadas, tanto para cerebros como para testículos. **B)** Muestra el porcentaje de expresión protéica en extractos celulares totales de la banda de GCL con respecto al control, ante una exposición aguda; las barras representan la media del EE, en cerebros y testículos. El anticuerpo utilizado reporta un peso de 31 kDa para la banda de GCL.

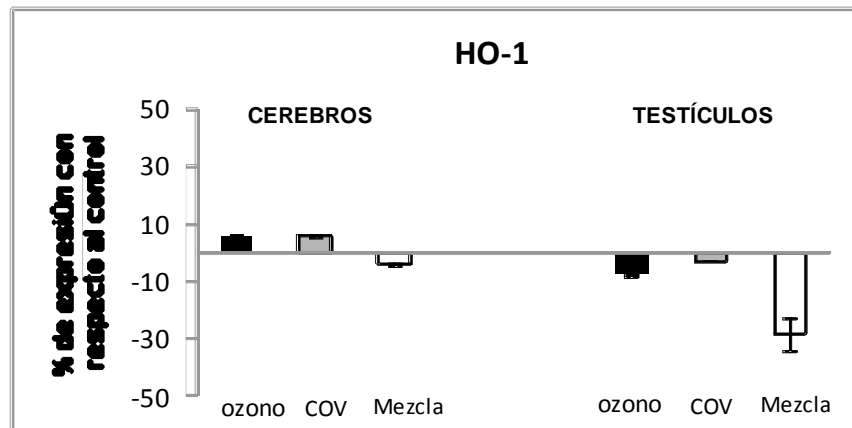
* $P \leq 0.05$ y *** $P \leq 0.001$ comparado con el control.

En cuanto a la expresión de HO-1, no existió ningún cambio estadísticamente significativo independientemente de los órganos y los tratamientos. Sin embargo, en el caso de los testículos la expresión de la HO-1 muestra una tendencia a sub-expresarse ante los tres tratamientos (figura 13).

A)



B)

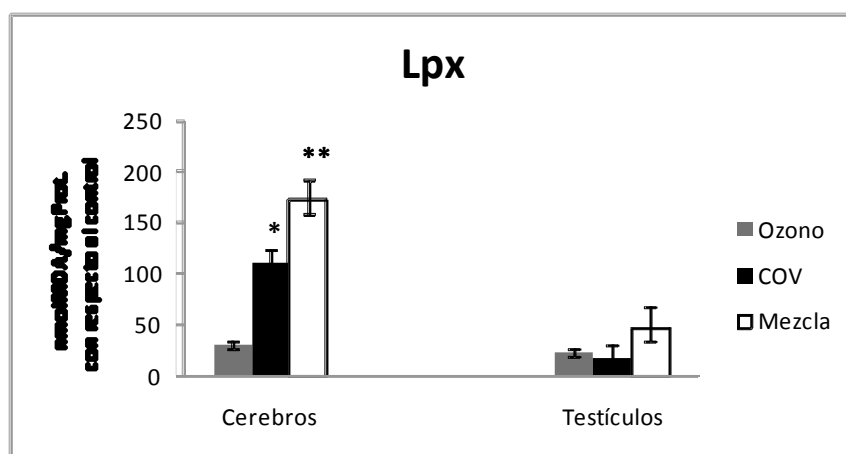


HO-1	n	Cerebros (%)	DS	EE	Testículos (%)	DS	EE
Ozono	6	6.02	0.56	0.32	-7.47	0.64	0.37
COV	6	6.27	0.50	0.29	-2.67	0.12	0.07
Mezcla	6	-3.48	0.72	0.41	-28.52	9.99	5.77

Figura 13. A) Autoradiografía de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Muestra las bandas de actina y HO-1, ante el control y las tres condiciones utilizadas, tanto para cerebros como para testículos. **B)** Muestra el porcentaje de expresión protéica en extractos celulares totales de la banda de HO-1, con respecto al control, ante una exposición aguda; las barras representan la media del EE en cerebros y testículos. El anticuerpo utilizado reporta un peso de 32 kDa para la banda de HO-1.

6.4 Lipoperoxidación

La Lpx se determinó a través de la cuantificación del subproducto final de reacción (concentración de MDA) y los resultados mostrados en la figura 14 señalan que este efecto oxidativo, sólo se induce en el cerebro y es significativo tras la exposición a COV y a la mezcla.



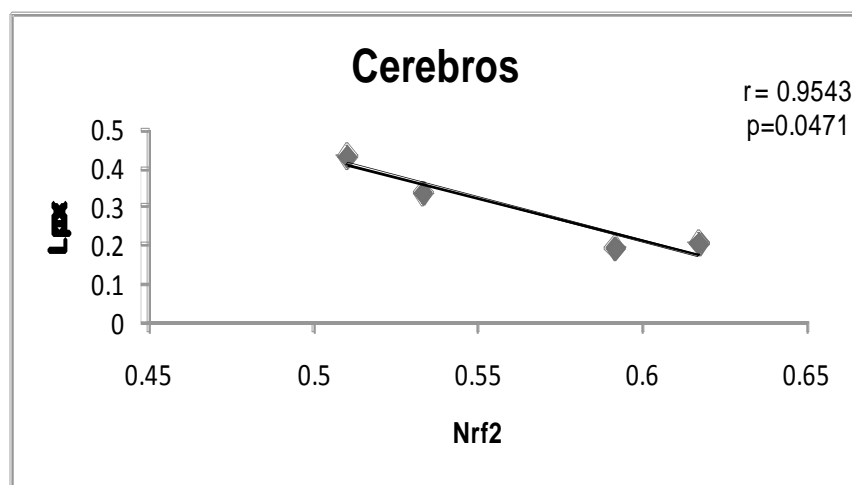
Lpx	n	Cerebros (nmolMDA/mgProt.)	DS	EE	Testículos (nmolMDA/mgProt.)	DS	EE
Ozono	3	30.03	11.57	4.72	21.96	6.59	2.69
COV	3	111.12*	31.36	12.08	17.15	5.04	2.05
Mezcla	3	171.52**	51.76	21.13	47.08	32.88	13.42

Figura 14. Muestra la determinación de lipoperoxidacion (nmol de MDA/mg de proteína) en cerebros y testículos con respecto al control, ante exposiciones agudas a diferentes los compuestos. Las barras representan la media del EE.

* $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$ comparado con el control

6.5 Correlación lineal

Se realizó una correlación simple de Pearson entre los datos de Lpx y las expresiones protéicas para cada uno de los órganos. En la figura 15, sólo se muestra la correlación estadísticamente significativa entre Lpx y Nrf2 en cerebros.



Cerebros	Lpx (nmolMDA/mgProt)	Nrf2 (Expresión prot.)
Control	0.19	0.59
Ozono	0.20	0.61
COV	0.33	0.53
Mezcla	0.43	0.51

Figura 15. La grafica muestra una correlación lineal de *Pearson* entre lipoperoxidación y expresión protéica de Nrf2 en cerebros, ante una exposición aguda.

* $P \leq 0.05$

VII. DISCUSIÓN

En muchos estudios, tales como los de Kang *et al*, 2002; Li *et al*, 2004 y Waalkes *et al*, 2007, por mencionar algunos; se ha especulado sobre las diversas bandas de expresión que se obtienen mediante Western blot del factor de transcripción Nrf2. Por ello, en este trabajo utilizamos a BHT como inductor de la vía (Chan y Kan, 1999) dado que es un compuesto fenólico antioxidante que ha sido empleado como inductor de sobre-expresión de Nrf2. El experimento demostró que tras el tratamiento con BHT, la banda que presentó cambios en su expresión fue la correspondiente a 50 kDa, por lo que se decidió usar esta banda para realizar nuestros análisis.

7.1 Cerebro

La sobre-expresión de Nrf2 inducida por el tratamiento con ozono en cerebros (figura 11), generó incrementos de la proteína GCL, limitante de la síntesis del glutatión, cuya expresión es activada directamente por la unión Nrf2-ARE (McMahon *et al*, 2001), mostrándose ante la exposición aguda a ozono sobre-expresada de manera importante, además de sub-expresarse ante la mezcla de ambos contaminantes. Esto sugiere que la exposición a ozono induce la defensa antioxidante mediante la GCL con el propósito de evitar un daño celular en el cerebro. Al respecto, Johnson y colaboradores en 2008 reportan, que los efectos neuroprotectores en astrocitos son mediados por la activación de Nrf2-ARE y la subsiguiente sobre-expresión de GCL.

En los tratamientos con los COV y la mezcla se mostró la sub-expresión de GCL y Nrf2, lo cual podría deberse a la degradación de dichas proteínas por parte de los mismos volátiles o sus metabolitos.

En cuanto a HO-1, otro efector de Nrf2, la exposición a ozono y COV indujo una ligera sobre-expresión. El efecto inducido por los COV podría atribuirse a sus metabolitos, ácidos mucónicos y metil hipúricos, ya que Cuadrado y Rojo en 2008, reportan que estos inducen la sobre-expresión de la HO-1 para restaurar la

homeostasis al entablarse una respuesta inflamatoria. Además, una degradación rápida del factor Nrf2, por la exposición a la mezcla, podría explicar la sub-expresión de HO-1.

Así mismo, considerando que los niveles de HO-1 se encuentran suprimidos en linfocitos periféricos, placas seniles y astrocitos de pacientes con Alzheimer (Schipper, 1999; Sirnonianl y Coyle, 1996; Schipper *et al*, 2004) y que el incremento o supresión de esta proteína se proponen como marcadores para la detección de enfermedades neurodegenerativas (Cuadrado y Rojo, 2008; Syapin, 2008), resulta interesante que la exposición a la mezcla de metales también induzca una respuesta de supresión reflejando ciertas capacidades neurotóxicas (Sobeková *et al*, 2009). También hay que considerar que la activación del factor de transcripción, Nrf2, ha sido propuesta como terapia en el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos (Jakel *et al*, 2007).

7.2 Testículo

En este órgano la exposición a ozono y COV indujo la sobre-expresión de Nrf2, sin embargo, esta respuesta no fue suficiente para activar a sus proteínas efectoras, exceptuando a la GCL que se mostro sobre-expresada ante la exposición a los COV. El tratamiento con la mezcla, sólo mostró la sobre-expresión de la proteína efectora, GCL, sugiriendo una degradación rápida de Nrf2. Es importante señalar que la exposición a ozono, COV y su mezcla no indujo la sobre-expresión de HO-1, proteína efectora proinflamatoria de la vía Nrf2, lo cual aunado a los resultados negativos en la lipoperoxidación, podrían señalar que en este órgano no hay actividad metabólica, que la cantidad de COV o sus metabolitos no fueron suficientes y/o que existe una muy buena respuesta antioxidante, ya que otros autores han reportado que algunos metabolitos de los COV son capaces de generar estrés oxidativo en esperma y lo han relacionado con infertilidad (Meeker *et al*, 2004; Tortolero *et al*, 2005); siendo esta la explicación a la falta de respuesta en las proteínas efectoras.

En cuanto al establecimiento de estrés oxidativo generado únicamente en cerebro por la exposición a COV y la mezcla, fue posible cuantificar daño oxidativo evaluado como lipoperoxidación, lo que implicaría que este órgano es más susceptible a daños celulares ocasionados por estos tipos de compuestos, lo que sugiere que la barrera hematoencefalica que protege a este órgano, está siendo vulnerable.

Por otra parte, es claro que la exposición a contaminantes ambientales causa efectos adversos a la salud. Algunos de estos contaminantes son potentes oxidantes que pueden dañar directamente a componentes celulares y alterar funciones fisiológicas. Algunos contaminantes sufren una serie de oxidaciones, producto del metabolismo, generando varios intermediarios reactivos con la finalidad de provocar la solubilidad de los componentes originales (Shimada, 2006; Rubio *et al*, 2009). Sin embargo, hay pocos estudios avocados a esclarecer la secuencialidad de eventos moleculares provocados entre la exposición a contaminantes ambientales y los efectos adversos sobre la fisiología.

Considerando que el factor de transcripción Nrf2, es capaz de regular la expresión de proteínas del metabolismo de fase II que entablan una respuesta antioxidante, en el presente trabajo determinamos la capacidad de inducción de la vía en el cerebro tras la exposición vía inhalatoria a ozono, COV y la mezcla de ambos, la cual fue establecida a través de la generación de estrés oxidante. Mientras que en el testículo no fue posible evidenciar el establecimiento de estrés oxidativo al igual que la sobre-expresión de Nrf2, aunque se mostraron cambios en HO-1, que pudieron ser ocasionados por la participación de otras vías como las de respuesta inflamatoria. Lo que resalta la importancia de ahondar sobre los procesos que se alteran en el cerebro por la exposición crónica vía inhalatoria a estos contaminantes para determinar la relación entre esta exposición y el desencadenamiento de alteraciones que conduzcan a la neurodegeneración.

VIII. CONCLUSIONES

- El ozono y los COV activaron la vía Nrf2 de forma diferencial en ambos órganos.
- En cerebros, Nrf2 se sobre-expresó por la inhalación de ozono, mientras que la inhalación de COV y la mezcla indujeron una ligera sub-expresión. En los testículos la inhalación de ozono y COV indujo la sobre-expresión de Nrf2 y se mostro una sub-expresión ante la mezcla.
- En cerebros, la GCL se sobre-expreso ante el ozono, mientras que en los COV y la mezcla se sub-expreso, en cuanto a la HO-1, esta se sobre-expreso ante el ozono y los COV y sub-expreso ante la mezcla. En testículos, la GCL se sub-expreso ante el ozono y sobre-expreso ante los COV y la mezcla, en lo referente a la HO-1, esta presento una sub-expresión ante todos los compuestos.
- En el cerebro se observó una inducción de lipoperoxidacion inversa a la inducción de Nrf2.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR. En línea: www.atsdr.cdc.gov/es. [18/03/08]

Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. 112:970-978; 2004.

Bhatnagar A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circulation Research*. 99:692-705; 2006.

Borja-Aburto VH, Loomis DP, Bangdiwala SI, Shy CM, Rascon-Pacheco RA. Ozone, suspended particulates and daily mortality in Mexico City. *American Journal of Epidemiology*. 45:258:268; 1997.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation *Methods in Enzymology*. *Methods Enzymol*. 52:302-10; 1978.

Calderón–Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, García R, Gambling TM, Osnaya N, Monroy S, DEL Tizapantzi MR, Carson JL, Villareal–Calderón A, Rewcastle B. Air pollution and brain damage. *Toxicology Pathology*. 9:1029–1054; 2002.

Campbell A. Inflammation. neurodegenerative diseases and environmental exposure. *Annals of the New York Academy of Science*. 1035:117–132; 2004.

Chan K. y Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Academy of Science of United States of America*. 96(22):12731–12736; 1999.

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. 246:24-33; 2007.

Cuadrado A, Rojo AL. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Current Pharmaceutical Design* 14(5):429-42; 2008.

Curtis L, Rea W, Smith-Willis P, Fenyves E, Pan Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environmental International*. 32:815-830; 2006.

Dinkova-Kostova AT, Massiah M, Bozak RE, Hicks RJ, Talay P. Potency of Michel reaction acceptors as inducer of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*. 98:3404-3409; 2006.

Duty SM, Singh NP, Silva MJ, Barr DB, Brocks JW, Ryan L, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. The Relationship between Environmental Exposures to Phthalates and DNA Damage in Human Sperm Using the Neutral Comet Assay. *Environmental Health Perspectives*. 111(9):1164-1169; 2003.

Estado de México. Comunicado núm. 101/06, INEGI, 2006. En línea: <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Boletines/Boletin/Comunicados/Especiales/2006/Mayo/comunica18.pdf>. [18/03/08]

Estrada CM, Molina MG, Gutierrez CA, Perez DG. Enzimas de la biosíntesis del Glutation Reducido (GSH). Valores normales y estudio de un paciente con deficiencia de GSH. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 15(1):35-41; 1999.

Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) as a target in cancer treatment. *Apoptosis*. 9:27-35; 2004.

García VJA, García LL. ¿Disminuye la calidad del semen?" *Medicina Clínica*. 107:336-337; 1996.

Howards SS. Treatment of male infertility. *The New England Journal of Medicine*. 332:312-317; 1995.

Hu X, Roberts JR, Apopa PL, Kan YW, Ma Q. Accelerated Ovarian Failure Induced by 4-Vinyl Cyclohexene Diepoxide in Nrf2 Null Mice" *Molecular and Biology*. 26(3):940–954; 2006.

Instituto de Salud, Ambiente y trabajo, ISAT. En línea: http://www.cepis.org.pe/bvsci/e/fulltext/toxicol/lecc3/lecc3_7.html. [30/09/09]

Instituto Nacional de Ecología, INE. En línea: En línea: www.ine.gob.mx/.../libros/268/metro3.html. [31/03/05]

Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular Mechanism Activating Nrf2-Keap1 Pathway in Regulation of Adaptive Response To Electrophiles. *Free Radical Biology & Medicine*. 36(10):1208-1213; 2004.

Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, Johnson JA. Nrf2- mediated protection against 6-hydroxidopamine. *Brain Research*. 1144, 192-201; 2007.

Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC. The Nrf2–ARE Pathway an Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Annals of the New York. Academy of the Sciences*. 1147: 61–69; 2008.

Kang KW, Lee SJ, Park JW, Kim SG. Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulates Nuclear Translocation of NF-E2-Related Factor 2 through Actin Rearrangement in Response to Oxidative Stress. *Molecular Pharmacology*. 62:1001–1010; 2002.

Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M. Unique Function of the Nrf2-Keap1 Pathway in the Inducible Expression of Antioxidant and Detoxifying Enzymes, *Methods in Enzymology*. 387: 273-286;2004.

Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular Mechanism Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7(3): 385-394;2005.

Königsberg M. Nrf2: la Historia de un Nuevo Factor de transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. *Revista de educación Bioquímica*. 26(1):18-25; 2007.

Lebowitz MD. Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution *European Respiratory Journal*. 9:1029-1054; 1996.

Lewtas J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive and cardiovascular effects. *Mutation Research*. 636:95-133; 2007.

Li NAJ, Venkatesan MI, Eizuguren-Fernandez A, Schimitz D, DiStefano E, Slaughter N, Killeen E, Wang X, Huang A., Wang MAH, Cho A, Sioutas C, Nel AE. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages epithelial cells: protecting against the proinflammatory oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *The Journal of Immunology*. 173:3467-3481; 2004.

Maisonet M, Correa A, Misra D, Jouni JKJ. A review of literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environmental Research*. 95:106-115; 2004.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C, Hayes JD. The Cap 'n' Collar Basic Leucine Zipper Transcription Factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) Controls Both Constitutive and Inducible Expression of Intestinal Detoxification and Glutathione Biosynthetic Enzymes. *Cancer Research*. 61(8):3299–3307; 2001.

Meeker JD, Singh NP, Ryan L, Duty SM, Barr DB, Herrick RF, Bennett DH, Hauser R. Urinary levels of insecticide metabolites and DNA damage in human sperm. *Human Reproduction*. 19(11):2573–2580; 2004.

Molina LT y Molina M. 2002. Air Quality in the Mexico Megacity, an Integrated Assessment. Kluwer Academic Publishers. 383 p. Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, MA, U.S.A. 2002.

Munguía CME. La "Contaminación Atmosférica en el Sur de la Zona Metropolitana del Valle de Mexico. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex*.16(1):48-53; 2003.

Mustafa MG. Biochemical Basis of Ozone Toxicity. *Free Radical Biology & Medicine*. 9:245-265; 1990.

Nguyen T, Sherrat PL, Pckett CB. Regulatory Mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 43:233-260; 2003.

Occupational Safety and Health Administration, OSHA. En línea:www.osha.gov. [18/03/08]

Pascual-Garvi, Gonzales FL, Prieto RA, Cerdan S, Roda JM. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Revista de Neurología*. 38 (6): 565-581 565; 2003.

Postlethwait EM, Langford SD, Bidani A. Determinants of Inhaled Ozone Absorption in Isolated Rat Lungs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 125(1):77-89; 1994.

Prester T, Holtzclaw WD, Zhang Y, Talay P. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*. 90:2965-2969; 1993.

Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la ZMVM 2002-2010. En línea: www.ine.gob.mx. [12/01/09]

Rubio V, Valverde M, Rojas E. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environmental Science and Pollution Research*. 2009. En impresión.

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. *Journal of Biological Chemistry* 266:11632-11639; 1991.

Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R. Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 24 (4): 619-26; 2005.

Schipper HM. Glial HO-1 expression, iron deposition and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*. 1:57-70; 1999.

Schipper HM. Heme-oxygenase-1: Transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stresses. *Annals of the New York Academy of the Sciences*. 1012:84-93; 2004.

Secretaría del Medio Ambiente, SMA. En línea: http://www.sma.df.gob.mx/sma/links/download/archivos/inventarioemisiones2006/inventario_emisiones_2006.pdf, Contaminantes Criterio de la Zona Metropolitana del Valle de México 2006. [17/06/08]

Sherins RJ. Are semen quality and male fertility changing? *The New England Journal of Medicine*. 332:327-328; 1995.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 21:257-276; 2006.

Sirnonianl NA, Coyle JT. Oxidative stress in Neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 36:83-106; 1996.

Skakkebaek NE, Keiding N. Changes in semen and the testis. *British Medical Journal*. 309:1.316-1.317; 1994.

Sobeková A, Holovská K, Lenártová V, Legáth J, Javorský P. The alteration of glutathione peroxidase activity in rat organs after lead exposure. *Acta Physiologica Hungarica*. 96(1):37-44; 2009.

Syapin PJ. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *British Journal of Pharmacology*. 155(5):623–640; 2008.

Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Osuna JA, Gomez R, Regadera J. Estrés oxidativo y función espermática. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 3(3):12-19; 2005.

Tovalín H, M Valverde M, Morand MT, Blanco S, Whitehead L, Rojas E. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutions *Occup. Occupational and Environmental Medicine*.63:230-236; 2006.

Waalkes PM, Qu W, Pi J, Collins S, Bai Y, Reece MJ, Liu D, Freeman LM, Williams J, Shugar D, Fahl EW. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radical Biology & Medicine*. 42:1797–1806; 2007.

Wang L, Pinkerton KE. Air pollution effects on fetal and early postnatal development. *Birth Defects Research* 81:144-157; 2007.

Wook KK, Jin LS, Geon KS. Molecular Mechanism of Nrf2 Activation by Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7(11):12; 2005.