

# **Universidad Nacional Autónoma de México**

Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**“Papel de Nrf2 en respuesta ante una exposición al  
ozono y a los compuestos orgánicos volátiles”**

## **T E S I S**

Que para obtener el grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**Valentina Rubio Calva**

Director de Tesis

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Comité tutorial

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Dr. José Pedraza Chaverri



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.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo, en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo parcial de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) proyecto IN212107. Valentina Rubio Calva recibió la beca de doctorado otorgada por Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT, número de becario 200007).

A ti, por que...

“Los amorosos son locos, sólo locos,  
sin Dios y sin diablo.

Los amorosos salen de sus cuevas  
temblorosos, hambrientos,  
a cazar fantasmas.

Se ríen de las gentes que lo saben todo,  
de las que aman a perpetuidad, verídicamente,  
de las que creen en el amor

como una lámpara de inagotable aceite” *Jaime Sabines*

## **Agradecimientos**

A Irak y Cordelia, por su paciencia inagotable, su complicidad absoluta, su amor y apoyo incondicional.

Irak: “Te amo como se aman ciertas cosas oscuras, secretamente, entre la sombra y el alma” *Pablo Neruda*

A todos los miembros de la familia Rubio Calva, por ser la brújula incorruptible en mi camino, mis cómplices garantizados en cada una de las aventuras en las que me embarco, por su cariño inigualable y categórico que impulsa cada uno de mis movimientos pero sobre todo por recordarme que pese a cualquier adversidad el sol siempre brillará.

Al Dr. Rojas y la Dra. Valverde, por ser mi guía en este largo camino, por jamás dudar de mis capacidades y creer en mí pese a mis propias inseguridades. Nunca encontraré las palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Gracias....

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Wilhelm Hansberg Torres y el Dr. José Pedraza Chaverri, por todo el tiempo dedicado a este trabajo, su paciencia y asesoría que semestre a semestre permitieron la consumación de este proyecto de investigación.

A los integrantes del jurado, el Dr. Jesús Aguirre Linares, la Dra. María Eugenia Gonsebatt, la Dra. Sandra Gómez Arroyo, la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia y el Dr. Emilio Rojas del Castillo, por su tiempo, sus comentarios y sugerencias. ¡Gracias!

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo con la beca de doctorado que me fue otorgada (número de becario 200007).

A Paulina, Vicente, Pablo, Martin, Nahum, Brenda, Maricarmen, Diego, y a todos los miembros del laboratorio Rojas-Valverde, por su apoyo técnico, su amistad y solidaridad que hicieron de las largas horas en el laboratorio una verdadera experiencia, divertida e inigualable. Gracias por todo lo que han hecho por mi, este es un trabajo de equipo y es el resultado del esfuerzo en conjunto de todos nosotros. ¡Gracias de nuevo!

To Dr. Shi, Jiawei, Jennifer, Prince and Renfang, and everyone in the Radiology department of the The Methodist Hospital Research Institute lab R6-360, thank you for all your support and advise, for always share with me not only the fun part of research but also the hard work and for helped me grow not only as a researcher but as a human being. Thank you! Xie, xie!

## Índice

1. Abreviaturas.....	10
2. Resumen/Abstract.....	11
3. Introducción.....	15
3.1. Contaminación atmosférica.....	15
3.2. Ozono.....	16
3.3. Compuestos orgánicos volátiles.....	18
3.3.1. Benceno.....	20
3.4. Mecanismo de defensa.....	22
3.4.1. Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) y Nrf2.....	23
3.4.2. Regulación de Nrf2.....	28
3.4.3. Activación de Nrf2 y regulación de la defensa antioxidante.....	29
3.5. Contaminación atmosférica y Nrf2.....	33
4. Antecedentes y planteamiento del problema.....	35
5. Hipótesis.....	38
6. Objetivos.....	38
7. Materiales y métodos: Estudio <i>in vitro</i> .....	40
8. Resultados: Estudio <i>in vitro</i> .....	46
8.1. Artículo 1: “Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone induced cytotoxicity”.....	47
9. Materiales y métodos: Estudio <i>in vivo</i> .....	56
10. Resultados: Estudio <i>in vivo</i> .....	60
10.1. Artículo 2: “Oxidative stress induced by inhalation of a mixture of ozone and volatile organic compounds”.....	62
10.2. Resultados: exposición a 0.11 ppm de ozono.....	81

10.3.	Resultados: exposición a 5 ppm de compuestos orgánicos volátiles.....	82
11.	Discusión.....	87
12.	Conclusiones.....	100
13.	Bibliografía.....	102
14.	Apéndices.....	129
14.1.	Artículo 3: “Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway”.....	130



## Índice para tablas y figuras

### Tablas

1. Diseño experimental.....	58
2. Producción de ERO y cambios en la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa en el hígado, el pulmón y los riñones de ratones expuestos a 0.11 ppm de ozono.....	82
3. Inducción de Nrf2 por compuestos naturales y su protección en contra de contaminantes atmosféricos.....	99

### Figuras

1. Ozono.....	18
2. Compuestos orgánicos volátiles.....	20
3. Mecanismo de toxicidad de los contaminantes atmosféricos.....	23
4. Elemento de respuesta antioxidante y sus reguladores.....	27
5. Regulación de Nrf2 y activación de la respuesta antioxidante.....	30
6. Mecanismo de defensa antioxidante regulado por Nrf2 inducido por la exposición a contaminantes atmosféricos.....	34
7. Estrategia del trabajo <i>in vitro</i> .....	41
8. Estructura de los vectores utilizados en el estudio <i>in vitro</i> .....	43
9. Estrategia de trabajo del estudio <i>in vivo</i> .....	56
10. Cámara de exposición.....	57
11. Daño a lípidos de membrana (lipoperoxidación) y DNA en el hígado, el pulmón y los riñones de los animales expuestos a 0.11 ppm de ozono durante 1 hora.....	83
12. Cambios en los niveles de mRNA y proteínas de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 inducidos por la exposición a 0.11 ppm de ozono.....	84

13. Daño a DNA por la exposición a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles en el hígado, el pulmón y los riñones.....	85
14. Cambios en los niveles de mRNA y proteínas de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 inducidos por la exposición a 5 ppm de compuestos orgánicos volátiles.....	86
15. Modelo de activación de Nrf2 por la exposición a los contaminantes atmosféricos.....	98

## **Introducción**

### **Contaminación atmosférica**

Los diversos problemas de salud originados por la exposición a contaminantes atmosféricos se han convertido en uno de los principales temas de salud pública (Chen et al. 2007). La exposición a estos contaminantes afecta a distintos sistemas causando enfermedades respiratorias (Lebowitz 1996), cardiovasculares (Bhatnagar 2006), neurológicas (Calderon-Garciduenas et al. 2002; Campbell 2004) y reproductivas así como efectos teratogénicos (Maisonet et al. 2004; Wang y Pinkerton 2007) inclusive cáncer (Armstrong et al. 2004; Lewtas 2007). Asimismo, reportes recientes señalan que la exposición a contaminantes atmosféricos exacerba enfermedades respiratorias causadas por agentes infecciosos (Chauhan y Johnston 2003) o por respuestas autoinmunes (Bevelander et al. 2007; Whitekus et al. 2002). De igual forma, diversos estudios han relacionado un incremento en la morbilidad y la mortalidad asociada a elevadas concentraciones de contaminantes atmosféricos (Borja-Aburto et al. 1998; Borja-Aburto et al. 1997; Franchini y Mannucci 2007; Gryparis et al. 2004; Katsouyanni et al. 2001).

La contaminación atmosférica se puede definir como la introducción de compuestos químicos, materia particulada y biológica que modifican o alteran las características físicas y químicas de la atmósfera (EPA 2006). De manera más específica, los contaminantes atmosféricos se clasifican en primarios y secundarios. Los primarios son aquellos que están presentes en la atmósfera tal y como fueron emitidos por la fuente, entre los que se encuentran la materia particulada (partículas) y diversos gases como los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y compuestos orgánicos volátiles (COV) (Ferm et al. 2006). Por otro lado, una vez emitidos, los contaminantes primarios pueden sufrir modificaciones químicas o bien, reaccionar entre sí para generar contaminantes secundarios, por ejemplo el ozono ( $\text{O}_3$ ) (Han y Naeher 2006).

## Ozono

El ozono ( $O_3$ ) es un contaminante secundario producto de la reacción entre hidrocarburos y óxidos de nitrógeno en presencia de luz ultravioleta (rayos de sol) (Yip y Madl 2000). La formación del ozono depende de las concentraciones atmosféricas de sus precursores, óxidos de nitrógeno e hidrocarburos, cuyas principales fuentes son las emisiones generadas por la combustión incompleta de combustibles, el uso de disolventes orgánicos en procesos industriales, comerciales, y refinación de petróleo así como fuentes naturales de éstos (ej. liberación de terpenos por la vegetación y de óxidos de nitrógeno por bacterias del suelo) (EPA 2010).

El ozono es un gas incoloro, de olor acre que se caracteriza por ser un poderoso oxidante altamente reactivo (Devlin et al. 1996). Dadas estas características, una vez inhalado el ozono reacciona con distintas moléculas presentes en el fluido del revestimiento epitelial, conformado principalmente por agua, sales, una mezcla de fosfolípidos con actividad surfactante, proteínas de bajo peso molecular y antioxidantes (lipofílicos e hidrofóbicos) (Bocci 2006). La reactividad del ozono evita que penetre directamente a los tejidos pulmonares (Pryor 1994). Sin embargo, al reaccionar con los antioxidantes y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), presentes en la interface aire-fluido del revestimiento epitelial, se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) (ej. peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ), aldehídos, y una mezcla heterogénea de radicales lipídicos generados durante la ozonación (LOPs, por sus siglas en inglés), entre los que se encuentran hidroperóxidos, isoprostanos, radicales lipoperóxido, el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2,3-trans-nonanal (4HNE). Es a través de la formación de estos sub-productos que el ozono induce daño no sólo pulmonar sino sistémico (Bocci 2006; Pryor et al. 1995). La exposición al ozono induce la generación de ERO (Chen y Qu 1997; Kennedy et al. 1992; Pryor 1994; Pryor y Church 1991; Romieu et al. 1998; Saintot et al. 1999) y la formación de sub-productos relativamente estables (Bocci 2006; Pryor et al. 1995) capaces de oxidar ácidos desoxirribonucleicos (DNA, por sus siglas en inglés), proteínas (Kanofsky y Sima 1993) y lípidos de membrana (Postlethwait et al. 1998) lo que de no ser contrarrestado podría inducir daño y muerte celular. Por otro lado, el fluido del revestimiento epitelial se caracteriza por altas concentraciones de

antioxidantes, principalmente ácido ascórbico y glutatión (GSH) (Bocci 2006). Al reaccionar con estos antioxidantes una porción del ozono inhalado es destruido, sin embargo este mecanismo de defensa puede resultar contraproducente. La reacción entre el ozono y el ácido ascórbico produce radicales libres que a su vez inducen daño oxidante a lípidos de membrana (Ballinger et al. 2005). De igual forma, la reacción del ozono con estos antioxidantes reduce considerablemente la concentración de los mismos, lo que puede inducir estrés y daño oxidante (Pryor et al. 1995). Finalmente, el mecanismo de toxicidad del ozono se explica como una cascada de reacciones (Pryor et al. 1995), en la cual el ozono inhalado reacciona con las moléculas del fluido del revestimiento epitelial generando ERO y sub-productos tóxicos, que a su vez son capaces de iniciar otras reacciones. Esta cascada de reacciones es la responsable de los efectos tóxicos del ozono no sólo en el microambiente pulmonar sino en todo el organismo (Ballinger et al. 2005; Bocci 2006; Pryor et al. 1995) (Figura 1).

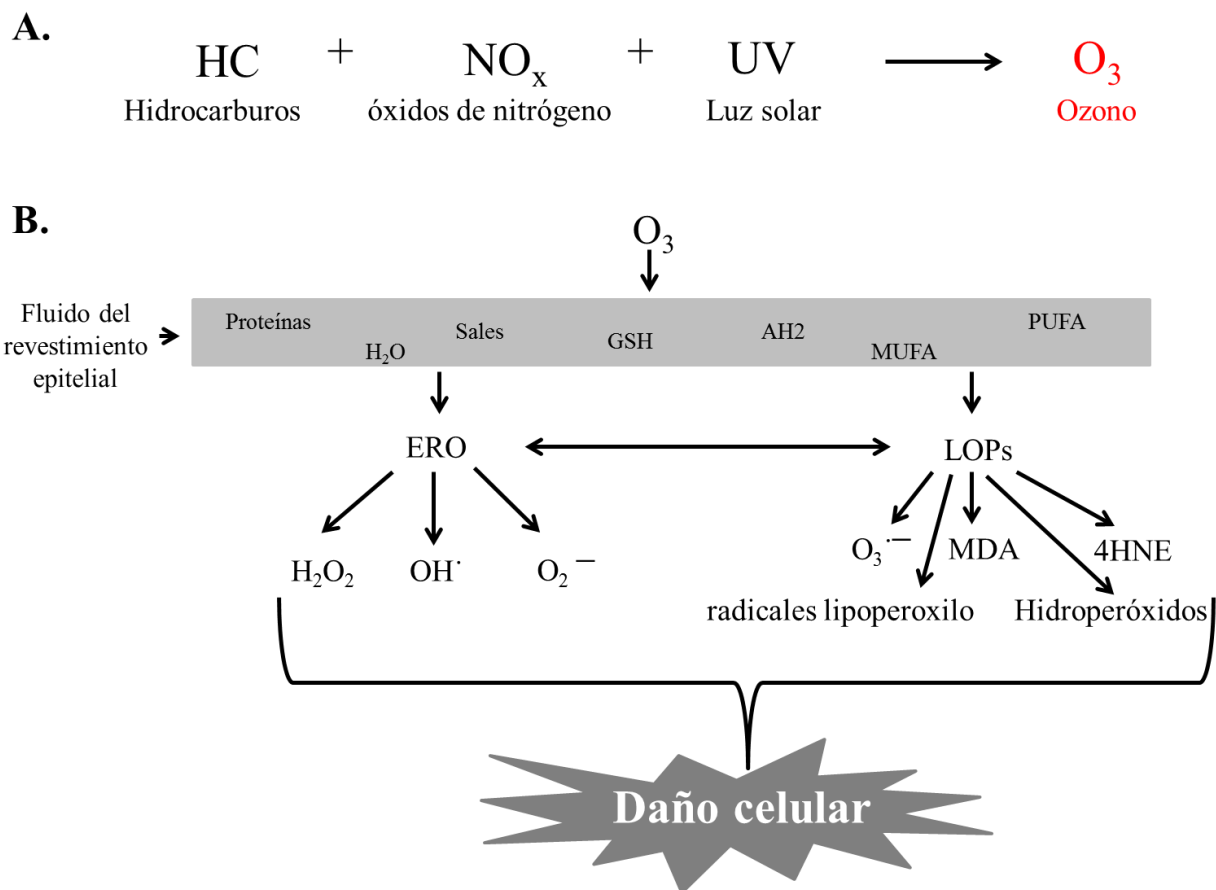


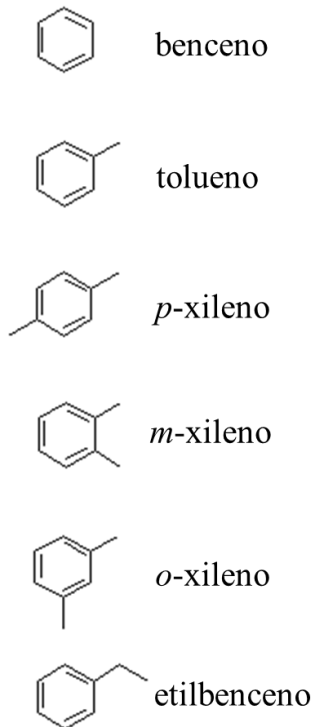
Figura 1. **Ozono.** **A.** Mecanismo de formación del ozono. El ozono es un contaminante secundario que se forma a partir de la reacción entre hidrocarburos y óxidos de nitrógeno presentes en la atmósfera en presencia de luz ultravioleta. **B.** Mecanismo de toxicidad del ozono. Al ser inhalado el ozono reacciona con las moléculas presentes en el fluido del revestimiento epitelial generando ERO y sub-productos tóxicos que son los que a su vez inducen daño a DNA, proteínas y lípidos de membrana. AH2, ácido ascórbico; ERO, especies reactivas de oxígeno; GSH, glutatión; H<sub>2</sub>O, agua; LOPs, radicales lipídicos generados durante la ozonación; MDA, malondialdehído; MUFA, fosfolípidos monoinsaturados; OH·, radical hidroxilo; O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ion superóxido; O<sub>3</sub><sup>·-</sup> radical ozonido. PUFA, fosfolípidos poliinsaturados; 4HNE, 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal.

### Compuestos orgánicos volátiles

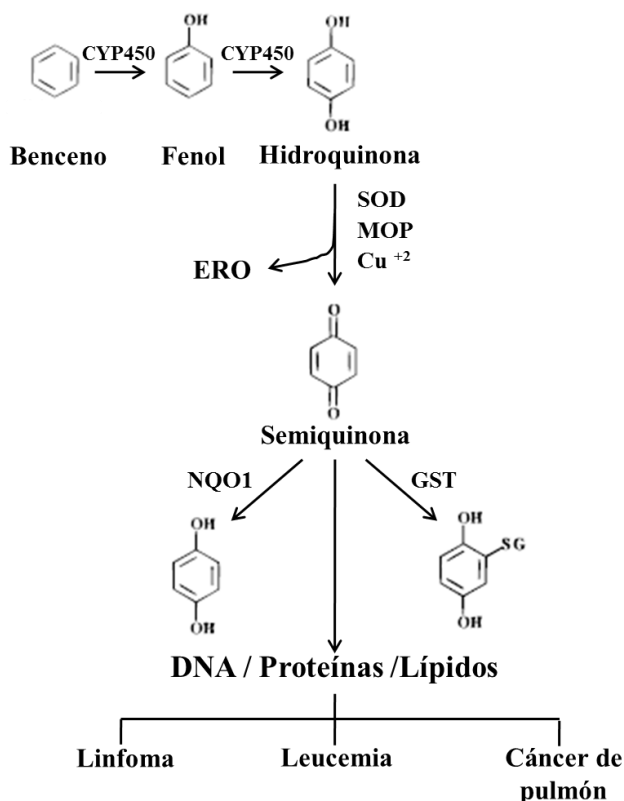
Los compuestos orgánicos volátiles (COV) se pueden definir de diversas maneras. En general, se consideran como aquellos compuestos orgánicos que por sus características químicas se volatilizan fácilmente a temperatura ambiente (EPA 2011). De manera más puntual se pueden definir como cualquier

compuesto orgánico cuyo punto de ebullición sea igual o menor a 250°C determinado a una presión atmosférica de 101.3 kPa (Han y Naeher 2006). Las principales fuentes de emisión de estos contaminantes son la quema incompleta de combustibles, procesos de distribución y refinamiento de petróleo crudo y el uso de disolventes orgánicos en procesos industriales y en productos del hogar (ej. pinturas, desinfectantes, aerosoles, etc.) (Yip y Madl 2000). Reportes recientes señalan que poblaciones en zonas con alta actividad industrial y severos problemas de tránsito (Riediker et al. 2003; Rodolfo Sosa et al. 2009) están expuestas a altas concentraciones de compuestos orgánicos volátiles, principalmente a compuestos aromáticos monosaturados, como benceno, tolueno, etilbenceno y distintas isoformas de xileno (m-, p- y o-), también conocidos como BTEX (Tovalín-Ahumada y Whitehead 2007). Además, la exposición a estos compuestos se incrementa por su presencia en productos de uso cotidiano (ej. barnices, cartuchos para impresión, desinfectantes, aerosoles, etc.) (Tovalín et al. 2006) así como en sus altas concentraciones presentes en el tabaco (Serrano-Trespalcios et al. 2004). Los compuestos orgánicos volátiles (COV) se consideran gases poco reactivos y de solubilidad limitada (Medinsky y Bond 2001); en su mayoría, son moléculas hidrofóbicas y lipofílicas capaces de atravesar la membrana lipídica de las células. Estos compuestos son relativamente inertes y su toxicidad depende de su activación metabólica o biotransformación (Barreto et al. 2009). La activación metabólica de los compuestos orgánicos volátiles (COV), en específico los BTEX, ocurre principalmente en el hígado (Snyder et al. 1989) mediada principalmente por miembros de la familia de citocromos P450 (CYP450, por sus siglas en inglés) (Bolton et al. 2000). El metabolismo de estos compuestos genera ERO (Nedelcheva et al. 1999) y metabolitos altamente reactivos (Bolton et al. 2000) que inducen daño a DNA, proteínas y lípidos de membrana (Wetmore et al. 2008). Estos sub-productos del metabolismo son los responsables de la citotoxicidad de estos contaminantes (Figura 2A).

**A.**



**B.**



Modificado de Bolton *et al.*, 2000

Figura 2. **Compuestos orgánicos volátiles.** **A.** Estructura química de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno). **B.** Mecanismo de toxicidad del benceno. El benceno es metabolizado por la familia de citocromos P450 a fenol y posteriormente a hidroquinona. La hidroquinona es oxidada en una serie de reacciones de óxido-reducción para formar benzoquinona, durante estas reacciones se da la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Con la finalidad de facilitar la secreción de este metabolito, la benzoquinona puede ser conjugada a diversas moléculas (ej. glutatión (GSH), ácido glucorónico y sulfatos) lo que incrementa su solubilidad y favorece su desintoxicación. Sin embargo, tanto la formación de hidroquinona y benzoquinona así como las ERO generadas, son capaces de inducir daño celular al interactuar con moléculas de importancia biológica, como DNA, proteínas y lípidos.

### **Benceno**

De los compuestos orgánicos volátiles, el benceno está considerado como altamente tóxico. Recientemente, la exposición a benceno se ha convertido en un problema de salud pública mundial (Han y Naeher 2006). El benceno está catalogado como carcinógeno en humano (EPA 2009; IARC 1997) y su



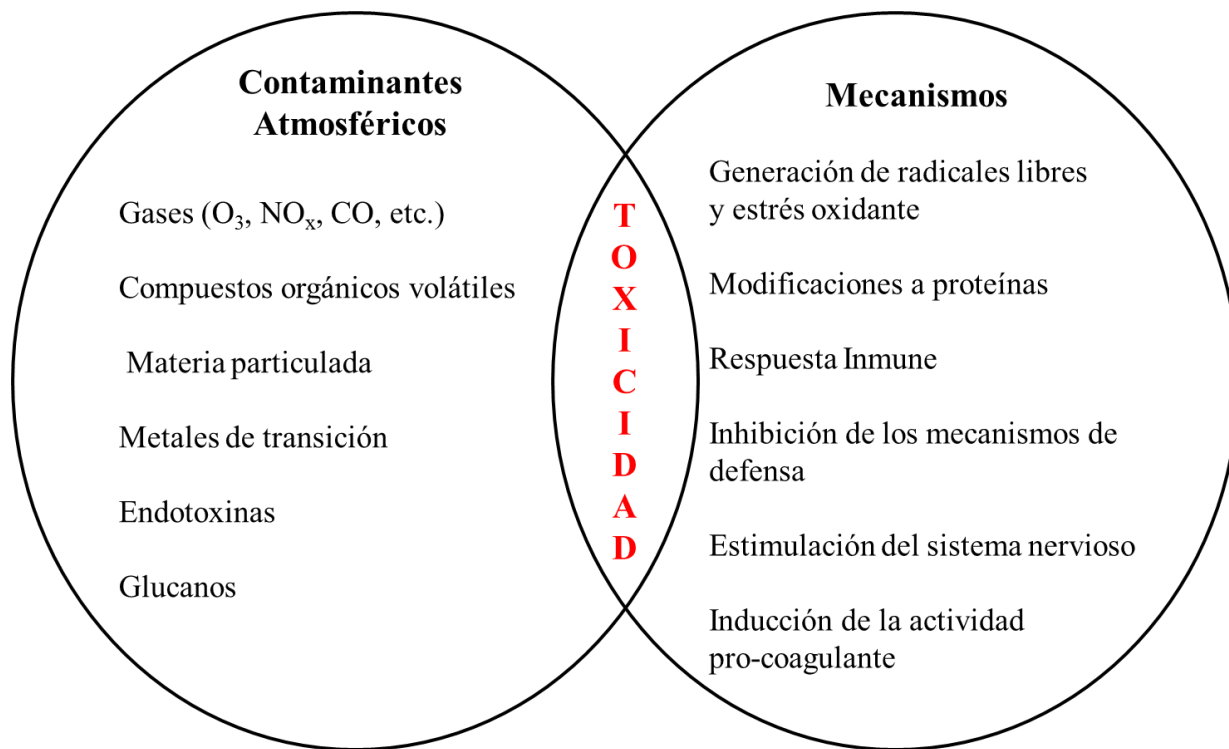
exposición está relacionada con anemia aplásica, leucemia, linfoma y cáncer de pulmón (Snyder 2002; Yin et al. 1996). Como ya se mencionó anteriormente, la toxicidad del benceno depende de su activación metabólica. El benceno es metabolizado principalmente en el hígado por el citocromo P450 CYP2E (Powley y Carlson 2001). Recientes reportes indican que el benceno también es metabolizado en el pulmón por distintos citocromos P450, en especial CYP2B1, CYP2F1 y 2F2 (Powley y Carlson 2000, 2001, 2002; Sheets et al. 2004). El metabolismo del benceno comienza con la formación de óxido de benceno, a partir de éste, de manera no enzimática se forma fenol que posteriormente es metabolizado a hidroquinona y catecol. La hidroquinona y el catecol pueden ser hidrolizados a intermediarios altamente reactivos, como la benzoquinona (Powley y Carlson 2001; Snyder y Hedli 1996). La formación de estos metabolitos incrementa su reactividad y solubilidad permitiendo su conjugación con diversas moléculas (ej. GSH, sulfatos y ácido glucorónico) lo que reduce su toxicidad y favorece su excreción (Snyder et al. 1993) (Figura 2B).

La toxicidad del benceno está correlacionada con la generación de hidroquinona y su forma oxidada benzoquinona, dos de sus metabolitos más tóxicos (Powley y Carlson 1999). La hidroquinona y la benzoquinona son moléculas altamente reactivas que participan en reacciones de óxido-reducción o redox, las cuales producen ERO (Bolton et al. 2000) como radicales superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el óxido nítrico (NO) (Luo et al. 2008; Snyder y Hedli 1996). La generación de estas especies reactivas de oxígeno induce el establecimiento de estrés oxidante y consecuentemente daño a DNA (Abernethy et al. 2004; Luo et al. 2008), proteínas y lípidos (Gut et al. 1996; Winn 2003). La eficiente inactivación de la hidroquinona y la benzoquinona es un proceso clave en la desintoxicación del benceno. La reducción de benzoquinona a hidroquinona, catalizada por la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), previene la formación de ERO impidiendo la generación de semiquinonas, radicales capaces de unirse covalentemente a componentes celulares (ej. proteínas) (Vasiliou et al. 2006), y evita la muerte celular inducida por la exposición a estos metabolitos (Flescher y Snyder 1995; Smith 1999). De la misma forma, como se mencionó anteriormente, la conjugación de estos

metabolitos con antioxidantes (ej. GSH) y otros compuestos (ácido glucorónico) reduce la formación de ERO y favorece su excreción lo que previene el daño oxidante (Snyder et al. 1993) (Figura 2B).

### **Mecanismo de Defensa**

Existen reportados en la literatura distintos mecanismos por los cuales los contaminantes atmosféricos inducen daño celular (Bernstein et al. 2004) (Figura 3). Si bien cada contaminante se caracteriza por un mecanismo de toxicidad propio, durante el metabolismo de la mayoría de los contaminantes atmosféricos se producen ERO, radicales libres y metabolitos o intermediarios reactivos (Brunekreef y Holgate 2002). La producción excesiva de éstos causa el desbalance entre los sistemas oxidantes/antioxidantes induciendo el establecimiento del estrés oxidante que causa daño a DNA, proteínas y lípidos, en consecuencia todas las enzimas celulares, membranas, ácidos nucleicos y carbohidratos son susceptibles a este daño (Pryor et al. 2006). La habilidad de manejar o contrarrestar el estrés oxidante es una función crítica para el mantenimiento de la integridad celular. Diversos procesos biológicos, como la inflamación y la muerte celular, son controlados por complejas vías de señalización que responden a cambios en el balance redox celular (oxidantes/antioxidantes) (Kooter 2004). Estas vías de señalización forman una red compleja de factores evolutivamente seleccionados con la finalidad de contrarrestar y anular el efecto tóxico del estrés oxidante inducido por la exposición a compuestos oxidantes (Maher y Yamamoto 2010). Estas vías de señalización están reguladas por una gran diversidad de factores de transcripción entre los que se destacan STAT (signal transducers and activators of transcription), AP1 (activator protein 1) (Comhair y Erzurum 2002), NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Haddad 2004), PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferative-activated protein gamma), ATF4 (activating transcription factor 4), p53 (Maher y Yamamoto 2010) y Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Gopalakrishnan y Tony Kong 2008), entre otros.



Modificado de Rubio *et al.* 2009

Figura 3. **Mecanismos de toxicidad de los contaminantes atmosféricos.**

### **Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) y Nrf2**

El uso de sistemas antioxidantes y de reparación es el primer nivel de defensa celular para contrarrestar el daño inducido por el estrés oxidante (Pryor et al. 2006). La rápida inducción y activación de enzimas de fase II, desintoxicantes y antioxidantes no sólo minimiza el daño sino que además favorece la desintoxicación de compuestos oxidantes (Kang et al. 2005). Las reacciones de conjugación catalizadas por las enzimas de desintoxicantes permiten eliminar los metabolitos reactivos o intermediarios y las ERO generadas por reacciones de óxido-reducción durante el metabolismo. De igual forma, los antioxidantes (ej. GSH, flavonoides (ej. quercitina) y ácido ascórbico) y enzimas antioxidantes (ej. supeóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa 1 (Gpx1)) no sólo inhabilitan a las ERO y radicales libres, también estimulan los mecanismos de desintoxicación, ocasionando una disminución en la generación de éstas (Itoh et al. 2004). La regulación de la transcripción de genes que codifican para las enzimas desintoxicantes y la síntesis de antioxidantes y enzimas antioxidantes, en su mayoría, es mediante un

elemento en *cis* localizado en la región promotora de estos genes, conocido como elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés) (Nguyen et al. 2000; Rushmore et al. 1990). La secuencia consenso de ARE (RTGAYNNNGCR, R = purinas, Y = pirimidinas, N = cualquier base) (Rushmore et al. 1991) se encuentra relativamente conservada entre distintos genes que codifican para enzimas desintoxicantes y antioxidantes (Klaassen y Reisman 2010) (Figura 4A). La transcripción de genes que contineen este elemento ARE puede ser activada por diversos compuestos con estructuras químicas variadas, entre los que se encuentran ERO, compuestos electrófilos, antioxidantes fenólicos, hidroperóxidos, quinonas, isotiocianatos, flavonoides, carotenoides, metales pesados y polienos conjugados (Dinkova-Kostova et al. 2001; Nguyen et al. 2003; Prester et al. 1993). Asimismo, se ha reportado que factores físicos como la luz ultravioleta (Gao y Talalay 2004) y el estrés del retículo endoplásmico (Cullinan y Diehl 2006; Cullinan et al. 2003) inducen su activación.

A partir de ensayos de cambios de movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) se identificó que los miembros de la familia cap'n'collar (CNC) de factores de transcripción son capaces de unirse al sitio ARE (Rushmore et al. 1990). Esta familia de factores de transcripción se caracteriza por una estructura típica de un zipper de leucina y por guardar cierta homología con la proteína CNC de *Drosophila* (Itoh et al. 1997). Hasta el momento se han identificado seis miembros en esta familia, Nrf1, Nrf2, Nrf3, p45, BACH1 (breakpoint cluster región/Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) y BACH2 (breakpoint cluster región/Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2) (Maher y Yamamoto 2010). De estos, el factor de transcripción Nrf2 es el principal regulador del mecanismo de defensa celular mediado por ARE (Ishii et al. 2002). A partir de estudios en ratones knock-out para Nrf2 (Hayes et al. 2000; Itoh et al. 1997), se comprobó que Nrf2 no sólo se une a ARE sino que regula la expresión de una gran variedad de genes entre los que se encuentran antioxidantes (ej. GSH, enzimas antioxidantes (ej. catalasa), enzimas de fase I (ej. citocromos P450 (CYP2A4)), fase II (ej. GST (glutathión S transferasas)) y fase III (ej. MRP2, multi-drug resistance-associated protein 2), así como subunidades del proteasoma 26S (ej. subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ), factores del crecimiento (ej. TGF $\alpha$  (transforming growth factor alpha), chaperonas (ej. HSP40) y otros factores de transcripción (PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferative-

actividad de proteínas gamma) (Hayes y McMahon 2009). El mecanismo de activación de la transcripción de genes que contienen ARE a través de Nrf2, está, hasta cierto punto, conservado en la naturaleza. La homología entre el Nrf2 del pez cebra y el humano es únicamente del 49%; empero, la regulación y activación de esta vía así como el sitio de unión al DNA se mantienen relativamente conservados (Maher y Yamamoto 2010). La conservación de Nrf2 nos indica que este mecanismo es una ventaja evolutiva que favorece los procesos de desintoxicación de compuestos oxidantes, tanto endógenos como exógenos, y protege en contra del estrés oxidante inducido por los mismos.

En la proteína Nrf2, tanto en la de ratón (597 amino ácidos) como en la de humano (605 amino ácidos), se distinguen 6 diferentes dominios denominados Neh1-Neh6 (Nrf2-ECH homolog) por su similitud con el homólogo de Nrf2 en pollo, ECH (Kobayashi y Yamamoto 2005). El dominio Neh1 contiene el zipper de leucina que permite su unión al DNA y la formación de heterodímeros con otros factores de transcripción; este dominio está presente en todos los miembros de la familia cap'n'collar (Motohashi et al. 2002). Nrf2 es incapaz de unirse al sitio ARE como homodímero o monómero, por lo que la formación de heterodímeros es un prerequisite para la activación de esta vía (Kobayashi y Yamamoto 2005). El dominio Neh2 se localiza en el extremo N-terminal de la proteína. Este es el sitio de unión a Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), que funciona como inhibidor/represor de Nrf2 regulando su localización así como su degradación (Itoh et al. 1999; Kobayashi et al. 2004; Tong et al. 2006). En el extremo C-terminal de la proteína se encuentra el dominio Neh3. Se ha reportado la unión de la helicasa CHD6 (chromodomain DNA-binding protein 6) a este dominio, por lo que se propone que éste desempeña un papel importante durante la transcripción y se sugiere que pudiera estar involucrado en interacciones proteína-proteína con la maquinaria transcripcional (Nioi et al. 2005). Los dominios Neh4 y Neh5 desempeñan un papel importante en la transactivación de Nrf2. Se ha observado que estos dominios unen cofactores como CBP (CREB (cAMP-response element binding protein-1) binding protein), BRG1 (Brahma-related gene 1) (Katoh et al. 2001; Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009) y p160 Rac 3/SRC3 (Lin et al. 2006). La unión y combinación de estos cofactores ayuda a explicar, hasta cierto grado, la especificidad e intensidad de la activación en distintos tejidos y con diversos inductores (Kobayashi y

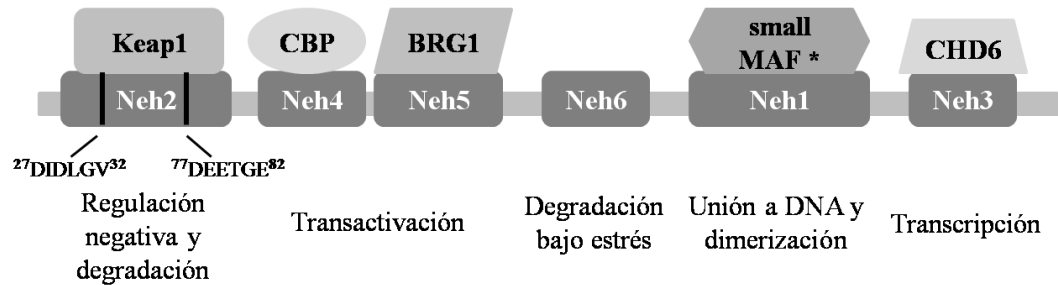
Yamamoto 2005). Finalmente, en estudios recientes se ha propuesto que el dominio Neh6 regula la degradación de Nrf2 durante condiciones de estrés. Este dominio regula la degradación nuclear de Nrf2 y se caracteriza por ser independiente de Keap1 (McMahon et al. 2004) (Figura 4B).

**A.**

mNQO1	GAGTGAGTCGGCAA
rNQO1	CAGTGACTTGGCAA
mGSTA1	TGGTGACAAAGCAA
rGSTA2	TGGTGACAAAGCAA
hGCLM	CAATGACTAAGCAG
hGCLC	CCGTGACTCAGCGC

**ARE secuencia consenso: RTGAYNNNGCR**

**B. Nrf2**



**C. Keap1**

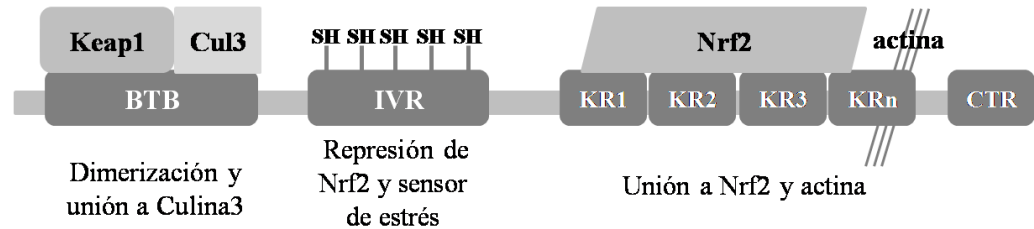


Figura 4. **Elemento de respuesta antioxidante y sus reguladores.** **A.** Secuencia consenso del elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés). mNQO1, secuencia de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 de ratón; rNQO1, secuencia de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 de rata; mGSTA1, secuencia de la glutatión-S-transferasa subunidad 1 de ratón; rGSTA2 secuencia de la glutatión-S-transferasa subunidad 2 de rata; hGCLM, secuencia de la glutamato cisteína ligasa subunidad reguladora en humano; hGCLC, secuencia de la glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica en humano. **B.** Representación esquemática de la estructura de Nrf2. Neh, Nrf2-ECH homolog; CBP, CREB (cAMP-response element binding protein-1) binding protein; BRG1, Brahma-related gene; CHD6, chromodomain DNA-binding protein 6; \*Además de miembros de la familia de small MAFs, Nrf2 puede heterodimerizar con otros factores de transcripción Jun, PMF1 (polyamine modulated factor 1) y ATF4 (activating transcription factor 4), entre otros. **C.** Representación esquemática de la estructura de Keap1. BTB, Broad-complex, Tramtrack, Bric-à-brac; CTR, C-terminal region; IVR, intervening region; KR, residuos Kelch. Modificado de (Rubio et al. 2010).

## **Regulación de Nrf2**

### **Keap1**

En homeostasis, Nrf2 se encuentra en el citoplasma de la célula unido a una proteína citoplasmática llamada Keap1 (Kang et al. 2004). Keap1 es una metaloproteína (que une zinc, de unos 624 amino ácidos aproximadamente) (Dinkova-Kostova et al. 2005) cuya estructura se caracteriza por un dominio BTB (Broad-complex, Tramtrack, Bric-à-brac) de homodimerización y de unión a Culina 3; un dominio IVR (intervening región) que contiene una serie de residuos de cisteína y un dominio DGR (double glycine repeat) que está formado por seis repeticiones de doble glicina (residuos Kelch) y sirve para la unión de Nrf2 así como el anclaje de Keap1 al citoesqueleto de actina (Figura 4C) (Itoh et al. 1999; Li et al. 2004b; Zipper y Mulcahy 2002).

La función de Keap1 como represor o inhibidor de Nrf2 está ampliamente estudiada. Los primeros estudios demostraron que Keap1 se une al citoesqueleto de actina, manteniéndolo en el citoplasma de la célula. La unión de Nrf2 a Keap1 fija su localización citoplasmática y evita su translocación al núcleo (Itoh et al. 1999; Zipper y Mulcahy 2002). La interacción de Nrf2/Keap1 se ha descrito como un mecanismo típico de bisagra-cierre (hinge-and-latch) que consiste en dos sitios de unión, un sitio de alta afinidad (unión fuerte) denominado ETGE y el sitio DGL de baja afinidad (unión débil) en el dominio Neh2 de Nrf2 (Tong et al. 2006). La interacción del sitio de unión ETGE con el dominio DGR de Keap1 es clave para la represión de Nrf2, estudios de mutagénesis dirigida indican que mutaciones en esta región (ETGE) inducen la constitutiva translocación de Nrf2 al núcleo y la sobreexpresión de genes bajo su regulación (Shibata et al. 2008). El papel de Keap1 como represor de Nrf2 no sólo se limita a su capacidad de retener a Nrf2 en el citoplasma. En la última década diversos estudios demostraron que la unión de Nrf2 a Keap1 favorece su degradación por el complejo de proteasoma 26S (Lo y Hannink 2006). Keap1 funciona como adaptador para el complejo Cul3/Rbx1 (cullina 3/ring box 1) E3 ligasa. Homodímeros de Keap1 se une a Cul3 a través del dominio BTB, esta unión permite la formación de complejo Keap1-Cul3/Rbx1 E3 ligasa que recluta a ligasa E2 (Kobayashi et al. 2004). La unión de Nrf2 a Keap1 permite que Keap1 “presente” a Nrf2 a la ligasa E2, induciendo



su ubiquitinación y su subsecuente degradación por el complejo del proteasoma 26S (Cullinan et al. 2004). De esta forma, Keap1 no sólo regula el acceso de Nrf2 al núcleo sino que además controla la acumulación de Nrf2 regulando su degradación.

### **Activación de Nrf2 y regulación de la defensa antioxidante**

En condiciones de homeostasis Nrf2 se localiza en el citoplasma de la célula anclado a Keap1, lo que regula su localización y su acumulación (Lo y Hannink 2006) (Figura 5A). Exposición a especies ERO, oxidantes y electrófilos, entre otros, rompen la interacción Nrf2-Keap1, permitiendo la translocación de Nrf2 al núcleo. Dentro del núcleo, Nrf2 dimeriza con otros factores de transcripción principalmente miembros de la familia de small MAFs (small musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen) (Motohashi et al. 2004). Además, se ha reportado la formación de heterodímeros de Nrf2 con miembros de la familia Jun (Jeyapaul y Jaiswal 2000; Venugopal y Jaiswal 1998), PMF1 (polyamine modulated factor 1) (Wang et al. 2001) y ATF4 (activating transcription factor 4) (He et al. 2001). Estos heterodímeros se unen al sitio ARE, activando la transcripción de genes blanco, entre los que se encuentran enzimas desintoxicantes y antioxidantes (Owuor y Kong 2002) (Figura 5B).

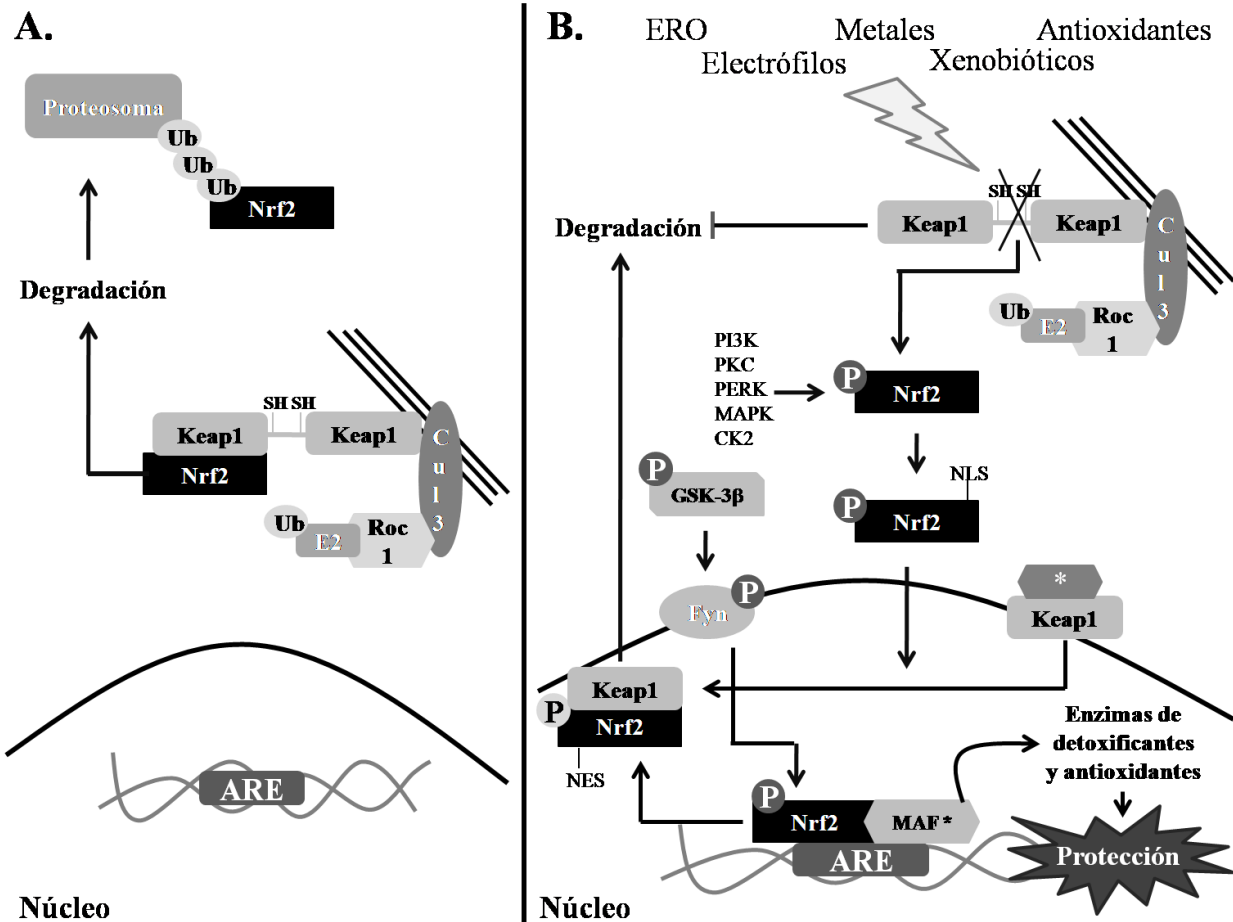


Figura 5. **Regulación de Nrf2 y activación de la respuesta antioxidante.** **A.** En homeostasis, Nrf2 se localiza en el citoplasma de la célula unido a Keap1. Keap1 funciona como represor de Nrf2, evitando su translocación a núcleo y regulando su rápida degradación por el complejo del proteosoma 26S. **B.** Exposición a especies reactivas de oxígeno (ERO) y electrófilos, entre otros, induce la liberación de Nrf2 de Keap1, lo que permite la acumulación de Nrf2 y su translocación a núcleo. En el núcleo, Nrf2 dimeriza con otros factores de transcripción como miembros de la familia small MAF. Estos heterodímeros se unen al sitio ARE, activando la transcripción de genes blanco, como enzimas desintoxicantes y antioxidantes. La rápida inducción de esta respuesta antioxidante inhibe la formación de moléculas tóxicas (ej. radicales) y favorece la desintoxicación de éstas. \* Además de miembros de la familia de small MAFs, Nrf2 puede heterodimerizar con otros factores de transcripción Jun, PMF1 (polyamine modulated factor 1) y ATF4 (activating transcription factor 4), entre otros. NES, señal de exportación nuclear; NLS, señal de localización nuclear; P, fosforilación; Ub, ubiquitina.

La liberación de Nrf2 de Keap1 y su translocación del citoplasma al núcleo son necesarias para la inducción de la transcripción de los genes blanco regulados por Nrf2 bajo condiciones de estrés. Existen distintos modelos propuestos en la literatura que sugieren diversos mecanismos por los cuales se da la acumulación de Nrf2 en núcleo bajo estas condiciones. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes; bajo diferentes condiciones fisiológicas la activación de Nrf2 pudiera ocurrir de distintas formas (Hayes y McMahon 2009).

La inhibición de la interacción de Nrf2-Keap1 resulta esencial para la activación de Nrf2. Existen distintos modelos propuestos que explican el mecanismo por el cual dicha interacción se rompe. Se ha reportado la fosforilación de la serina 40 de Nrf2 por la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) lo que genera cambios conformacionales en Nrf2 lo que rompe la interacción con Keap1 e induce su translocación al núcleo y la activación de la transcripción de genes que contienen ARE (Huang et al. 2000, 2002). De la misma forma, mediante la utilización de inhibidores se ha reportado que Nrf2 es sustrato de otras cinasas, entre las que se encuentran los miembros de la familia MAP (mitogen activated protein kinase) cinasas (MAPK, por sus siglas en inglés) (Xu et al. 2006) JNK (Yuan et al. 2006) y ERK (Papaiahgari et al. 2004), la fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) (Kang et al. 2002), la cinasa de la caseína II (CK2, por sus siglas en inglés) (Apopa et al. 2008; Pi et al. 2007), PERK (PKR-like ER-localized eIF2 $\alpha$  kinase) (Cullinan y Diehl 2006; Cullinan et al. 2003), y GSK-3b (glycogen synthase kinase-3b) (Salazar et al. 2006), entre otras. La fosforilación de Nrf2 por estas cinasas genera su acumulación en núcleo y la activación de la transcripción de genes blanco. Por otro lado, se ha sugerido que dada la estructura de Keap1 este pudiera funcionar como un “sensor” intracelular del estado redox (Dinkova-Kostova et al. 2002). El dominio IVR de Keap1 (humano) contiene 27 cisteínas de las cuales al menos la mitad se consideran altamente reactivas (Hayes y McMahon 2009). La oxidación de estos residuos y/o la formación de aductos con compuestos electrófilos inducen cambios conformacionales en Keap1 reduciendo su capacidad para retener a Nrf2 en el citoplasma (Dinkova-Kostova et al. 2002; Wakabayashi et al. 2004). En la última década se han reportado cuatro cisteínas que participan en la regulación de Keap1. Mutaciones en las cisteínas localizadas en los amino ácidos 23, 273 y 288 (Cys23,

Cys273 y Cys288, por sus siglas en inglés) causan la liberación de Nrf2 y la activación de ARE, induciendo constitutivamente la expresión de sus genes blanco (Dinkova-Kostova et al. 2002; Dinkova-Kostova et al. 2005; Wakabayashi et al. 2004). Sin embargo, también se ha reportado que la modificación de estas cisteínas no es suficiente para la completa liberación Nrf2 (Egglar et al. 2005) y se ha sugerido que los cambios conformacionales en Keap1 generan la inhibición de la degradación de Nrf2 y la activación de la degradación de Keap1 (Zhang et al. 2005). La modificación de la cisteína 151 de Keap1 provoca un cambio conformacional en el dominio BTB lo que modifica la estructura del homodímero de Keap1, favoreciendo su ubiquitinación y la inhibición de la degradación de Nrf2 (Zhang et al. 2005). Al parecer la fosforilación de Nrf2 y la modificación de las cisteínas de Keap1 son mecanismos redundantes para la activación de la transcripción de genes que contienen ARE, sin embargo, estos mecanismos no son excluyentes por lo que pudieran actuar en conjunto para garantizar y potencializar la activación de esta vía bajo distintas condiciones.

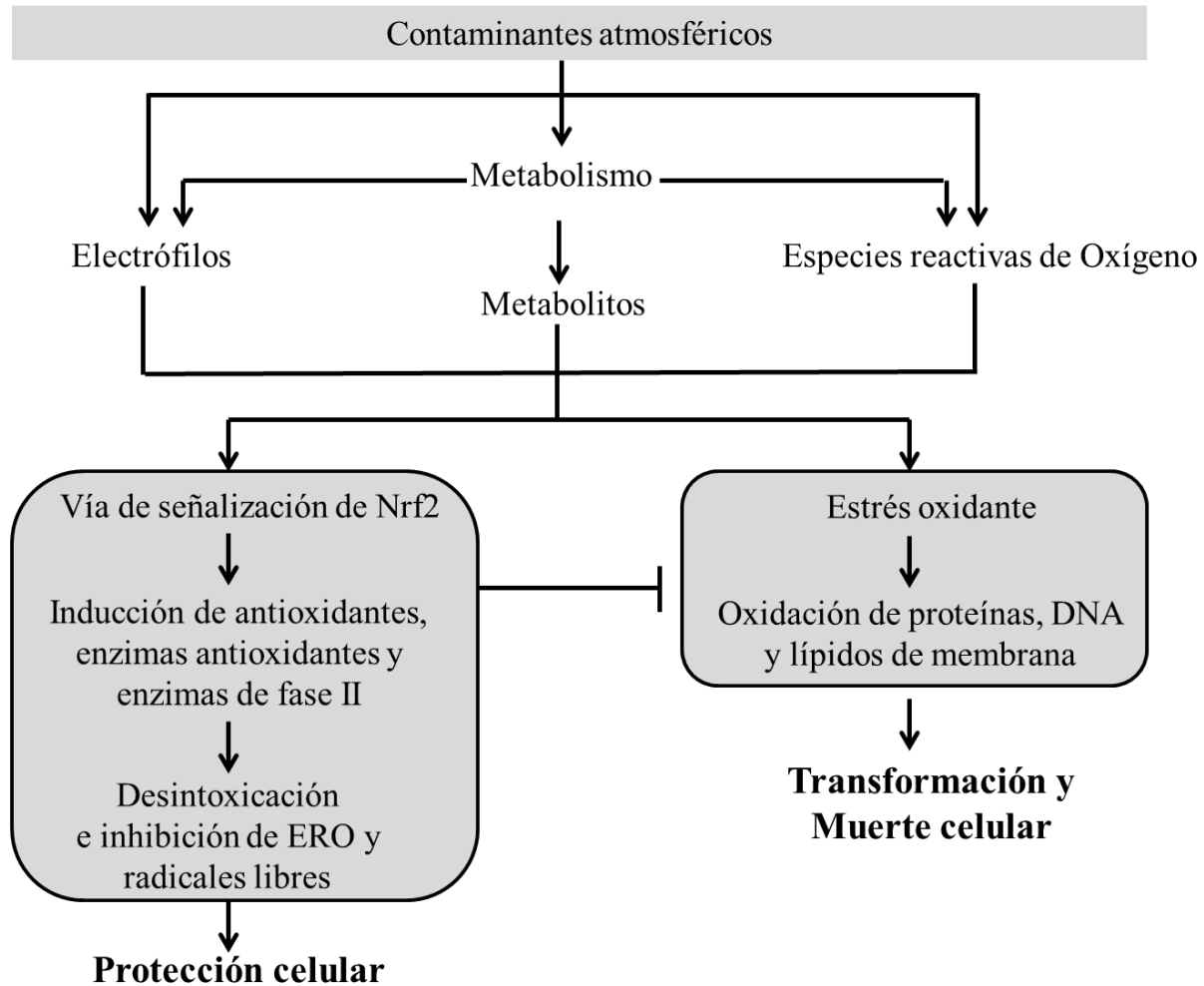
Asimismo, se han descrito en la literatura otros mecanismos que inducen la activación de Nrf2. Nrf2 contiene dos señales de localización nuclear, NLS (por sus siglas en inglés) en el dominio Neh1 (C-terminal) y en el extremo N-terminal (Theodore et al. 2008), así como dos señales de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés) en los dominios Neh1 y Neh5. Aunque no se tiene la certeza del mecanismo involucrado en la regulación de estas señales de localización, se ha propuesto que la señal de exportación nuclear (NES) en el dominio Neh5 de Nrf2 contiene una cisteína reactiva que es oxidada por la exposición a ERO y/o electrófilos, lo que produce la acumulación de Nrf2 en núcleo (Li et al. 2006). Por otro lado, se ha propuesto que Nrf2 es sustrato de la cinasa FYN. La fosforilación de la tirosina 568 de Nrf2 por FYN, favorece la exposición de la señal de exportación nuclear (NES) localizada en el dominio Neh1 de Nrf2, lo que induce su exportación al citoplasma, donde se une a Keap1 para ser degradado (Jain y Jaiswal 2006). Asimismo, mutaciones en las señales de localización nuclear (NLS) evitan la translocación de Nrf2 al núcleo, inhibiendo la activación de la transcripción de genes que contienen ARE. Pese a que el mecanismo que regula la importación/exportación de Nrf2 al núcleo no se ha descrito en detalle, se ha observado la interacción de Nrf2 con las importinas alfa 5 y beta 1, lo que

indica la participación del sistema de importación nuclear (nuclear import receptor system) mediado por heterodímeros de integrina alfa y beta (Theodore et al. 2008). Además de este mecanismo, se ha observado que Nrf2 tiene la capacidad de regular su propia transcripción. La región promotora de Nrf2 contiene dos sitios ARE (Kwak et al. 2002). Distintos grupos han reportado inducción del RNA mensajero de Nrf2 por conocidos activadores de Nrf2 y ARE, como sulforafano (McMahon et al. 2003), 3H-1,2-ditioil-3-tiona (DT3) (Kwak et al. 2002) y dioxinas (Miao et al. 2005). Al ser Keap1 un represor saturable (Kang et al. 2005), la sobreexpresión de Nrf2 permite su acumulación y translocación al núcleo y la activación de la transcripción de genes que contienen ARE.

### **Contaminación atmosférica y Nrf2**

Independientemente del o los mecanismos involucrados en la disociación de Nrf2 de Keap1 y su translocación al núcleo, la exposición a ERO y electrófilos causa la acumulación nuclear de Nrf2, la activación de la transcripción que contienen y la subsecuente inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes (Lee et al. 2004). Este mecanismo de defensa regulado por Nrf2 contrarresta el estrés oxidante, previene daño permanente y favorece la desintoxicación de compuestos tóxicos, evitando la muerte celular (Li et al. 2005). La importancia de Nrf2 en la protección y desintoxicación de contaminantes ambientales está ampliamente estudiada *in vivo*. En estudios en ratones knock-out para Nrf2 se observó que estos animales pierden la capacidad de inducir la transcripción de antioxidantes y enzimas desintoxicantes (Chanas et al. 2002). Además, los ratones que carecen de Nrf2 son más susceptibles a la toxicidad inducida por xenobióticos, como butil-hidroxitolueno (Chan y Kan 1999), acetaminofén (Chan et al. 2001; Enomoto et al. 2001), aflatoxina B1 (Jowsey et al. 2003), metales (Casalino et al. 2007; He et al. 2006; Lewis et al. 2006) y humo de cigarro (Knorr-Wittmann et al. 2005), entre otros. De igual forma, se ha descrito que la exposición a contaminantes atmosféricos como partículas diesel (diesel exhaust particles, DEP por sus siglas en inglés) (Aoki et al. 2001; Araujo et al. 2008; Li et al. 2004a), hidrocarburos como benzo(a)pireno (Garg et al. 2008; Ramos-Gomez et al. 2001) y dioxinas (Ma et al. 2004; Park y Rho 2002) inducen la vía de señalización regulada por Nrf2 (Rubio et al.

2010). Estos resultados confirman que esta vía de señalización desempeña un papel fundamental en la defensa y protección en contra de la exposición a contaminantes atmosféricos (Hayes y McMahon 2009) (Figura 6). La participación de Nrf2 en la defensa en contra de distintos contaminantes atmosféricos se revisó a profundidad en el artículo titulado “Effects of atmospheric pollutants in the Nrf2-survival pathway”, ver anexo 1.



Modificado de Kaspar *et al* 2009.

Figura 6. **Mecanismo de defensa antioxidante regulado por Nrf2 inducido por la exposición a contaminantes atmosféricos.** La activación de Nrf2 y la subsecuente inducción de enzimas de fase II y antioxidantes contrarrestan el estrés oxidante y favorecen la desintoxicación de compuestos tóxicos inducido por la exposición a contaminantes atmosféricos, lo que evita el daño permanente en proteínas, lípidos y DNA, previniendo la transformación y muerte celular. ERO, especies reactivas de oxígeno. (Modificado de (Kaspar et al. 2009).

## Resumen

El establecimiento de un estrés oxidante está descrito como uno de los mecanismos por el cual los contaminantes atmosféricos inducen su toxicidad. La rápida y eficiente inducción de las enzimas desintoxicantes y antioxidantes es el primer nivel de defensa celular para contrarrestar el daño inducido por el estrés oxidante. La regulación e inducción de estas enzimas ocurre a través de un elemento en *cis* en la región promotora de sus genes, llamado elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés). El factor de transcripción Nrf2 es el principal regulador de este elemento y su participación en la protección en contra de la exposición a los contaminantes ambientales está ampliamente comprobada. En este trabajo se explora el papel del factor de transcripción Nrf2 en la defensa contra la exposición a los contaminantes atmosféricos, ozono y una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) (benceno, toluenos, xilenos, etilbenceno y metil tert-butil éter (MTBE)) así como el establecimiento de estrés y daño oxidante generados por dichas exposiciones en el hígado, el pulmón y los riñones de ratones machos CD1. También, mediante la utilización de un modelo *in vitro*, se analiza en detalle la participación de Nrf2 en la protección celular (línea celular Beas-2B) contra la exposición al benceno, específicamente a dos de sus metabolitos más tóxicos y reactivos, la hidroquinona y la benzoquinona. Asimismo, se determina el mecanismo por el cual Nrf2 contrarresta la citotoxicidad inducida por la exposición a estos metabolitos. La exposición a estos compuestos incrementa la acumulación nuclear de Nrf2, activa la transcripción de genes que contienen ARE lo que incrementa la expresión de enzimas desintoxicantes y antioxidantes. El silenciamiento de Nrf2 por siRNA incrementa la susceptibilidad de las células a la toxicidad inducida por la hidroquinona y la benzoquinona. Este incremento en la susceptibilidad está relacionado con la inhibición de las enzimas desintoxicantes y antioxidantes y con una reducción moderada en los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH). Estos resultados indican que Nrf2 es esencial en la defensa celular en contra de la hidroquinona y la benzoquinona.

Por otro lado, los resultados obtenidos en nuestro modelo *in vivo* sugieren que la exposición al ozono y la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) genera estrés oxidante y daño a los lípidos de membrana y al DNA en los tres órganos analizados. Al compararse con los resultados obtenidos en las exposiciones a cada contaminante por separado, se observa que la toxicidad de estos compuestos es órgano-específica. La toxicidad observada en los pulmones de los animales expuestos es consecuencia de la exposición al ozono. Por el contrario, el hígado y los riñones son blanco de la toxicidad inducida por los compuestos orgánicos volátiles (COV). Las distintas exposiciones indujeron la expresión de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 lo que pudiese indicarnos la posible activación de Nrf2. Sin embargo, dadas las condiciones experimentales de nuestro modelo *in vivo* no es posible descartar la participación de otros mecanismos que pudieran contribuir a la inducción de estas enzimas. Por lo tanto, se requiere de experimentos más puntuales para corroborar la activación de Nrf2 por la exposición a estos contaminantes atmosféricos.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan información sobre los mecanismos de toxicidad desencadenados por los contaminantes atmosféricos, ozono y compuestos orgánicos volátiles (COV), en particular los metabolitos del benceno la hidroquinona y la benzoquinona; así como los mecanismos que participan en la defensa celular en contra de éstos. Esta información permite el diseño de estrategias preventivas, seguras y económicas que reduzcan la toxicidad inducida por la exposición a estos contaminantes en poblaciones susceptibles, incluso en poblaciones ocupacionalmente expuestas a compuestos orgánicos como el benceno.



## Abstract

The promotion of oxidative stress has been implicated as a key mechanism by which air pollutants, such as ozone and volatile organic compounds (e.g. benzene) exerts their toxicity. The first level of defense to counteract (minimize) the deleterious effect of oxidative stress is the rapid and efficient induction of antioxidant and detoxifying genes. The regulation of these genes occurs through a *cis*-acting enhancer in their promoter region designated as antioxidant response element (ARE). The transcription factor Nrf2 mediates the expression of antioxidants and detoxifying genes and has been shown to attenuate the toxicity induced by exposure to environmental pollutants. In this study we explore the role of Nrf2 in the protection against the air pollutants ozone and a mixture of volatile organic compounds (benzene, toluene, xylenes, ethylbenzene and methyl tert-butyl ether (MTBE)) as well as the generation of oxidative stress and damage induced in the liver, lung and kidneys of male CD1 mice exposed to these pollutants. Moreover, we used an *in vitro* model to determine the cytoprotective role of Nrf2 in the pulmonary defense against two benzene metabolites, hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. Exposure of the human lung epithelial cells (Beas-2B) to either hydroquinone or benzoquinone induces the activity of an ARE-reporter and elevates the protein levels of Nrf2 and its nuclear accumulation. Furthermore, hydroquinone and benzoquinone exposure also increased protein levels of antioxidants and detoxifying enzymes. Knockdown of Nrf2 increased the susceptibility of Beas-2B cells to hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity and cell death. Increased susceptibility of the Nrf2 knockdown cells is associated with reduced glutathione levels and loss of inducibility of ARE-driven genes. Taken together, the results indicate that Nrf2 is essential in the protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced toxicity.

The exposure of mice to ozone and volatile organic compounds induced oxidative stress and lipid and DNA damage in liver, lungs and kidneys. When compared to single pollutant effects, our results suggest that oxidative stress and damage observed in the lungs of exposed animals is caused mainly by

ozone; while, liver and kidneys were primarily affected by the volatile organic compounds. Exposure to ozone and volatile organic compounds induced up-regulated two well-know Nrf2-effectors, HMOX1 and UGT1A1. These results suggest the activation of the Nrf2 pathway by these air pollutants. However, future studies will be required to fully determine Nrf2 activation and its function in protection against ozone and volatile organic compounds.

The present study investigated the mechanisms of toxicity of air pollutants, ozone and volatile organic compounds, benzene and two of its metabolites, hydroquinone and benzoquinone as well as the defense mechanisms involve in the protection against these xenobiotics. The knowledge and understanding obtained can allow the design of simple and safe strategies to provide protection against the exposure to these pollutants not only in susceptible population but also in occupationally exposed population.

## Antecedentes y planteamiento del problema

La ciudad de México y su zona metropolitana, región denominada como Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), concentra la mayor densidad poblacional y gran parte de la actividad industrial y comercial del país (SEMARNAT 2008). Se estima que las actividades cotidianas de aproximadamente 20 millones de habitantes, 4 millones de vehículos en circulación y más de 36,000 industrias (30% del total nacional) emiten más de 3.3 millones de toneladas de contaminantes atmosféricos al año (SEMARNAT 2008; SETRAVI 2011; SMA 2008; Yip y Madl 2000). La ZMVM está ubicada a 2240 metros sobre el nivel del mar, por lo que su atmósfera contiene 12% menos de oxígeno. Esto produce que la quema de combustibles sea incompleta lo que incrementa la concentración de hidrocarburos y partículas suspendidas emitidas a la atmósfera. Además de presentar alta incidencia de radiación solar, la ZMVM se caracteriza por procesos estacionales con variación de temperatura en superficie y por estar rodeada por cadenas montañosas. Al localizarse en el centro del país, la ZMVM está expuesta a sistemas meteorológicos de alta presión que generan estabilidad atmosférica. Estas características fisiográficas y climatológicas de la región determinan su reducida capacidad para soportar la carga de contaminantes así como la dinámica de los mismos (SMA 2008).

Al estar rodeada por cadenas montañosas la circulación de los vientos en la superficie es limitada, lo que reduce la dispersión de contaminantes atmosféricos e incrementa la concentración de los mismos. Esto genera que la población de la ZMVM esté expuesta a altas concentraciones de contaminantes, como el ozono ( $O_3$ ), los óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ), el monóxido de carbono (CO), los metales pesados (ej. plomo), las partículas suspendidas con un diámetro menor  $10 \mu m$  y  $2.5 \mu m$  ( $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$ , respectivamente) y los compuestos orgánicos volátiles (COV) (Ferm et al. 2006; SMA 2008). En las últimas décadas, se han instrumentado medidas para reducir la emisión y la exposición a estos contaminantes, en especial para disminuir los niveles de ozono (Zavala et al. 2009). Pese a estos esfuerzos, durante 2007, el 61% de los días se superaron los niveles permisibles de ozono (0.1ppm/hora una vez al año) (SEMARNAT 2008) por lo que la población de la ZMVM se encuentra expuesta a este

contaminante de forma recurrente. Por otro lado, en estudios recientes de nuestro laboratorio se reportó que los habitantes de la ZMVM están expuestos diariamente a altos niveles de compuestos orgánicos volátiles (COV) (Tovalin et al. 2006), especialmente de benceno, tolueno, xilenos y metil tert-butil éter (MTBE, por sus siglas en inglés). Actualmente no existe ninguna norma oficial mexicana que regule la concentración de estos contaminantes en aire y únicamente una estación de la “red de monitoreo ambiental” (RAMA) determina las concentraciones de benceno, tolueno y formaldehído (Serrano-Trespacios 2011). De estos compuestos orgánicos volátiles (COV), el benceno está considerado como altamente tóxico y está catalogado como carcinógeno en humanos (EPA 2009; IARC 1997) y la exposición inclusive a bajas concentraciones en aire ( $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) incrementa el riesgo de leucemia (Hrelia et al. 2004).

La capacidad de estos contaminantes atmosféricos para generar daño celular está ampliamente estudiada. Distintos grupos han reportado la correlación entre la exposición al ozono y daño al DNA (Rojas et al. 2000; Valverde et al. 1997), proteínas (Lee et al. 2003b) y lípidos de membrana (Corradi et al. 2002). De igual forma, se ha observado la inducción de daño a DNA (Roma-Torres et al. 2006) y oxidación de proteínas (Coleman et al. 2003; Powley y Carlson 1999) por la exposición a compuestos orgánicos volátiles (COV). Sin embargo, poco se conoce de los mecanismos de defensa que participan en la protección celular en contra de estos compuestos. Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de toxicidad del ozono y de los compuestos orgánicos volátiles (COV) involucra la producción de ERO y radicales libres que conlleva al establecimiento de estrés oxidante (Bocci 2006; Bolton et al. 2000; Nedelcheva et al. 1999; Pryor et al. 1995). El uso de sistemas antioxidantes y enzimas de desintoxicación es el primer nivel de defensa para contrarrestar el daño inducido por el estrés oxidante (Pryor et al. 2006). Este mecanismo de defensa adaptativo está regulado principalmente por el factor de transcripción Nrf2 (Lee et al. 2004). La activación de Nrf2 causa la rápida inducción de las enzimas de fase II y antioxidantes, que inhibe la generación de ERO y favorece la desintoxicación de radicales libres y metabolitos tóxicos, evitando el daño oxidante permanente y la muerte celular (Li et al. 2005). Si bien el papel de Nrf2 en la protección celular contra la exposición a hidrocarburos poliaromáticos y materia

particulada (partículas suspendidas) está ampliamente comprobado (Rubio et al. 2010) poco se conoce del papel que desempeña en el mecanismo de defensa en contra de otros contaminantes atmosféricos, como el ozono y los compuestos orgánicos volátiles (COV). Por ende, en este trabajo se evalúa la capacidad del ozono y los compuestos orgánicos volátiles (COV), en específico el benceno, para inducir tanto estrés oxidante como la activación de la vía de Nrf2, y su papel en la protección celular en contra de estos contaminantes atmosféricos.

## **Hipótesis**

Proponemos que la exposición al ozono y/o los a compuestos orgánicos volátiles (COV), benceno, tolueno, xilenos, etilbenceno y metil tert-butyl éter (MTBE), genera estrés oxidante, la activación de la vía de señalización regulada por Nrf2 y un incremento en la expresión de enzimas desintoxicantes y antioxidantes, protegiendo al organismo en contra de la toxicidad de estos contaminantes.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar el papel del factor de transcripción Nrf2 en el mecanismo de protección celular ante la exposición al ozono y/o los compuestos orgánicos volátiles (COV).

### **Objetivos específicos**

Con la finalidad de estudiar el papel del factor transcripción Nrf2 en el mecanismo de defensa en contra de la exposición al ozono y/o los compuestos orgánicos volátiles (COV), se siguieron dos estrategias, una *in vitro* y una *in vivo*, cada una de ellas con objetivos en específicos.

### **Estudio *in vitro***

El objetivo inicial de este trabajo fue utilizar el ozono y una mezcla de compuestos orgánicos volátiles representativa de las condiciones de contaminación atmosférica de la Zona Metropolitana del Valle de Mexico (ZMVM), sin embargo, dada una serie de limitaciones metodológicas, entre las que se encuentra la volatilidad de los compuestos orgánicos a 37°C (temperatura de los cultivos celulares) y su baja solubilidad, se decidió utilizar como modelo de estos contaminantes al benceno. Dado que la toxicidad del benceno está mediada, principalmente por la generación de los metabolitos reactivos hidroquinona (HQ) y benzoquinona (BQ) estos compuestos fueron utilizados (Powley y Carlson 2001). Este estudio se realizó empleando células humanas de pulmón no transformadas (Beas-2B).

Los objetivos específicos de este estudio fueron los siguientes:

- Evaluar la capacidad de la hidroquinona y la benzoquinona para activar el elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés).
- Establecer la inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes por la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona.
- Evaluar la generación de estrés oxidante por la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona.
- Determinar la activación de Nrf2 (translocación a núcleo) por la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona.
- Elucidar el papel de Nrf2 en la protección celular en respuesta a la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona.

### **Estudio *in vivo***

- Cuantificar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD) inducidos por la exposición vía inhalatoria al ozono y/o una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (benceno, tolueno, xilenos, etilbenceno y metil tert-butil éter (MTBE) en hígado, riñón y pulmón de ratones CD1.
- Determinar los cambios en los niveles de mRNA y proteína de enzimas desintoxicantes y antioxidantes bajo la regulación de Nrf2 en cada órgano, como consecuencia de la exposición al ozono y/o una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (benceno, tolueno, xilenos, etilbenceno y metil-tert-butiléter (MTBE).
- Evaluar el daño al DNA, proteínas y lípidos de membrana en los órganos referidos, como consecuencia de la exposición al ozono y/o una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (benceno, tolueno, xilenos, etilbenceno y metil-tert-butiléter (MTBE).

## **Materiales y métodos**

Con la finalidad de estudiar en detalle el papel de Nrf2 en respuesta a la exposición al ozono y/o a los compuestos orgánicos volátiles (COV), en particular el benceno, se trabajaron dos modelos, un modelo *in vitro* y otro *in vivo*. A continuación se presenta la estrategia que se siguió en cada uno de estos modelos para cumplir con los objetivos antes planteados. Los materiales y métodos de cada uno de ellos están descritos en detalle en la sección de resultados, en cada uno de los artículos correspondientes.

### **Materiales y métodos: estudio *in vitro***

La estrategia inicial de este trabajo fue exponer cultivos celulares al ozono y una mezcla de compuestos orgánicos volátiles representativa de las condiciones de contaminación atmosférica de la ZMVM. Sin embargo, dada una serie de limitaciones metodológicas, entre las que se encuentra la elevada volatilidad de los compuestos orgánicos a 37°C (temperatura de los cultivos celulares) y su baja solubilidad, se decidió utilizar otro enfoque. De los compuestos orgánicos volátiles (COV) reportados en la literatura a los que la población de la ZMVM está expuesta a altas concentraciones (Tovalin et al. 2006), el benceno representa un problema de salud pública (Han y Naeher 2006). El benceno es carcinógeno en humanos (IARC 1997) y su toxicidad está mediada, en gran parte, por la generación de los metabolitos reactivos la hidroquinona (HQ) y la benzoquinona (BQ) (Powley y Carlson 2001). Dado que estos metabolitos son solubles en el medio de cultivo y son más estables que el benceno se decidió utilizarlos como modelo de este contaminante atmosférico.

### **Estrategia**

El pulmón es el sitio de contacto de los contaminantes inhalados. En la última década se ha descrito en la literatura la capacidad de las células pulmonares para metabolizar benceno a la hidroquinona y la benzoquinona (Powley y Carlson 2000, 2001; Sheets et al. 2004). Tomando en cuenta esto, se utilizó



como modelo para este estudio células del epitelio bronquial humano (Beas-2B). Para determinar la capacidad de la hidroquinona y la benzoquinona para inducir la vía de señalización regulada por Nrf2 se siguió siguiente estrategia (figura 7).

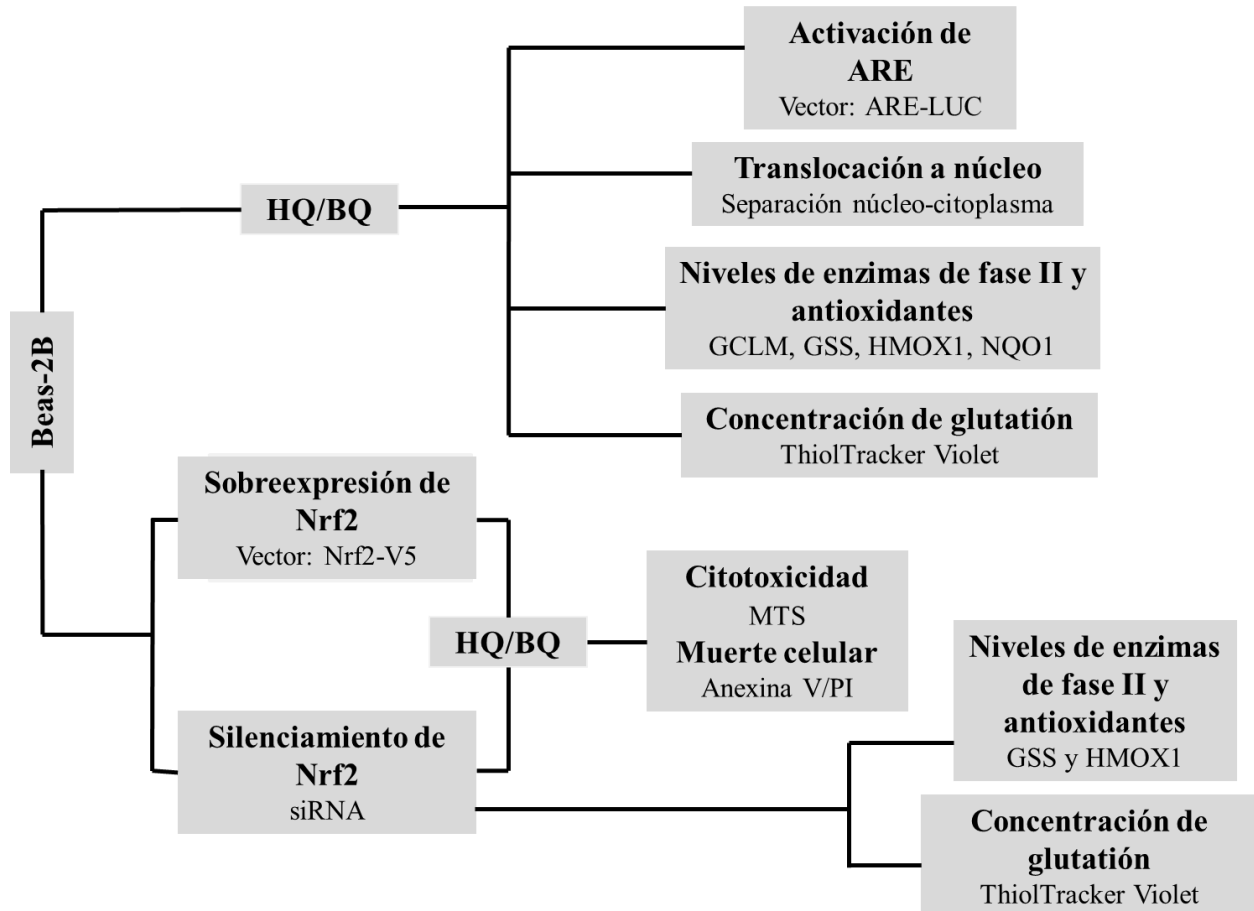


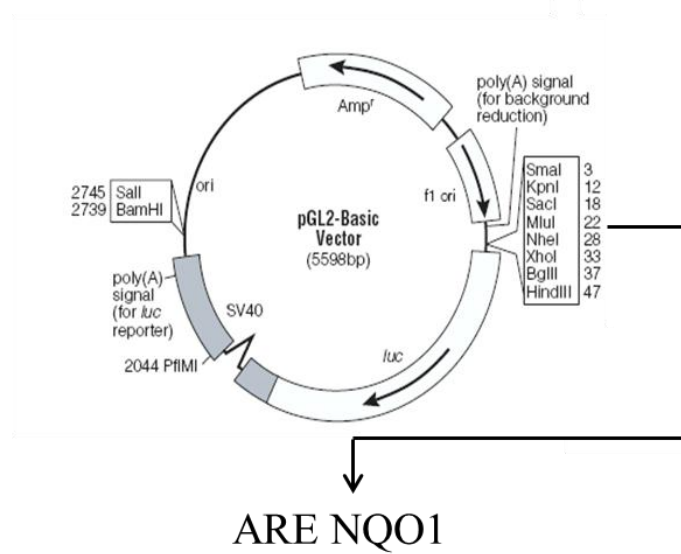
Figura 7. Estrategia de trabajo del estudio *in vitro*. HQ, hidroquinona; BQ, benzoquinona; GSS, glutatión sintetasa; (GCLM) glutamato cisteína ligasa subunidad reguladora; HMOX1, hemooxigenasa 1; NQO1, NAD(P)H:quinona óxidoreductasa 1; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphenyl)-2H-tetrazolium); PI, ioduro de propodio; siRNA, short interference RNA.

### Activación de la transcripción del elemento de respuesta antioxidante (ARE)

Para determinar la activación de la transcripción de los genes que continen el elemento de respuesta antioxidante (ARE) por la exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona se utilizó el vector reportero pGL2B-NQO1-ARE-LUC (denominado ARE-LUC) (Dhakshinamoorthy y Jaiswal 2000). Este vector

contiene el elemento ARE de la enzima NQO1 (NAD(P)H:quinona óxidoreductasa 1) en la región promotora regulando la expresión de la enzima luciferasa de luciérnaga (Dhakshinamoorthy y Jaiswal 2000) (figura 8A). La utilización de este vector con el gen reportero permitió evaluar la respuesta de ARE ante la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona. Las células Beas-2B se transfectaron con este vector reportero empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation) y se trataron con distintas concentraciones de hidroquinona o benzoquinona. Después del tratamiento, la actividad de la enzima luciferasa se determinó usando el sistema de Promega Corporation “Bright-Gluciferase assay”.

**A.**



5'-CAG TCA CAG TGA CTC AGC AGA ATC T-3'  
3'-GTC AGC GTC ACT GAG TCG TCT TAG A-5'

**B.**

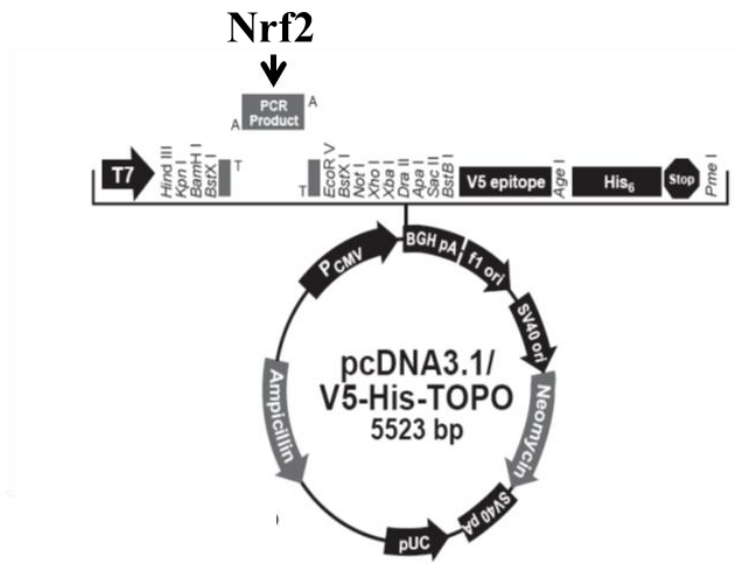


Figura 8. **Estructura de los vectores utilizados en el estudio *in vitro*.** **A.** Estructura del vector ARE-LUC. Este vector se utilizó para establecer la activación de la transcripción de genes que contienen el elemento de respuesta (ARE) por la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona. ARE NQO1, elemento de respuesta antioxidante de la enzima NQO1 (NAD(P)H:quinona óxidoreductasa 1). **B.** Estructura del vector Nrf2-V5. Este vector se utilizó para la sobreexpresión de Nrf2 en las células Beas-2B.

### **Translocación nuclear de Nrf2 e inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes**

Para evaluar la activación de Nrf2 por la exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona se determinó su acumulación nuclear y la inducción de algunas enzimas desintoxicantes y antioxidantes bajo su regulación. Para determinar la translocación de Nrf2, se aislaron los núcleos de las células Beas-2B tratadas con la hidroquinona o la benzoquinona (Kit: NE-PER System, Pierce Chemical Co). A partir de inmunoblots se determinaron los niveles de Nrf2 en ambas fracciones, nuclear y citoplasmática. Por otro lado, las células Beas-2B se trataron con hidroquinona o benzoquinona y se realizaron los inmunoblots correspondientes para determinar los cambios en los niveles de las siguientes proteínas: glutatión sintetasa (GSS), glutamato cisteína ligasa subunidad reguladora (GCLM), la hemo oxigenasa 1 (HMOX1) y la enzima NAD(P)H:quinonaóxidoreductasa 1(NQO1).

### **Nrf2 y su papel en la citotoxicidad y muerte celular inducidas por la exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona**

Para elucidar el papel de Nrf2 en el mecanismo de defensa en contra de la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona se utilizaron dos estrategias para regular los niveles de Nrf2 intracelular: su sobreexpresión y su silenciamiento (figura 7). El vector pcDNA-Nrf2-V5 (denominado Nrf2-V5)(figura 8B) contiene la secuencia del marco abierto de lectura de Nrf2 regulado por el promotor del citomegalovirus (CMV), lo que permite la expresión constitutiva de Nrf2 (Jain et al. 2005). Las células Beas-2B se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation) y la sobreexpresión de Nrf2 se determinó por inmunoblotting. Por otro lado, para conseguir el efecto contrario, es decir reducir los niveles de Nrf2, se empleó RNA de interferencia (Lee et al. 2008). Las células Beas-2B se transfectaron utilizando Dharmafect1 (Dharmacon) y los niveles de Nrf2 se corroboraron por inmunoblotting.

Tanto las células que sobreexpresan Nrf2 así como las que tienen reducidos niveles de Nrf2 (knockdown) fueron tratadas con distintas concentraciones de hidroquinona o benzoquinona. Posteriormente, se analizó la citotoxicidad y muerte celular inducida por los tratamientos. Para evaluar la

citotoxicidad inducida se utilizó la oxidación de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphenyl)-2H-tetrazolium) como indicador de viabilidad (Promega Corporation). Para evaluar la muerte celular inducida, las células se marcaron para anexina V/ioduro de propidio (sobrexpresión) y anexina V/7-AAD (knockdown) y se cuantificaron por citometría de flujo. Estos experimentos permitieron conocer la importancia de Nrf2 en la protección celular en contra de la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona.

### **Mecanismo de defensa regulado por Nrf2**

En la literatura está reportado que la exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona induce la generación de ERO lo que provoca la reducción en los niveles de GSH intracelular (Luo et al. 2008; Snyder y Hedli 1996). Para corroborar la capacidad de la hidroquinona y la benzoquinona para reducir los niveles de GSH en las células Beas-2B, éstas se trataron con distintas concentraciones de hidroquinona o benzoquinona y se cuantificaron los niveles de GSH intracelular utilizando el compuesto Thiol Tracker Violet (Invitrogen Corporation). Al unirse al GSH, este compuesto produce fluorescencia que es analizada en un fluorómetro. La fluorescencia obtenida correlaciona con los niveles de GSH. De igual forma, se determinaron los niveles de GSH intracelular en células knockdown para Nrf2. Por otra parte, se determinaron los niveles de enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 en las células knockdown tratadas con la hidroquinona y la benzoquinona. La determinación de los niveles de GSH así como la inducción de enzimas antioxidantes en las células knockdown para Nrf2 permitieron elucidar el mecanismo por el cual Nrf2 protege en contra de la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona.

## **Resultados: estudio *in vitro***

### **Artículo 1**

“Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone- induced cytotoxicity”

Rubio V., Zhang J., Valverde M., Shi ZZ. y E. Rojas. 2011

Toxicology in vitro 2011, 25(2):521-529.

En este artículo se presentan los datos obtenidos en el modelo *in vitro* en el que se evaluó el papel del factor de transcripción Nrf2 ante la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona en la línea celular humana del epitelio bronquial, Beas-2B. Los resultados obtenidos son los siguientes:

- La exposición a la hidroquinona y la benzoquinona causan la acumulación nuclear de Nrf2, activan la transcripción de genes que contiene el elemento de respuesta antioxidante (ARE), y la subsecuente inducción de las enzimas desintoxicantes y antioxidantes, NQO1, GSS, GCLM y HMOX1.
- La exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona reduce los niveles de glutatión (GSH) intracelular.
- La sobreexpresión de Nrf2 protege en contra de la citotoxicidad y la muerte celular inducidas por la exposición a la hidroquinona y la benzoquinona. Por el contrario, la reducción de los niveles de Nrf2 por RNA de interferencia (siRNA, short interference RNA) exagera la toxicidad de dichos compuestos.
- Las células knockdown para Nrf2 tienen reducidos niveles de glutatión (GSH) intracelular y pierden la capacidad de inducir las enzimas GSS y HMOX1.

## Materiales y métodos: estudio *in vivo*

Con la finalidad de establecer la capacidad del ozono y/o una mezcla de compuestos orgánicos volátiles para inducir el establecimiento de estrés y daño oxidante y la subsecuente activación de la vía de señalización regulada por Nrf2 *in vivo* se siguió la siguiente estrategia (figura 9).

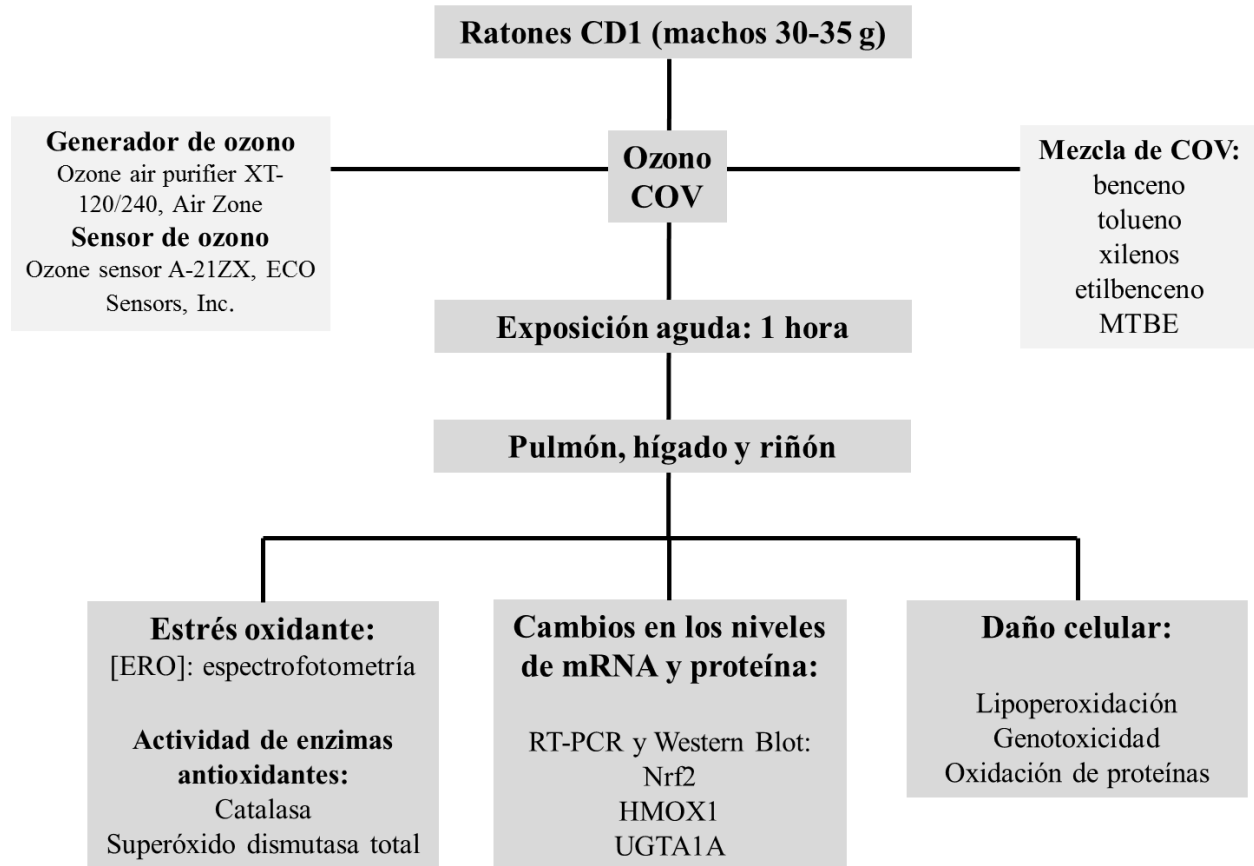


Figura 9. **Estrategia de trabajo del estudio *in vivo***. COV, compuestos orgánicos volátiles; [ERO], concentración intracelular de las especies reactivas de oxígeno; MTBE, metiltert-butil éter; HMOX1, hemooxigenasa 1; UGT1A1, UDP-glucuronosiltransferasa 1 A1.

## Exposición

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos CD1 de aproximadamente 45 días de edad y con un peso de entre 30 y 35 gramos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $17 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad relativa ( $50 \pm 5\%$ ), con ciclos de 12 h de luz-obscuridad y con alimento y agua *ad libitum*.

*libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara de exposición acrílica (figura10) (5 mm de grosor, acrílico transparente). Esta cámara de exposición cuenta con entrada y salida de aire, conexión eléctrica y dos compartimentos independientes que permiten mantener a los animales aislados de los instrumentos (generador de ozono y ozonómetro). Los animales se dividieron de manera aleatoria en cuatro grupos de tres animales: grupo 1, control, expuesto a agua deionizada; grupo 2, animales expuestos al ozono; grupo 3, animales expuestos a una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV); y grupo 4, animales expuestos al ozono y a una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV). Para la producción de ozono se utilizó un generador de ozono (Ozone air purifier XT-120/240) y su concentración fue monitoreada durante todo el experimento mediante un ozonómetro (Ozone sensor Model a-21ZX). Por otro lado, para simular, hasta cierto grado, las condiciones a las que está expuesta la población de la ZMVM (Tovalín et al. 2006), se utilizó una mezcla de compuestos orgánicos volátiles que contiene 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de benceno, tolueno, una mezcla de isómeros de xileno, etilbenceno y metiltert-butil éter (MTBE)(BTEX/MTBE, Supelco Inc).

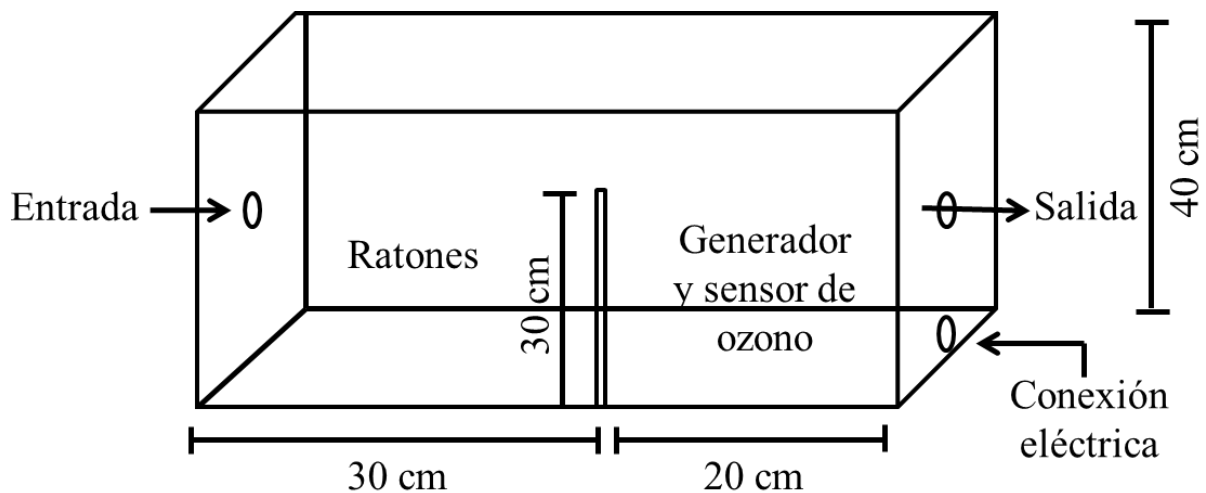


Figura 10. **Cámara de exposición.** La cámara de exposición (acrílico transparente, 5 mm de grosor) cuenta con dos compartimientos aislados que permite mantener a los animales aislados de los instrumentos, entrada y salida de aire y conexión eléctrica.



La tabla 1 presenta las concentraciones utilizadas en cada una de las exposiciones. Los animales en el grupo control inhalaban vapores de agua desionizada durante el mismo periodo de tiempo. Las concentraciones de ozono empleadas corresponden a la norma horaria establecida por la Secretaría de Salud mexicana (0.1 ppm) (SSA 1993) y al límite de emergencia máximo (EEL, emergency exposure limit por sus siglas en inglés) establecido por el Comité de Toxicología Estados Unidos de América (1ppm, (Committee-of-Toxicology 2000)). De los compuestos orgánicos volátiles (COV) en la mezcla usada, el benceno está catalogado como el de mayor toxicidad por lo que se decidió trabajar con la concentración máxima permisible para una exposición aguda (OSHA 2009) de benceno (5 ppm). La mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) fue volatilizada e inyectada directamente en la cámara de exposición. Aire filtrado se inyectó constantemente en la cámara de exposición, para garantizar la homogénea distribución de los contaminantes. Para evaluar los efectos agudos de estos contaminantes, las exposiciones tuvieron una duración de una hora, inmediatamente después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y el hígado, los pulmones y los riñones fueron colectados.

Tabla 1. **Diseño experimental.**

<b>Grupo</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Concentración</b>	<b>Normatividad</b>
Control	Agua desionizada	—	—
Ozono	Ozono	0.11 ± 0.02 ppm 1 ± 0.12 ppm	NOM -020-SSA1-1993 Committee of Toxicology 2000
COV	Mezcla de COV	5 ppm	OSHA 2009
Ozono + COV	Ozono + mezcla de COV	1 ± 0.12 ppm + 5 ppm	Committee of Toxicology 2000 OSHA 2009

Nota: COV, compuestos orgánicos volátiles; mezcla de COV contiene benceno, tolueno, isómeros de xileno, etilbenceno y metiltert-butil éter (MTBE).

### **Estrés oxidante y daño a DNA, proteínas y lípidos de membrana**

Para determinar el estrés oxidante como consecuencia de las exposiciones, se utilizaron distintos indicadores para evaluar su establecimiento. Por un lado, la generación de ERO intracelular se cuantificó

directamente mediante la oxidación de dihidrorodamina123 a rodamina123. Por otro lado, se evaluaron los cambios en la actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa, enzimas antioxidantes que responden al estrés oxidante. De igual forma, se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) y la formación de carbonilos como indicadores de daño oxidante a lípidos de membrana y a proteínas. Aunado a esto, se evaluó el daño a DNA inducido por las exposiciones por el ensayo Cometa. Para mayor detalle de los protocolos que se utilizaron referirse al artículo correspondiente.

### **Cambios en los niveles de expresión de enzimas desintoxicantes y antioxidantes**

Finalmente, como indicador de la activación de la vía de señalización de Nrf2 se utilizaron los cambios en los niveles de mRNA y proteína de dos enzimas que están bajo su regulación, la UDP-glucuronosiltransferasa 1 A1 (UGT1A1) y la hemo oxigenasa 1 (HMOX1). La UGT1A1 cataliza la conjugación de ácido glucorónico con distintos compuestos, como los metabolitos intermediarios del metabolismo de los compuestos orgánicos volátiles (COV) (Luo et al. 2008; Smith 1999; Trush et al. 1996), lo que favorece su excreción incrementando su solubilidad. De forma similar, la HMOX1 es una enzima antioxidante que responde al estrés oxidante y desempeña un papel fundamental contrarrestando las ERO y los radicales libres (Prawan et al. 2005).

## **Resultados: Estudio *in vivo***

### **Artículo 2**

“Oxidative stress induced by inhalation of a mixture of ozone and volatile organic compounds”

Rubio V., Valverde M. y E. Rojas. 2011

Artículo sometido a: Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology.

En este artículo se presentan los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* en el que se evaluó la generación de estrés y daño oxidante como consecuencia de la exposición al ozono, a los compuestos orgánicos volátiles (COV, benceno, tolueno, isómeros de xileno, etilbenceno y MTBE) y a una mezcla de ozono y estos compuestos orgánicos volátiles (COV) en el hígado, los pulmones y los riñones de ratones machos CD1. De igual forma, se determinaron los cambios en los niveles de expresión de las enzimas HMOX1 y UGT1A1, como indicadores de la posible activación de la vía de señalización regulada por Nrf2. En resumen, estos son los resultados obtenidos:

- La exposición a la mezcla de ozono y los compuestos orgánicos volátiles induce ERO, cambios en la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) y daño a lípidos de membrana (lipoperoxidación) y DNA en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos. Al ser comparados con los resultados obtenidos en las exposiciones a un sólo contaminante, ozono o los compuestos orgánicos volátiles (COV), los resultados indican que el estrés oxidante y daño a lípidos de membrana (lipoperoxidación) y DNA en el pulmón de los animales expuestos a la mezcla de estos contaminantes es generado principalmente por el ozono; contrario a lo observado en el hígado y los riñones, en los cuales la toxicidad inducida es mediada inicialmente por los compuestos orgánicos volátiles (COV).
- Los resultados muestran efectos tóxicos del ozono en el hígado y los riñones de los animales expuestos a este contaminante.

- Además, en el hígado y los riñones de los animales expuestos a la mezcla de ozono y compuestos orgánicos volátiles (COV), se observa mayor daño a lípidos de membrana (lipoperoxidación) y DNA que en los órganos de los animales expuestos únicamente a los compuestos orgánicos volátiles (COV), lo que pudiera indicar, hasta cierto grado, una sinergia entre el ozono y los compuestos orgánicos volátiles (COV).
- La exposición a la mezcla de ozono y a los compuestos orgánicos volátiles (COV) induce incrementos en los niveles de las proteínas HMOX1 y UGT1A1, en el hígado y los pulmones de los animales expuestos.

## **Resultados: exposición a 0.11 ppm de ozono**

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos a 0.11 ppm de ozono durante una hora. Esta concentración representa el límite máximo permisible de ozono (ppm/hora una vez al año) (SSA 1993) y nos permitió explorar los efectos del ozono en bajas concentraciones. Estos resultados son parte de un tercer manuscrito que se encuentra en fase de preparación.

### **Establecimiento de estrés oxidante**

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para la generación de ERO y los cambios en la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD), en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos a 0.11 ppm de ozono durante 1 hora.

**Tabla 2.** Producción de ERO y cambios en la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa en el hígado, pulmón y riñón de ratones expuestos a 0.11 ppm de ozono.

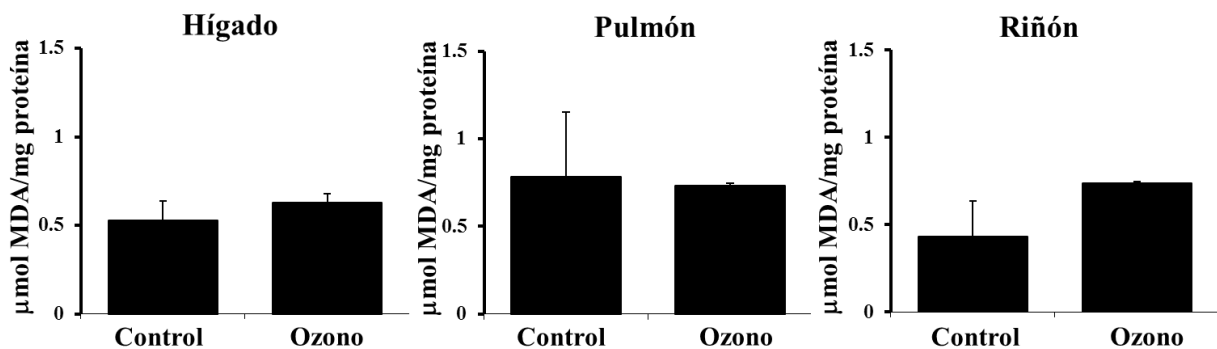
Órgano	ERO ( $\mu\text{g}$ rodamina/ g proteína)	SOD (U/mg proteína)	Catalasa (mK15 s/mg proteína)
<b>Hígado</b>			
Control	$0.64 \pm 0.25$	$6.91 \pm 0.16$	$2.31 \pm 0.03$
Ozono	$0.49 \pm 0.18$	$6.99 \pm 0.42$	$4.3 \pm 0.19^{**}$
<b>Pulmón</b>			
Control	$0.14 \pm 0.02$	$23.85 \pm 1.35$	$3.35 \pm 0.007$
Ozono	$0.18 \pm 0.03$	$45.57 \pm 3.56^{**}$	$5.49 \pm 0.018^{**}$
<b>Riñón</b>			
Control	$0.45 \pm 0.19$	$6.5 \pm 0.21$	$2.53 \pm 0.012$
Ozono	$0.53 \pm 0.16$	$8.62 \pm 0.42^*$	$2.53 \pm 0.024$

Prueba de t de Student \*p < 0.05 \*\*p < 0.01 (media  $\pm$  EE; n=3). Los animales fueron expuestos a  $0.11 \pm 0.02$  ppm de ozono durante 1 h. Los animales en el grupo control estuvieron expuestos a agua desionizada por el mismo tiempo. ERO, especies reactivas de oxígeno; ppm, partes por millón; SOD, superóxido dismutasa total; U, unidad enzimática.

### **Daño a lípidos de membrana y DNA**

Se evaluó el daño a lípidos de membrana (lipoperoxidación) y a DNA por la exposición aguda al ozono en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos. La figura 11 muestra los resultados obtenidos.

**A.**



**B.**

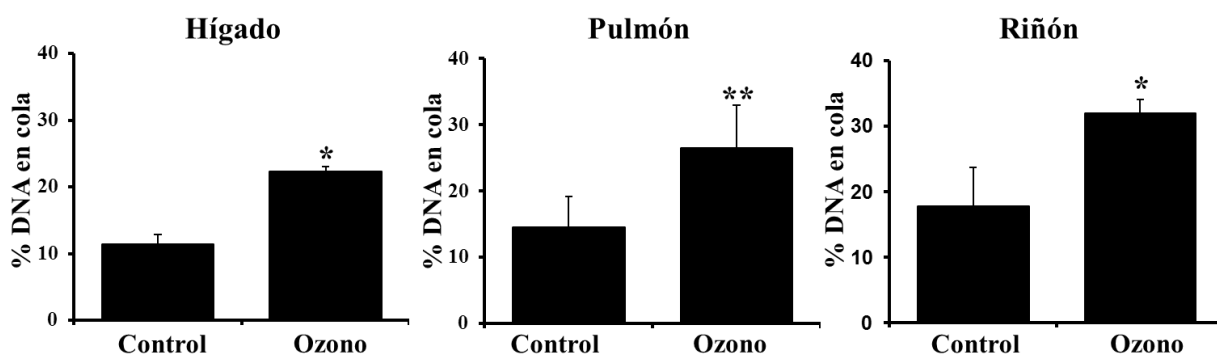


Figura 11. Daño a lípidos de membrana (liperoxidación) y DNA en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos a 0.11 ppm de ozono durante 1 h. **A.** Daño a lípidos de membrana (liperoxidación). La concentración de malondialdehído (MDA) se utilizó como indicador de liperoxidación. **B.** Daño a DNA. El daño a DNA inducido por la exposición al ozono se determinó por el ensayo Cometa. El parámetro que se presenta en estas graficas es el porcentaje (%) de DNA en la cola del cometa. Prueba de t de Student \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  (media  $\pm$  DE;  $n=3$ ).

### Cambios en los niveles de HMOX1 y UGT1A1

Para evaluar la posible activación de la vía de señalización regulada por Nrf2, se utilizaron como indicadores los cambios en los niveles de RNA mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés) y proteína de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 que están bajo su regulación. De igual forma, para evaluar la acumulación de Nrf2 por la exposición, los cambios en sus niveles también se cuantificaron. La figura 12 muestra los resultados obtenidos.

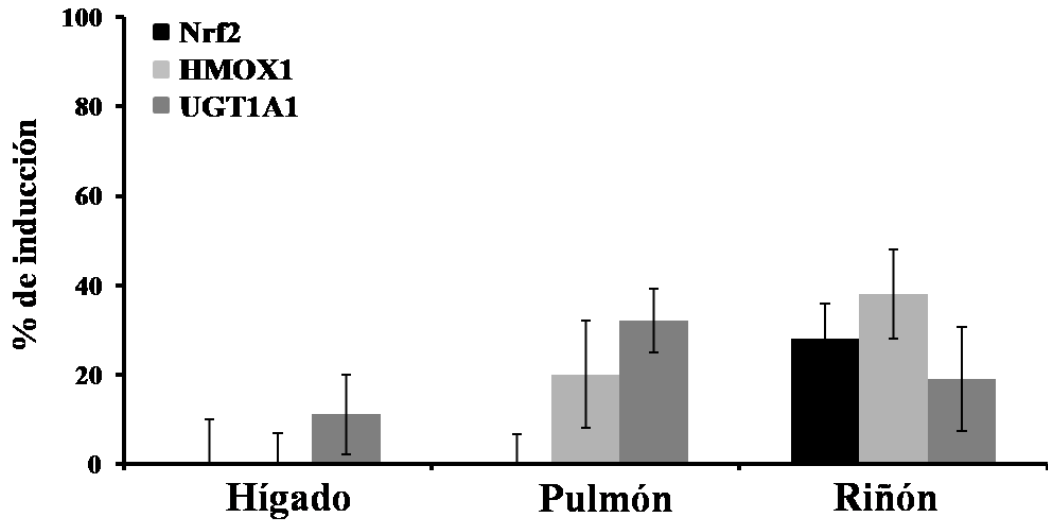
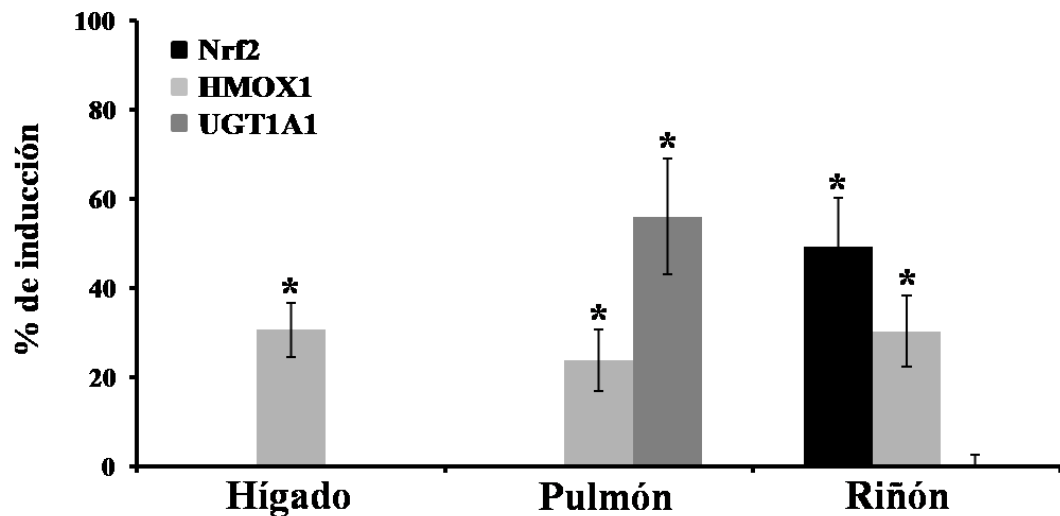
**A.****B.**

Figura 12. Cambios en los niveles de mRNA y proteína de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 inducidos por la exposición a 0.11 ppm de ozono. **A.** Cambios en los niveles de mRNA (RNA mensajero). Los cambios en la concentración de mRNA de estas enzimas se determinaron por RT-PCR. Como control interno se utilizó el gen L32 y los datos se normalizaron con respecto al control (animales que inhalaban agua desionizada por 1 h). **B.** Cambios en la concentración de estas proteínas. La concentración de estas proteínas se determinó por inmunoblotting (Western blot). Como control interno se utilizó la  $\beta$ -actina y los datos se presentan normalizados con respecto al control. †En ambos casos, los resultados fueron analizados utilizando el programa de cómputo EDAS 290 (Eastman Kodak Co.), el cual permitió cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas. Prueba de t de Student \* $p < 0.05$  (media  $\pm$  DE; n=3). HMOX1, hemo oxigenasa 1; UGT1A1, UDP-glucuronosil transferasa 1.



## Resultados: exposición a 5 ppm de compuestos orgánicos volátiles

### Daño a DNA

Los resultados que se presentan a continuación proveen información adicional que permite entender el efecto de la exposición a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV). Además del daño a lípidos de membrana, también se evaluó el daño a DNA por la exposición aguda a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos. La figura 13 muestra los resultados obtenidos con respecto al daño inducido al DNA por la exposición a 5 ppm de una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV).

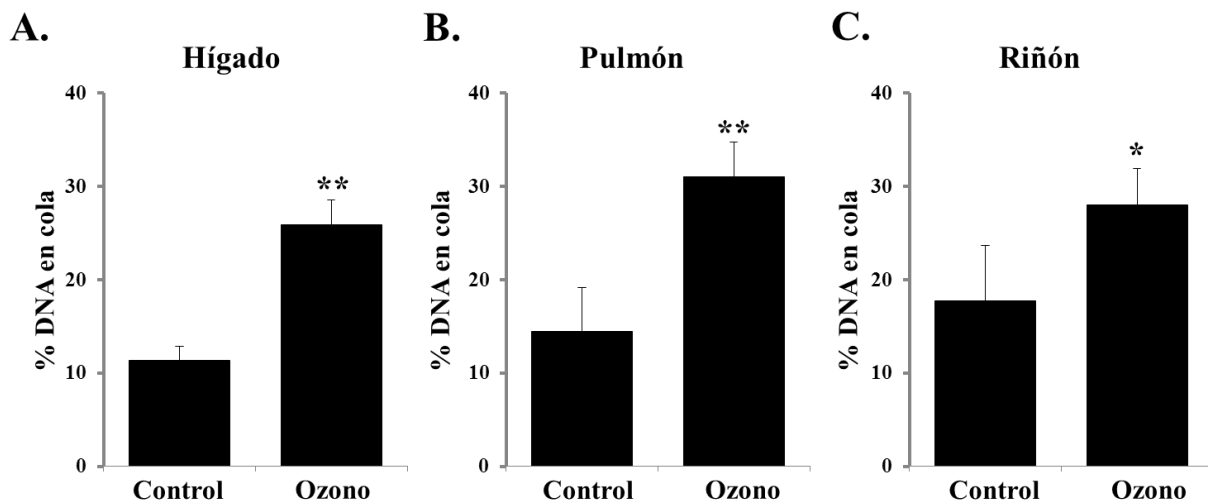


Figura 13. Daño a DNA por la exposición a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) en el hígado (A), el pulmón (B) y los riñones (C). El daño a DNA inducido por la exposición al ozono se determinó por el ensayo Cometa. El parámetro que se presenta en estas graficas es el porcentaje (%) de DNA en la cola del cometa. Prueba de t de Student \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  (media  $\pm$  DE; n=3).

### Cambios en los niveles de HMOX1 y UGT1A1A

A continuación se presentan los resultados de los cambios en los niveles de mRNA y proteínas de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 en el hígado, los pulmones y los riñones de los animales expuestos a 5 ppm de compuestos orgánicos volátiles que no fueron incluidos en el artículo antes mencionado (figura 14).

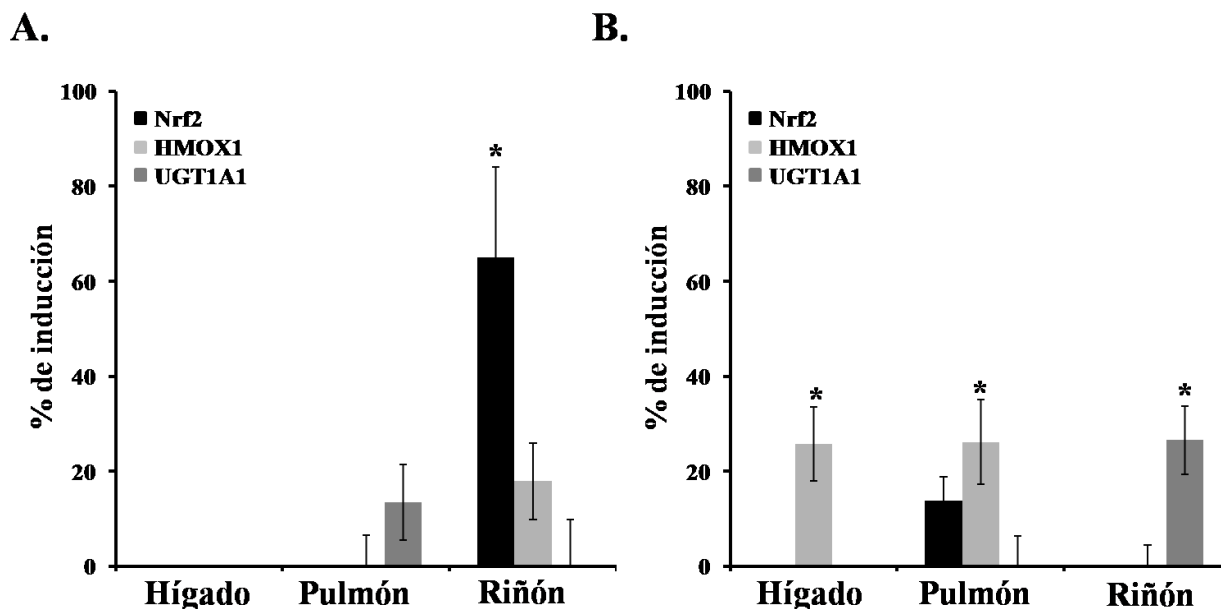


Figura 14. Cambios en los niveles de mRNA y proteína de las enzimas HMOX1 y UGT1A1 inducidos por la exposición a 5 ppm de compuestos orgánicos volátiles. **A.** Cambios en los niveles de mRNA (RNA mensajero). Los cambios en la concentración de mRNA de estas enzimas se determinaron por RT-PCR. Como control interno se utilizó el gen L32 y los datos se normalizaron con respecto al control (animales que inhalaban agua desionizada por 1 h). **B.** Cambios en la concentración de estas proteínas. La concentración de estas proteínas se determinó por inmunoblotting (Western blot). Como control interno se utilizó la  $\beta$ -actina y los datos se presentan normalizados con respecto al control. †En ambos casos, los resultados fueron analizados utilizando el programa de cómputo EDAS 290 (Eastman Kodak Co.), el cual permitió cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas. Prueba de t de Student \* $p < 0.05$  (promedio  $\pm$  DE;  $n=3$ ). HMOX1, hemo oxigenasa 1; UGT1A1, UDP-glucuronosil transferasa 1 A1.

## Discusión

### Generación de estrés oxidante por la exposición al ozono y compuestos orgánicos volátiles

La capacidad de los contaminantes atmosféricos para generar daño y muerte celular están ampliamente estudiados en la literatura. Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar la inducción de dicho daño (Bernstein et al. 2004). De estos, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de radicales libres así como el subsecuente establecimiento de estrés oxidante ha sido descrito como parte del mecanismo de toxicidad del ozono y de los compuestos orgánicos volátiles (COV). Por esta razón, la inducción de estrés oxidante se determinó posterior a la exposición aguda a estos contaminantes. Como se puede apreciar en el modelo *in vivo* (artículo 2) pese a que no se detectó incremento sustancial en la generación de ERO como consecuencia de las exposiciones al ozono, a los compuestos orgánicos volátiles (COV) y a la mezcla de ambos (ozono y compuestos orgánicos volátiles (COV)), se observaron cambios importantes en la actividad de las enzimas antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) (tabla 2, artículo 2). De igual forma, la exposición a bajas concentraciones de ozono (0.11 ppm) tampoco indujo la generación de ERO; sin embargo, se observaron cambios en la actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) (tabla 2, Resultados). Los cambios en las actividades de estas enzimas sugieren la formación de sus respectivos sustratos. De esta forma, los cambios en la actividad de estas enzimas funcionan como indicadores de la generación de peróxido de hidrogeno y del ion superóxido así como desencadenantes de estrés oxidante.

La exposición al ozono, sólo o en conjunto con la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) produjo la inactivación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los tres órganos, el hígado, el pulmón y los riñones (tabla 2, artículo 2). Está reportado, que altas concentraciones de ozono causan la inactivación de la superóxido dismutasa (SOD) como consecuencia de su fragmentación (Lee et al. 2003b). Asimismo, Rivas-Arancibia *et al.* (1998), observaron la reducción en la actividad y los niveles de esta enzima en respuesta a la exposición a altas concentraciones de ozono (1 ppm) (Rivas-Arancibia et al.

1998). En el mismo estudio se reportó que la exposición a bajas concentraciones de ozono (0.1, 0.2 y 0.5 ppm) induce la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Rivas-Arancibia et al. 1998). Esto concuerda con lo observado en nuestro estudio *in vivo*, donde exposición a 1 ppm de ozono reduce la activación de la superóxido dismutasa (SOD) (tabla 2, artículo 2), sin embargo, incrementos en la actividad de esta enzima fueron observados en el pulmón y los riñones de los animales expuestos a bajas concentraciones de ozono (0.1 ppm) (tabla 2, Resultados). Estos resultados nos indican que existe una inhibición progresiva de la actividad de la enzima superóxido dismutasa por altas concentraciones de su sustrato, el ion superóxido, lo que sugiere la formación de este como consecuencia de la exposición al ozono. Por otro lado, la exposición a bajas y altas concentraciones de ozono también indujo cambios en la actividad de la enzima catalasa en el hígado, el pulmón y los riñones (tabla 2, artículo 2 y tabla 2 Resultados), lo que nos sugiere la formación de peróxido de hidrógeno. La formación de ERO, en particular de peróxido hidrógeno (Oosting et al. 1991) y del ion superóxido (Rivas-Arancibia et al. 1998), forman parte esencial del mecanismo de toxicidad del ozono (Chen y Qu 1997; Kennedy et al. 1992; Pryor 1994; Pryor y Church 1991; Romieu et al. 1998; Saintot et al. 1999).

Cambios en la actividad de la enzima catalasa fueron observados en el hígado y los riñones de los animales expuestos a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) (tabla 2, artículo 2). La activación metabólica de estos compuestos ocurre principalmente en el hígado (Ibuki y Goto 2004; Mattia et al. 1993; Revilla et al. 2007). La generación de ERO, principalmente el peróxido de hidrógeno, como sub-productos de su metabolismo está relacionada con la toxicidad de los compuestos orgánicos volátiles (COV) (Barreto et al. 2009). La adición de la catalasa a cultivos celulares reduce la citotoxicidad y previene la muerte celular inducida por la exposición al benceno (Badham y Winn 2010; Wan y Winn 2008), al tolueno (Karabulut et al. 2009) al xileno (Coleman et al. 2003) y a la mezcla de éstos (Revilla et al. 2007). Los resultados obtenidos nos indican la formación de peróxido de hidrógeno como consecuencia de la exposición a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) y corroboran la participación de ERO en el mecanismo de toxicidad de estos contaminantes (Al-Ghamdi et al. 2003; Shen et al. 1996; Soucek et al. 2000). Por el contrario, no se detectaron cambios en la actividad de esta enzima

en los pulmones de los animales expuestos a la mezcla de éstos, ya sea individualmente o en conjunto con el ozono. Existen diversos estudios que reportan la activación metabólica de varios compuestos orgánicos volátiles (COV) en el pulmón (Powley y Carlson 2000, 2001, 2002; Sheets et al. 2004). Pese a que no observamos cambios en la actividad de la catalasa, la inhibición de la enzima superóxido dismutasa (SOD) si fue detectada; esto nos indica la generación del ion superóxido, que probablemente ocurre durante las reacciones de óxido-reducción en las que participan los metabolitos de estos compuestos (ej. los metabolitos del benceno, la hidroquinona y la benzoquinona) (Chen et al. 2004).

La participación de las ERO en el mecanismo de toxicidad de los compuestos orgánicos volátiles, en particular en el del benceno, se confirmó con los resultados obtenidos en nuestro estudio *in vitro* (artículo 1). La exposición a los metabolitos del benceno, la hidroquinona y la benzoquinona, causaron la reducción en los niveles de GSH intracelular (figura 5A, artículo 1). Esta reducción en los niveles de GSH puede ser resultado de la producción de ERO durante las reacciones de óxido-reducción en las que participan estos metabolitos (Luo et al. 2008; Snyder y Hedli 1996). De igual forma, ambos metabolitos participan en reacciones de conjugación con el GSH disminuyendo la toxicidad de estos compuestos (Smith 1999; Trush et al. 1996); sin embargo, también reducen los niveles intracelulares de GSH lo que induce el establecimiento de un estrés oxidante.

### **Daño celular inducido por la exposición al ozono y compuestos orgánicos volátiles**

Las exposiciones al ozono, a los compuestos orgánicos volátiles (COV) y a la mezcla de ambos induce cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, catalasa y superóxido dismutasa, sugiriendo la generación de ERO como consecuencia de las exposiciones. Para determinar el daño oxidante a los lípidos de membrana (lipoperoxidación) se evaluó la producción de malondialdehído (MDA). Los resultados obtenidos nos indican que bajas concentraciones de ozono no inducen lipoperoxidación en ninguno de los órganos evaluados (figura 11, Resultados). Por el contrario, en los pulmones de los animales expuestos a 1 ppm de ozono, sólo o en conjunto con la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV), se detectaron elevados niveles de malondialdehído (MDA) (figura 1, artículo 2). El

ozono es un gas altamente reactivo que al entrar en contacto con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) del fluido del revestimiento epitelial genera ERO, hidroperóxidos y otros radicales lipídicos (Pryor y Church 1991) que inician reacciones de oxidación en las membranas lipídicas de las células (Postlethwait et al. 1998). Los elevados niveles de malondialdehído (MDA) observados en los pulmones de los animales expuestos sugieren que la exposición aguda a altas concentraciones de ozono genera lipoperoxidación. Resultados similares se han observado en otros estudios en donde la exposición aguda a 1 ppm de ozono genera incremento en los niveles de malondialdehído (MDA) tanto en modelos celulares (Qin et al. 1996) como en tejido cerebral de ratas (Rivas-Arancibia et al. 2003).

Por otro lado, observamos lipoperoxidación en los hígados y los riñones de los animales expuestos a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) (figura 1, artículo 2). La inducción de lipoperoxidación por la exposición a la mezcla de benceno, tolueno y xileno ha sido reportada anteriormente (Kim et al. 2011; Koski y Isomaki 1990; Otitolaju y Olagoke 2010); ésta es consecuencia de la generación de ERO producidas durante el metabolismo de estos compuestos en el hígado (Nedelcheva et al. 1999; Shen et al. 1996). Igualmente, la lipoperoxidación detectada en los riñones de los animales expuestos sugiere toxicidad renal inducida por el metabolismo de estos compuestos (Bowen et al. 2007; Yoon et al. 2007). La producción de peróxido de hidrógeno, reflejada en el incremento en la actividad de la catalasa (tabla 2, artículo 2) sugiere dicha activación metabólica, evento que ha sido documentado ampliamente en la literatura. La inducción de apoptosis en las células del túbulo renal por la exposición a etilbenceno (Zhang et al. 2010) y tolueno (Jonek y Kaminski 1971; Kamijima et al. 1994), así como falla renal por envenenamiento por benceno (Kaminski et al. 1970; Tang et al. 2005) han sido reportadas.

La exposición al ozono y a la mezcla de los compuestos orgánicos volátiles (COV) indujo la oxidación de lípidos de membrana en los tres órganos (figura 1, artículo 2). Al ser comparados con los resultados obtenidos para las exposiciones de cada contaminante por separado, se observa que la lipoperoxidación detectada en los pulmones de estos animales es esencialmente resultado de la toxicidad del ozono (figura 1, artículo 2). En contraste, observamos un mayor incremento en los niveles del

malondialdehído (MDA) en el hígado y los riñones de los animales expuestos a ambos contaminantes, al ser comparados con los animales expuestos a la mezcla de los compuestos orgánicos volátiles (COV) únicamente. Esto nos sugiere efectos del ozono en tejidos extrapulmonares, como el hígado y los riñones. Como se mencionó anteriormente, la reactividad del ozono impide que penetre a tejidos internos, por lo que su toxicidad es mediada por los metabolitos secundarios resultado de su interacción con las moléculas del fluido del revestimiento epitelial (Pryor et al. 1995). Cambios en los niveles de GSH intracelular así como inducción de enzimas antioxidantes han sido reportados en el hígado (Aibo et al. 2010; Csallany et al. 1985) y los riñones (Demirbag et al. 2010; Morsy et al. 2010) de animales expuestos a ozono. Se ha sugerido que la toxicidad del ozono en tejidos extrapulmonares puede ser causada por citocinas generadas en procesos inflamatorios en las células de pulmón (Last et al. 2005) así como por productos de la lipoperoxidación pulmonar (ej. malondialdehído (MDA)) (Goldstein 1978). Los efectos extrapulmonares del ozono sólo se detectaron en la exposición en combinación con la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV); sin embargo, la exposición al ozono en bajas y altas concentraciones induce cambios en los niveles de las enzimas antioxidantes, la catalasa y la supeóxido dismutasa (SOD) (tabla 2, Resultados y tabla 2, artículo 2) en el hígado y los riñones de los animales expuestos. Esto nos indica la formación de ERO, pero probablemente las defensas intrínsecas de estos órganos las contrarrestaron por lo que no se detectó daño celular. Por otro lado, no se puede excluir la generación de sub-productos de la reacción entre el ozono y los compuestos orgánicos volátiles (COV), que resulten altamente tóxicos para estos órganos.

Además de la oxidación de lípidos de membrana, también se evaluó la generación de daño a DNA y la oxidación de proteínas como consecuencia de las distintas exposiciones. Tanto la exposición a bajas y altas concentraciones de ozono como a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) indujeron daño a DNA en los tres órganos (figura 11B y 13, Resultados y figura 2, artículo 2). La generación de rompimientos de DNA por la exposición al ozono está ampliamente reportada en la literatura. El incremento en el daño al DNA en población expuesta se correlaciona con la concentración de ozono a la que han estado expuestos (Mudway y Kelly 1998; Rojas et al. 2000; Valverde et al. 1997).

Por otro lado, modelos *in vitro* han permitido establecer la participación de ERO en la inducción de daño al DNA por el ozono (Cheng et al. 2003; Kosmider et al. 2010; Lee et al. 1996). De manera similar, la exposición a compuestos orgánicos volátiles (COV) en mezclas similares a la utilizada en este estudio se ha reportado la generación de rompimientos de DNA (Chen et al. 2008; Costa et al. 2006; Liu et al. 2010). La disminución en los niveles intracelulares de GSH, la lipoperoxidación y los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes sugieren que el daño a DNA inducido por estos compuestos está en relación con la formación de metabolitos reactivos y la generación de ERO y radicales libres (Chen et al. 2008; Pariselli et al. 2009; Yang y Zhou 2010). Además, dada la duración de la exposición y la falta de tiempo de recuperación (sacrificio inmediato de los animales) no se puede excluir que estos rompimientos de cadena del DNA sean reparados posteriormente. Esto se ha reportado para la exposición al ozono, donde se observó la reparación del daño al DNA durante las primeras cuatro horas después de la exposición (Bornholdt et al. 2002); en este repote los autores proponen la activación de ATM como el mecanismo responsable de la reparación de dicho daño (Cui et al. 2011). Igualmente, se ha reportado la reparación de rompimientos de DNA inducidos por la exposición a tolueno, donde 24 horas después de la exposición el daño a DNA observado inicialmente ya no es detectado (Pariselli et al. 2009). Por otra parte, la oxidación de proteínas como consecuencia de las exposiciones se determinó mediante la formación de carbonilos. Estas modificaciones solo fueron detectadas en los pulmones de los animales expuestos al ozono y a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) (figura 2, artículo 3). La exposición aguda (Valacchi et al. 2002) y crónica (Lim et al. 2006) al ozono induce la oxidación de proteínas y la formación de carbonilos. Sin embargo, estas modificaciones no se observaron en los grupos expuestos únicamente al ozono. Esto podría indicarnos que probablemente la co-exposición del ozono con la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) exagera la respuesta. Interesantemente, esta exacerbación de la respuesta por la co-exposición a estos contaminantes en el pulmón no se observa en los otros marcadores de daño evaluados (lipoperoxidación y daño a DNA).

La exposición a contaminantes atmosféricos sucede en mezclas (Harkema y Wagner 2005), empero para poder entender el comportamiento de estos es necesario separar dichas mezclas y analizar la



respuesta a la exposición de cada contaminante de manera independiente. Nuestro modelo *in vivo* permitió explorar los efectos inmediatos a la exposición aguda al ozono y una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) que simula las condiciones, hasta cierto grado, de contaminación atmosférica a la que están expuestos los habitantes de la ZMVM (Tovalín et al. 2006) así como establecer la posible sinergia de la co-exposición a estos contaminantes. Al comparar los resultados de las exposiciones individuales al ozono y a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) con los resultados de la exposición a la mezcla de ambos contaminantes se observa que existe toxicidad órgano-específica. Los efectos tóxicos del ozono, reflejados como el establecimiento de estrés oxidante y la generación de daño a DNA y lípidos de membrana, fueron detectados principalmente en los pulmones de los animales expuestos. Por el contrario, la exposición a la mezcla de los compuestos orgánicos volátiles (COV) no generó efecto en este órgano. Por otro lado, el hígado y los riñones son órganos blanco de la toxicidad inducida por la exposición a la mezcla de los compuestos orgánicos volátiles (COV). Sin embargo, la co-exposición de éstos con el ozono exagera su toxicidad, pese a una limitada toxicidad del ozono en estos órganos. Dada la duración de las exposiciones (1 hora) y el sacrificio inmediato de los animales, no se puede descartar la toxicidad extrapulmonar del ozono a largo plazo.

### **Activación de Nrf2 por la exposición al ozono y los compuestos orgánicos volátiles**

La activación de la vía de señalización regulada por Nrf2 inducida por la exposición a los contaminantes atmosféricos se exploró inicialmente en nuestro modelo *in vitro* (artículo 1). Dado que el pulmón es el sitio de contacto inicial durante la inhalación de xenobióticos y los recientes reportes de su capacidad para metabolizar benceno (Powley y Carlson 2000, 2001, 2002; Sheets et al. 2004), la línea celular derivada de células del epitelio bronquial humano, Beas-2B, se empleó como modelo para determinar la activación de Nrf2 como consecuencia de la exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona, dos de los metabolitos tóxicos del benceno (Bolton et al. 2000) . La utilización del vector reportero ARE-LUC permitió evaluar la activación de la transcripción de genes que contienen el elemento de respuesta antioxidante (ARE) por la exposición a estos compuestos. Los resultados obtenidos (figura 1A, artículo 1) indican que tanto la

exposición a la hidroquinona como a la benzoquinona inducen la activación de la transcripción de estos genes. Una correlación positiva se observó entre la concentración de estos xenobióticos y la activación de la transcripción del gen reportero que contiene ARE. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente, donde se describe la activación de la enzima lucifera, regulada por ARE, por estos compuestos en otros modelos celulares, como células de carcinoma hepatocelular humano (Rushmore et al. 1991; Wang y Williamson 1996), células de tejido mamario humano (Wang et al. 2010) y de teratomas testiculares de ratón (Wang y Williamson 1996). Sato *et al.* (2009) observaron niveles similares de inducción de esta enzima al exponer células neuronales (HT22) a diversos compuestos con estructuras semejantes a la hidroquinona (Sato et al. 2009). Además de la activación de la transcripción de genes que contienen ARE, se determinó la capacidad de la hidroquinona y la benzoquinona para activar a Nrf2. Ambos compuestos generaron incremento en los niveles de Nrf2 y su acumulación nuclear (figura 1B, artículo 1). Tanto la translocación nuclear de Nrf2 como el incremento en su estabilidad proteica (aumento en sus niveles) indican la activación de éste como consecuencia de las exposiciones (Li et al. 2005; Niture et al. 2009). Para corroborar dicha activación, los niveles de algunas de las proteínas que están bajo la regulación de Nrf2 fueron evaluados (Hayes y McMahon 2009). Nuestros resultados muestran que ambas exposiciones inducen los niveles de las enzimas que participan en la síntesis del GSH, la glutamato cisteína ligasa subunidad reguladora (GCLM) y la glutatión sintetasa (GSS), la enzima antioxidante hemo oxigenasa 1 (HMOX) y la enzima desintoxicante NAD(P)H:quinona óxido-reductasa 1 (NQO1) (figura 1C, artículo 1). Resultados similares observamos en el modelo *in vivo*, donde también se detectó la inducción de los niveles de las enzimas HMOX1 y la UDP-glucuronosyl transferasa 1 A1 (UGT1A1) por la exposición al ozono y a la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) (figura 3, artículo 3; figura 12 y 14, Resultados). La activación de la vía de señalización regulada por Nrf2 y la subsecuente inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes ofrecen una ventaja adaptiva para contrarrestar el estrés y daño inducido por las exposiciones a estos contaminantes. En el caso de nuestro modelo *in vitro*, el GSH y la enzima NQO1 son moléculas claves para la protección en contra de la citotoxicidad inducida por la exposición al benceno (Bolton et al. 2000; Ross y Zhou 2010).

La enzima NQO1 cataliza la reducción de la benzoquinona a la hidroquinona evitando la generación de ERO y la formación del radical semiquinona, el cual es altamente tóxico ya que es capaz de unirse covalentemente a componentes celulares como proteínas (Vasiliou et al. 2006). La importancia de la enzima NQO1 en el proceso de desintoxicación de la hidroquinona y la benzoquinona se ha estudiado en detalle. La inducción de esta enzima por la hidroquinona y la benzoquinona reduce la citotoxicidad inducida por la exposición (Flescher y Snyder 1995; Smart y Zannoni 1984; Twerdok et al. 1992; Twerdok y Trush 1990); por el contrario, la inhibición de la actividad de NQO1 incrementa la susceptibilidad a la toxicidad de estos compuestos provocando muerte celular (Flescher y Snyder 1995; Smith 1999). Por otro lado, la formación de conjugados entre el GSH y la hidroquinona, pero sobretodo la benzoquinona produce metabolitos menos tóxicos y más solubles que son fácilmente excretados (Snyder et al. 1993). La inhibición química de la síntesis del GSH reduce la capacidad de las células mieloblásticas (HL-60 y ML-1) para contrarrestar la citotoxicidad inducida por la hidroquinona (Li et al. 1994), esto demuestra la importancia del GSH en el proceso de desintoxicación de estos metabolitos. De manera similar a lo observado en nuestro modelo *in vitro*, se evidenció la inducción de las enzimas HMOX1 y UGT1A1, que están bajo la regulación de Nrf2 (Alam et al. 1999; Yueh y Tukey 2007), en los hígados y los pulmones de los animales expuestos al ozono y la mezcla de los compuestos orgánicos volátiles (COV) (figura 3, artículo 3; figura 12 y 14, Resultados). Al igual que el GSH, la reacción de conjugación mediada por la UGT entre los compuestos generados durante el metabolismo de los compuestos orgánicos con el ácido glucurónico reduce su toxicidad incrementando su solubilidad y su excreción (Schrenk et al. 1996; Sun et al. 2008). Además de la inducción de la enzima UGT1A1, también se detectó el incremento de la enzima HMOX1 como consecuencia de la exposición al ozono y la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV) (figura 3, artículo 3; figura 12 y 14, Resultados). La inducción de esta enzima también se observó en nuestro modelo *in vitro*, tanto por la exposición a la hidroquinona como a la benzoquinona (figura 1C, artículo 2). La HMOX1 es una enzima microsomal que responde a estímulos oxidantes e inflamatorios (Prawan et al. 2005); ésta participa en la regulación del balance redox de la célula, contrarrestando el estrés oxidante e inhibiendo la apoptosis (Otterbein et al. 2003).

Incrementos en los niveles de la HMOX1 se han reportado tanto por la exposición al ozono (Foucaud et al. 2006; Takahashi et al. 1997; Valacchi et al. 2004; Valacchi et al. 2003) como a los compuestos orgánicos volátiles (COV) (Lee et al. 2007; Sarma et al. 2011). Estos resultados sugieren la activación de Nrf2 en respuesta al estrés oxidante generado por la exposición a estos contaminantes; sin embargo, al considerarse la duración de las exposiciones en nuestro modelo *in vivo* (1 hora) y la falta de cambios en los niveles de mRNA de las enzimas HMOX1 y UGT1A1, no se puede descartar la participación de otros mecanismos involucrados en la regulación de los niveles de estas enzimas. La activación transcripcional de la enzima HMOX1 no es específica de Nrf2 (Paine et al. 2010), otros factores de transcripción como NF-kB (nuclear factor kappa B) (Lavrovsky et al. 1993) y AP-1 (activating protein 1) (Oguro et al. 1996) también contribuyen a su inducción. De igual forma, la regulación de la enzima UGT1A1 por los factores de transcripción AhR (aryl hydrocarbon receptor, por sus siglas en inglés), CAR (constitutive androstane receptor) y PXR (pregnane X receptor) ha sido reportada (Kalthoff et al. 2010; Sugatani et al. 2004; Togawa et al. 2008). Además de su regulación transcripcional, la expresión de estas enzimas también está regulada por mecanismos post-transduccionales (ej. estabilidad de mRNA, fosforilación y glicosilación) (Beckman et al. 2011; Ishii et al. 2010) lo que pudiese explicar la rápida inducción de estas enzimas en respuesta a las exposiciones. Por ende, para poder descartar la participación de estos mecanismos es necesario realizar experimentos *in vivo* más detallados que permitan corroborar y explorar la activación de Nrf2 por la exposición al ozono y la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (COV).

### **Mecanismo de defensa regulado por Nrf2**

La utilización de nuestro modelo *in vitro* permitió explorar en detalle el papel de Nrf2 en la protección celular ante la exposición a los metabolitos del benceno, la hidroquinona y la benzoquinona. Para esto, se manipularon los niveles de Nrf2 intracelular utilizando el vector Nrf2-V5 para su sobreexpresión y RNA de interferencia (siRNA) para su silenciamiento. La sobreexpresión de Nrf2 redujo la citotoxicidad y la apoptosis inducida por la exposición a ambos metabolitos (figura 2A, 2B, 2C y 3 artículo 1). Estos resultados concuerdan con numerosos reportes donde la sobreexpresión de Nrf2

favorece la respuesta antioxidante y protege la integridad celular ante la exposición a agentes oxidantes (Cao et al. 2005; Chen y Shaikh 2009; Lee et al. 2003a; Shih et al. 2003). Por el contrario, reducción importante en la viabilidad celular e incremento en la apoptosis inducida por la hidroquinona y la benzoquinona se observaron en las células knockdown para Nrf2 (figura 2D, 2E, 2F y 4 artículo 2). La falta o carencia de Nrf2 inhabilita la rápida activación de una respuesta antioxidante caracterizada principalmente por la inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes (Lee et al. 2003a). Esto incrementa la susceptibilidad a agentes oxidantes dado que reduce la capacidad celular de contrarrestar los efectos tóxicos generados por dicha exposición. El silenciamiento de Nrf2 en células de médula ósea favorece la muerte celular inducida por la hidroquinona y la benzoquinona (Zhu et al. 2006). La utilización de ratones knockout para Nrf2 ha permitido validar el papel de Nrf2 en la protección celular en contra de diversos xenobióticos (Casalino et al. 2007; Chan et al. 2001; Chan y Kan 1999; Enomoto et al. 2001; He et al. 2006; Jowsey et al. 2003; Knorr-Wittmann et al. 2005; Lewis et al. 2006), incluyendo contaminantes atmosféricos (Aoki et al. 2001; Li et al. 2008, 2010; Ramos-Gomez et al. 2001). Como se mencionó anteriormente, la susceptibilidad de las células knockdown o de los animales knockout para Nrf2 se debe a la pérdida de la capacidad para inducir enzimas desintoxicantes y antioxidantes (Aoki et al. 2001; Kwak et al. 2001a; Li et al. 2004a). Con la finalidad de explorar y confirmar esto, se evaluó la inducción de dichas enzimas en las células knockdown para Nrf2. Los resultados obtenidos indican que efectivamente las células knockdown para Nrf2 no solo pierden la capacidad de inducir las enzimas antioxidantes (figura 5C, artículo 2) sino que además éstas tienen reducidos niveles de GSH intracelular (figura 5B, artículo 2). Estos resultados indican que las células knockdown para Nrf2 pierden la capacidad de defensa y de desintoxicación de estos compuestos.

En conjunto, estos resultados permiten establecer una serie de eventos clave en el proceso de desintoxicación de la hidroquinona y la benzoquinona. La exposición a estos compuestos genera ERO lo que produce la reducción de los niveles de GSH intracelular y el establecimiento de un estrés oxidante que a la vez activan a ARE mediado por Nrf2 resultando en la inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes lo que favorece el proceso de desintoxicación de estos compuestos y protege en contra de

sus efectos tóxicos. Esto refleja un mecanismo de “auto-regulación” por estos compuestos en donde *per se* son capaces de inducir su propia desintoxicación. Este concepto también se observa para otros contaminantes ambientales, incluyendo contaminantes atmosféricos (artículo 1) lo que nos indica la importancia de la vía de señalización regulada por Nrf2 (figura 15).

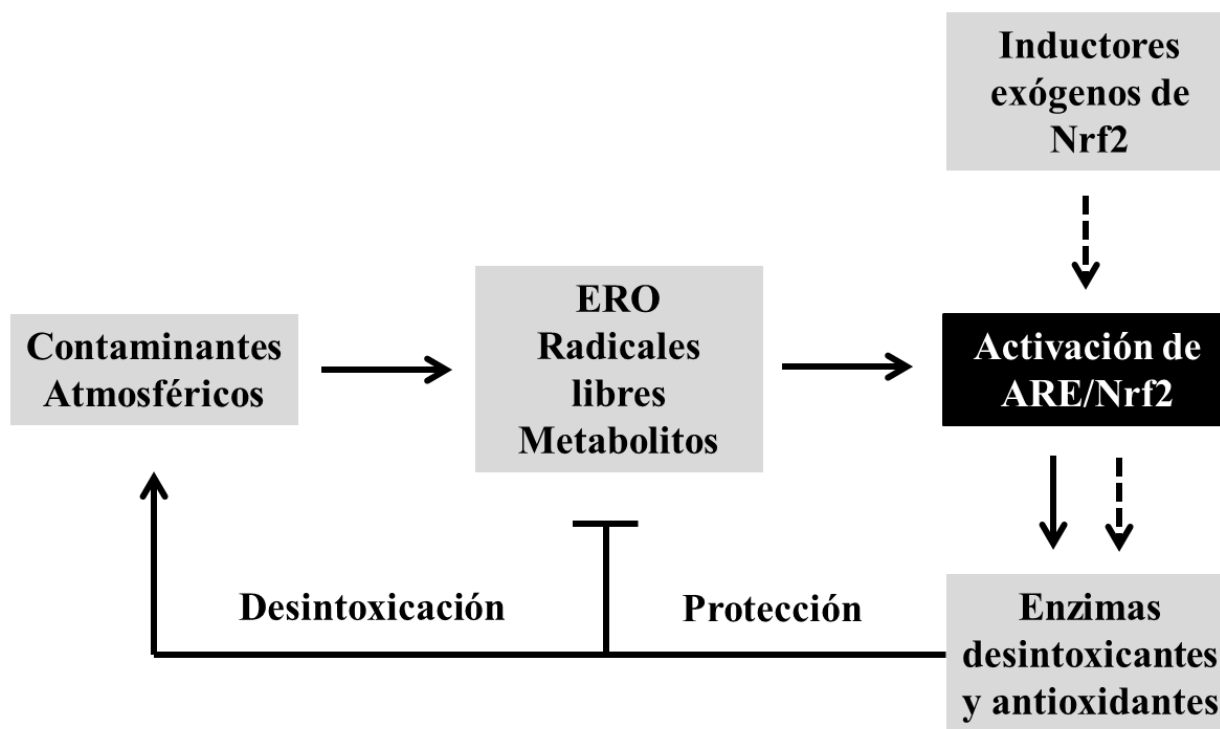


Figura 15. **Modelo de activación de Nrf2 por la exposición a los contaminantes atmosféricos.** La exposición a los contaminantes atmosféricos y su metabolismo generan especies reactivas de oxígeno (ERO), radicales libres y metabolitos reactivos que producen el establecimiento de un estrés oxidante, el cual induce la activación de la vía de señalización regulada por Nrf2. La activación de Nrf2 y la subsecuente inducción de enzimas desintoxicantes y antioxidantes no sólo contrarrestan las ERO, los radicales libres y los metabolitos reactivos producidos; además, favorecen la detoxificación y el metabolismo de estos contaminantes. Este mecanismo de “auto-regulación” sugiere que los contaminantes atmosféricos *per se* inducen su metabolismo y proceso de desintoxicación a la par que activan a Nrf2, mecanismo esencial de defensa en contra de su toxicidad. La utilización de inductores exógenos de Nrf2 se presenta como una estrategia sencilla y segura de incrementar la defensa celular en contra de la exposición a estos contaminantes.

Finalmente nuestros estudios permiten establecer la importancia de Nrf2 en el mecanismo de defensa en contra de los contaminantes atmosféricos, en especial en contra de la exposición al benceno y sus metabolitos, la hidroquinona y la benzoquinona. Este conocimiento permite desarrollar estrategias preventivas dirigidas a poblaciones susceptibles a la exposición de contaminantes atmosféricos. Por ejemplo, la falta de inducción de la enzima NQO1 incrementa la hematotoxicidad inducida por la exposición al benceno (Moran et al. 1999). La utilización de la 1,2-ditio1-3-tiona (D3T, por sus siglas en inglés), un conocido inductor de Nrf2 (Kwak et al. 2003; Zhu et al. 2008), incrementa los niveles de enzimas desintoxicantes (ej. NQO1 y GST) y antioxidantes (Kwak et al. 2001b; Li et al. 1994; Twerdok et al. 1992) reduciendo la apoptosis inducida por la hidroquinona. De manera similar, el empleo de otros compuestos naturales (tabla 3) que son conocidos inductores de Nrf2 (Chen et al. 2005; Hsieh et al. 2006; Kang et al. 2007; Na y Surh 2008; Zhang et al. 2009), previenen y protegen en contra del estrés y daño oxidante causados por la exposición a contaminantes atmosféricos. La administración de estos compuestos a poblaciones en riesgo es una estrategia sencilla y segura, que de ser funcional, permitiría aminorar la toxicidad inducida por los contaminantes atmosféricos (figura 15).

**Tabla 3.** Inducción de Nrf2 por compuestos naturales y su protección en contra de contaminantes atmosféricos

<b>Compuesto</b>	<b>Alimento</b>	<b>Protección</b>	<b>Cita</b>
Galato de epigallocatequina	Té verde	Benceno	(Emara y El-Bahrawy 2008)
Curcumina	Brócoli	Benzo- $\alpha$ -pireno	(Garg et al. 2008)
Resveratrol	Vino tinto	Dioxina (TCDD)	(Singh et al. 2011)
		Naftaleno	(Sehirli et al. 2008)
		TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina	

## Conclusiones

En el presente trabajo de investigación se exploró la capacidad del ozono y los compuestos orgánicos volátiles (COV), en particular la del benceno, para inducir la generación de estrés oxidante, la inducción de daño celular y la subsecuente activación de la vía de señalización regulada por Nrf2. El empleo de un modelo *in vitro* permitió analizar en detalle el papel de Nrf2 en respuesta a la exposición de los metabolitos del benceno, la hidroquinona y la benzoquinona en las células del epitelio pulmonar humano (línea celular Beas-2B). Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de estos metabolitos para activar la transcripción de genes que contienen el elemento de respuesta antioxidante (ARE), incrementar los niveles de Nrf2 y causar su translocación nuclear, así como inducir la expresión de las enzimas NQO1, GCLM, GSS y HMOX1. Por otra parte, la sobreexpresión de Nrf2 redujo la citotoxicidad y la apoptosis inducida por la exposición a la hidroquinona y a la benzoquinona. Por el contrario, el silenciamiento de Nrf2 por siRNA incrementó la susceptibilidad de las células a la exposición de estos metabolitos, reduciendo su viabilidad y aumentando la muerte celular. Estos resultados indican un papel esencial de Nrf2 en defensa de la citotoxicidad inducida por la hidroquinona y la benzoquinona. Al explorar las causas de la susceptibilidad observada en las células knockdown para Nrf2, se detectó la reducción en los niveles del glutatión (GSH) intracelular y la pérdida de la inducibilidad de las enzimas desintoxicantes y antioxidantes. Esto nos sugiere que la inducción de antioxidantes y enzimas desintoxicantes bajo la regulación de Nrf2 son clave en el proceso de desintoxicación de estos metabolitos. Por lo que podemos concluir que Nrf2 desempeña un papel fundamental en la protección y la desintoxicación de los metabolitos del benceno, la hidroquinona y la benzoquinona en el pulmón.

Por otro lado, los resultados obtenidos por nuestro modelo *in vivo* nos indican la capacidad del ozono y la mezcla de los compuestos orgánicos volátiles (COV) para inducir estrés oxidante y daño a lípidos, DNA y proteínas. La exposición aguda a la combinación de estos contaminantes, a su dosis máxima permisible, indujo cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, la catalasa y la



superóxido dismutasa (SOD), así como lipoperoxidación y daño al DNA en el hígado, el pulmón y los riñones de los animales expuestos. Al ser comparados con los resultados obtenidos tras las exposiciones a cada contaminante por separado, se observó que el estrés oxidante, la lipoperoxidación y el daño al DNA detectados en los pulmones de los animales expuestos es consecuencia de los efectos tóxicos del ozono; contrario a lo observado en los hígados y los riñones, en donde los compuestos orgánicos volátiles (COV) son responsables de la toxicidad inducida. Sin embargo, se observaron cambios en la actividad de la catalasa y de la superóxido dismutasa (SOD) en los hígados y los riñones de los animales expuestos a ozono únicamente. Estos nos sugieren la toxicidad del ozono en tejidos extrapulmonares. Finalmente, la exposición a estos contaminantes indujo cambios en los niveles de las proteínas HMOX1 y UGT1A1 reguladas por Nrf2; sin embargo, no se cuenta con los elementos necesarios para descartar la participación de otros mecanismos en la regulación de éstas, por lo que experimentos más puntuales son necesarios para corroborar y explorar la activación de Nrf2 por dichos contaminantes.

De manera general podemos concluir que los datos presentados en este trabajo de investigación confirman el papel esencial del factor de transcripción Nrf2 en la protección celular ante la exposición a los contaminantes atmosféricos.

## **Apéndice 1**

### **Artículo 3**

“Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway”

Rubio V., Valverde M. y E. Rojas. 2010

Environmental Science Pollution Research 17:369-382

## Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway

Valentina Rubio · Mahara Valverde · Emilio Rojas

Received: 29 August 2008 / Accepted: 16 February 2009 / Published online: 15 April 2009  
© Springer-Verlag 2009

### Abstract

**Background, aim, and scope** Atmospheric pollution is a worldwide problem. Exposure to atmospheric pollutants causes toxic cellular effects. One of the mechanisms of toxicity by these pollutants is the promotion of oxidative stress. Several signaling pathways control cellular redox homeostasis. In this respect, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a crucial transcription factor in the cell's response to oxidative stress.

**Main features** In cellular animal models, exposure to atmospheric pollutants activates Nrf2, attenuating its toxic and even its carcinogenic effects. Therefore, we have reviewed the scientific literature in order to indicate that air pollutants, such as particulate matter, polycyclic aromatic hydrocarbons, and gaseous matter, are Nrf2 pathway inductors, triggering self-defense through the establishment of proinflammatory and antioxidant responses.

**Results and discussion** Exposure to reactive molecules as atmospheric pollutants causes the activation of Nrf2 and the subsequent regulation of the expression of cytoprotective and detoxifying enzymes, as well as antioxidants. Moreover, induction of Nrf2 prior to exposure reduces the harmful effects of pollutants. The present article discusses the protective role of the Nrf2 pathway against different atmospheric pollutant insults.

**Conclusions** Nrf2 regulates the expression of numerous cytoprotective genes that function to detoxify reactive species produced during atmospheric pollutant metabolic

reactions. From the papers highlighted in this review, we conclude that Nrf2 has an important role in the defense against atmospheric pollutant-induced toxicity.

**Perspectives** Further studies are needed to understand the signaling events that turn on the system in response to atmospheric pollutant stress. This could allow for the possibility of targeting the pathway for prevention benefits in the near future.

**Keywords** ARE sequences · Atmospheric pollutants · Keap1 · Nrf2 · Reactive oxygen species

### 1 Background, aim, and scope

Air pollution is a worldwide problem and has become one of the major issues of climate and environmental health (Chen et al. 2007; Kondratyev and Varotsos 1995; Varotsos 2005). Nowadays, it is well-recognized that climate change strongly influences the human comfort index, which calculates the body's reaction to environmental conditions (heat, cold, humidity, etc). Exposure to air pollutants affects different body systems and causes several health problems, including respiratory (Lebowitz 1996; Curtis et al. 2006; Magas et al. 2007), cardiovascular (Bhatnagar 2006), neurological (Calderon-Garcidueñas et al. 2002; Campbell 2004), reproductive and developmental effects (Maisonet et al. 2004; Wang and Pinkerton 2007), and even cancer (Armstrong et al. 2004; Lewtas 2007). In addition, there are reports which state that the exposure to air pollutants enhances respiratory illness caused by infection (Chauhan and Johnston 2003) and the immune response (Jakab et al. 1995; Whitekus et al. 2002; Beveler et al. 2007; Atariu et al. 2007). Furthermore, several epidemiological studies have found an association between morbidity and mortality

Responsible editor: Costas Varotsos

V. Rubio · M. Valverde · E. Rojas (✉)  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
México D.F. 04510, Mexico  
e-mail: emilior@servidor.unam.mx

and ambient air pollution (Seaton 1996; Sorensen et al. 2003). In a series of studies performed in Mexico City, Borja-Aburto et al. (1997, 1998) established that mortality was positively associated with an elevation in particulate matter concentration. In the Air Pollution and Health European Approach Project (APHEAP2), 23 large cities in Europe were studied to estimate the effect of air pollution on mortality. Characterization of urban inhalation exposure to benzene, formaldehyde, and aldehydes in the European Union was studied recently by De Bruin et al. (2008). Katsouyanni et al. (2001) reported that an increase of  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in particulate matter increased daily deaths by 0.6%. Similar results were obtained in a 14-year study of 95 large communities in the United States (National Morbidity, Mortality Air Pollution Study [NMMAPS]) (Bell et al. 2004). Gryparis et al. (2004) found that exposure to ozone had an impact on mortality in the warmer months. Additionally, a recent meta-analysis of 15 cities in Italy demonstrated a positive relationship between cardiorespiratory mortality and air pollutant concentrations (Franchini and Mannucci 2007).

When future studies are performed to evaluate the impact of air pollutants, it is important to keep in mind that there are subgroups in the population that are more susceptible to exposure to air pollutants. Such groups include children, pregnant women (Rojas-Martínez et al. 2007; Heinrich and Slama 2007), the elderly (Lee et al. 2007), and people with a disease like asthma and chronic obstructive pulmonary disease (Peden 2005; Magas et al. 2007).

Air pollution is a mixture of gaseous and particulate matter (Ferm et al. 2005, 2006). Current primary gaseous pollutants include nitrogen oxides ( $\text{NO}_x$ ), carbon monoxide (CO), sulfur dioxide ( $\text{SO}_2$ ), volatile organic compounds (VOC), and secondary pollutants like ozone ( $\text{O}_3$ ) (Han and

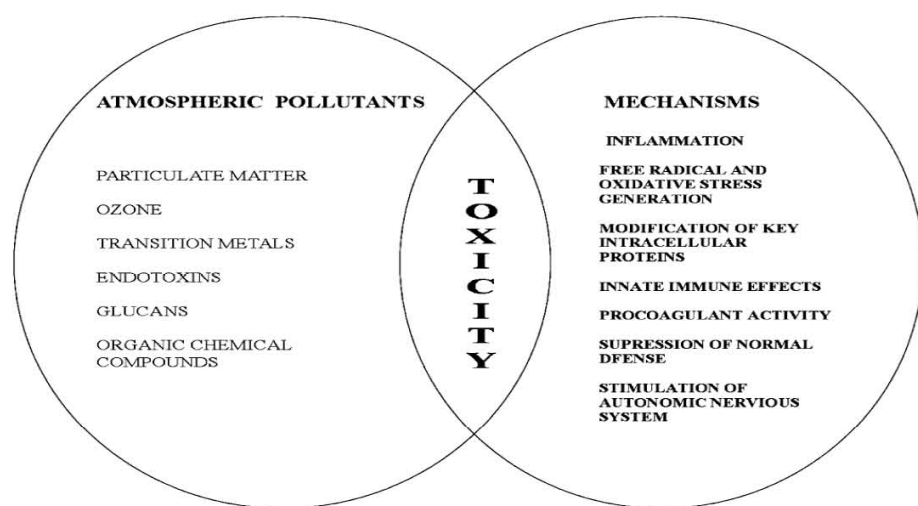
Naehrer 2006). In urban areas, the principal sources of these pollutants are motor vehicle emissions and industrial activities (Maitre et al. 2006; De Bruin et al. 2008). For the formation of the secondary pollutants, the solar ultraviolet radiation that reaches the earth's surface is of crucial importance. Under the present circumstances of stratospheric ozone depletion, the intensity of this radiation has been increased, thus enhancing the production of the secondary pollutants (Efstathiou et al. 1998; Varotsos 2002, Varotsos et al. 2003).

The literature suggests different mechanisms by which air pollutants could cause diverse and adverse health effects (Fig. 1). Although each pollutant has its own mechanism of toxicity, most pollutants, like ozone, nitrogen oxides, and particulate matter, are potent oxidants (Brunekreef and Holgate 2002). Consequently, the promotion of oxidative stress has been identified as one of the most important mechanisms that are responsible for toxic air pollutant effects. Oxidative stress can trigger redox-sensitive pathways that lead to different biological processes, like inflammation and cell death (Kooter 2004). These pathways are regulated by a great variety of transcription factors, such as the signal transducers and activators of transcription (STAT), activator protein 1 (AP1) (Comhair and Erzurum 2002), nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) (Haddad 2004), and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) (Gopalakrishnan and Tony-Kong 2007).

## 2 Nrf2

To protect itself from the damage produced by oxidative stress, the cell has developed efficient antioxidant defense systems. The rapid induction and activation of detoxifying

**Fig. 1** Mechanisms of toxicity of atmospheric pollutants



Modified from Bernstein et al., 2004

enzymes and antioxidant molecules minimizes the damage caused by oxidative stress (Kang et al. 2005). The promoter of many of the genes that encode for phase II detoxifying enzymes and antioxidants contains a *cis*-acting element called the antioxidant response element (ARE) (Lee et al. 2005a). The ARE can be activated by diverse inducers, including phenolic antioxidants, hydroperoxides, Michael reaction acceptors, quinones, isothiocyanates, flavonoids, 1,2-dithiole-3-thione, heavy metals, trivalent arsenic derivatives, carotenoids, and other conjugated polyenes (Rushmore et al. 1991; Presteria et al. 1993; Dinkova-Kostova et al. 2002; Nguyen et al. 2003). Nrf2 is the principal regulator of this major cellular antioxidant mechanism. Nrf2 binds to the ARE sequence and activates the transcription of target genes (Itoh et al. 1997; Ishii et al. 2002).

Nrf2 is a basic leucine zipper, a member of the cap ‘n’ collar family of transcriptional factors (Shen et al. 2004) (Fig. 2). Under homeostatic conditions, Nrf2 is in the cytoplasm of the cell, attached to an actin-binding cytosolic protein named Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) (Lee et al. 2007). Keap1 acts as a repressor, maintaining Nrf2 in the cytoplasm and enhancing Nrf2 degradation by the proteasome (Lo and Hammink 2006). Exposure to electrophiles and reactive oxygen species (ROS), among others, causes the Nrf2 Keap1 complex to uncouple, leading to the translocation of Nrf2 to the nucleus. Once in the nucleus, it can dimerize with others transcription factors such as members of the small musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen (maf) family (Motohashi et al. 2004), the Jun family (Venugopal and Jaiswal 1998; Jeyapaul and Jaiswal 2000), polyamine modulated factor 1 (PMF1) (Wang et al. 2001), or activating transcription factor 4 (ATF4) (He et al. 2001). Heterodimers bind to the antioxidant response element, which causes the subsequent

transcriptional activation of phase II detoxifying enzymes and antioxidants (Fig. 3) (Owuor and Tony-Kong 2002).

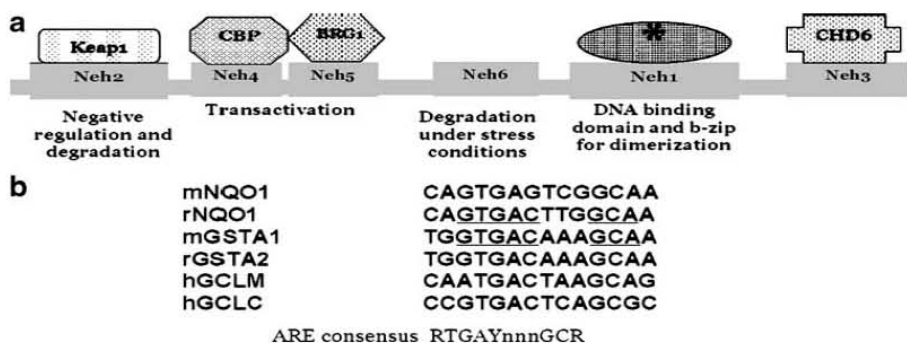
It is clear that the Nrf2 Keap1 pathway plays a critical role in the cell’s defense against oxidative stress. Nrf2 is the central mediator for protection against ROS and electrophiles by the expression of antioxidants and detoxifying enzymes, even at low levels of electrophiles or oxidative stress (Motahashi et al. 2002; Kobayashi and Yamamoto 2005). This has been established in studies with Nrf2-knockout mice. Nrf2-null mice fail to induce the transcription of antioxidants and phase II enzymes (Chanas et al. 2002; Thimmulappa et al. 2002); moreover, they are more susceptible to xenobiotics, like butylated hydroxytoluene (Chan and Kan 1999), acetaminophen (Enamoto et al. 2001; Chan et al. 2001), aflatoxin B1 (Jowsey et al. 2003), cigarette smoke (Knörr-Wittmann et al. 2005), and metals (He et al. 2006, 2007; Lewis et al. 2006; Casalino et al. 2007).

The activation of the Nrf2 pathway could be a crucial regulator of the oxidative DNA damage that is induced by air pollutants (Rojas et al. 2000; Hayes and McMahon 2000; Lee and Shur 2005; Jeong et al. 2006; Tovalin et al. 2006; Braüner et al. 2007; Roubicek et al. 2007; Singh et al. 2007). Thus, the aim of this paper is to review the role of the Nrf2 pathway against exposure to air pollutants. Metals and cigarette smoke are not included in this review.

### 3 Particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbon role in Nrf2 pathway

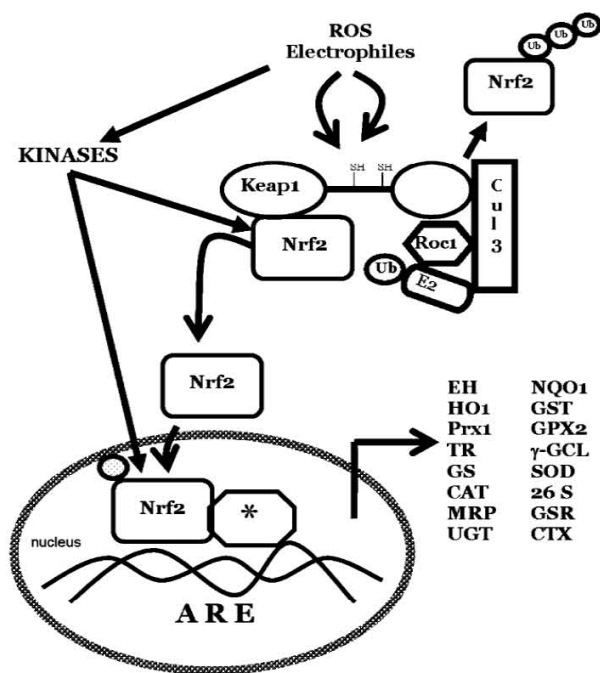
#### 3.1 Particulate matter

Particulate matter is a complex mixture of different components that can be characterized by their origin (e.g., anthropogenic or



**Fig. 2** **a** Functional domains of Nrf2. By comparing the human chicken Nrf2 protein sequence, six Nrf2–ECH homology (*Neh*) domains have been identified (*Neh1–Neh6*). *Neh1* is the basic DNA-binding domain and the leucine zipper for heterodimerization. *Neh2* interacts with Keap1, which negatively regulates Nrf2 and regulates ubiquitination degradation (Kobayashi et al. 2004; Tong et al. 2006). *Neh3* is important for transcriptional activity; it has been suggested

that it might be involved in protein–protein interactions (Nioi et al. 2005). *Neh4* and *Neh5* bind to CREB{cAMP-Response element binding protein-1}-binding protein (*CBP*) and Brahma-related gene 1 (*BRG1*) for transactivation activity of Nrf2 (Katoh et al. 2001; Zhang et al. 2006, 2007). The *Neh6* domain controls the degradation of Nrf2 during stress conditions (McMahon et al. 2004). **b** ARE consensus sequence (modified from Nioi et al. 2003)



**Fig. 3** Nrf2–Keap1 pathway. Exposure to electrophilic compounds and ROS or the activation of different kinases frees Nrf2 from Keap1. It translocates into the nucleus where it dimerizes and activates the transcription of target genes. *ARE* antioxidant response element, *EH* epoxide hydrolase (Hu et al. 2006), *NQO1* NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (Dhakshinamoorthy and Jaiswal 2000), *HO1* heme oxygenase 1 (Srisook et al. 2005), *Prx1* peroxiredoxin 1 (Kim et al. 2007), *GST* glutathione *S*-transferase Ya Yc (Rangasamy et al. 2004), *GPX2* glutathione peroxidase 2 (Banning et al. 2005), *TR* thioredoxin reductase (Sakurai et al. 2005), *γ-GCL* *g*-glutamyl cysteine synthetase modifier subunit catalytic subunit (McMahon et al. 2001), *GS* glutathione synthetase (Lee et al. 2005b), *SOD* superoxide dismutase (Kwak et al. 2001), *MRP1* multidrug resistance protein 1 (Hayashi et al. 2003), *GSR* glutathione reductase (Zhu et al. 2005), *UGT* UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (Yueh and Tukey 2007), *CTx* cysteine/glutamate transporter (Sasaki et al. 2002), *26S* subunit of proteasome (Kwak and Kensler 2006), *asterisk* small maf family member, *ATF4* PMF1 or a member of the Jun family

geogenic), source (e.g., combustion particles), and chemical properties (e.g., solubility) (Englert 2004). Airborne particulate matter (PM) includes particles of three different sizes. Particles that have an aerodynamic diameter below 10  $\mu\text{m}$  are called PM10, particles with small diameters  $<0.1 \mu\text{m}$  are referred to as ultrafine particles, while particles between 2.5 and 0.1  $\mu\text{m}$  are named PM2.5. Diesel exhaust particles (DEPs) are the major component of ambient fine particles. From the total mass of PM10 found in an urban area, DEPs account for 80% of it (Bérubé et al. 2007). DEPs consist of a carbonaceous core in which many toxic compounds are absorbed, like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitroderivatives of PAH, oxygenated derivatives of PAH

(ketones, quinones, and diones), heterocyclic compounds, aliphatic hydrocarbons, and metals (Takizawa 2004).

Exposure to particulate matter is argued to produce oxidative stress (Hiura et al. 1999; Donaldson et al. 2003; Li et al. 2003; Zhang et al. 2007) and proinflammatory responses (Diociaiuti et al. 2001; Li et al. 2002; Finnerty et al. 2007; Mills et al. 2007). It is recognized that mild oxidative stress that is generated by exposure to small quantities of PM (e.g., 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) induces phase II enzymes. Little is known about how this activation takes place. Li and Nel (2006) proposed that, at low concentrations of DEP, Nrf2 is activated and, subsequently, all of its target genes, including phase II enzymes.

The first study that reported Nrf2 activation after DEP exposure was Li et al. (2000). In this study, they used an ARE enhancer, as an indicator of Nrf2 activation, that was fused to the luciferase gene and changes into a known Nrf2 effector, heme oxygenase 1 (HO-1), in murine macrophages. After exposure to 25 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DEPs, they observed increased luciferase activity and induction of HO-1. The regulatory sequence in this enhancer has a xenobiotic response element (XRE) inside the ARE sequence. AP-1 is a transcription factor that responds to oxidative stress caused by DEP exposure (Zhang et al. 2004; Pourazar et al. 2005). To elucidate that the induction of HO-1 and the increase in luciferase activity were the result of Nrf2 activation and eliminate the possibility that another regulator region in the promoter was responsible, the authors mutated the AP-1 and the Nrf2 binding sites in this enhancer. The loss of effects by DEP exposure in the mutated Nrf2 binding site but not in the AP-1 binding site demonstrated that Nrf2 was responsible for the increase in luciferase activity after DEP exposure. This was separately confirmed by Baulig et al. (2003) using the electrophoretic mobility shift assay. In this study, they demonstrated that AP-1 did not bind to the ARE consensus sequence in the promoters of glutathione *S*-transferase (GST) or NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) after DEP exposure. In addition, they showed a dose effect between DEP concentration and nuclear protein binding to the ARE probes. Wan and Díaz-Sánchez (2006) also reported dose-dependent responses in the activity of a reporter gene (luciferase) fused to the ARE promoter as a consequence of exposure to extracts of DEP. Additionally, Baulig et al. (2003) probed Nrf2 activation by immunocytochemistry, showing Nrf2 translocation into the nucleus of the cell. Similar results were obtained by Li et al. (2004). Not only did the authors observe nuclear translocation of Nrf2, they observed that total Nrf2 protein concentration increased, even though they did not detect changes at the mRNA level. The authors suggested that this is the result of posttranslational modifications in the Nrf2 protein. Moreover, they proposed that the lifetime of the Nrf2 protein lengthens after DEP exposure.

Exposure to diesel exhaust particles produces oxidative stress (Gonzalez-Flecha 2004; Risom et al. 2005), which could activate the Nrf2–Keap1 pathway (Reddy et al. 2007). Of the articles reviewed, Li et al. (2000) described a lack of HO-1 induction when cells were treated with DEPs and two ROS scavengers, *N*-acetyl cysteine and luteine. In addition, Wan and Díaz-Sánchez (2006) observed the inhibition of reporter gene activity when they treated cells with *N*-acetyl cysteine and DEP. Likewise, Aoki et al. (2001) demonstrated an increase in DNA adduct formation and the presence of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biomarker for oxidative damage, after diesel exhaust exposure in Nrf2-knockout mice. Furthermore, Baulig et al. (2003) showed the production of ROS in airway epithelial cells treated with DEP. In addition, male ApoE<sup>-/-</sup> mice exposed to ultrafine particulate matter induced lipid peroxidation in the liver, along with an increase in Nrf2, phase II, and antioxidant enzyme gene expression (Araujo et al. 2008). From the results discussed above, it can be deduced that the activation of the Nrf2–Keap1 pathway after DEP exposure is due to the production of ROS and the generation of oxidative stress.

### 3.2 Polycyclic aromatic hydrocarbons

There are many compounds present in diesel exhaust. The organic phase is composed of VOCs, such as

benzene and xylene, and nonvolatile compounds, like PAHs and halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs) (Schwarze et al. 2006). It has been established that the organic extraction, composed primarily of PAHs, is responsible for Nrf2 activation and phase II enzyme induction. Although there is also induction of these enzymes with the polar fraction of DEPs, the induction is not present with the aliphatic one (Li et al. 2000, 2004; Baulig et al. 2003) (Table 1).

Most of the articles that have been reviewed, in which Nrf2 is activated after exposure to PAHs, used benzo[a]pyrene as a toxic stimulus (Table 2). Ramos-Gómez et al. (2001 and 2003) and Fahey et al. (2001) demonstrated that Nrf2-null mice exposed to benzo[a]pyrene increased forestomach tumor formation greater than wild-type mice. The authors used potent phase II inducers and chemopreventive compounds, olipraz (Ramos-Gómez et al. 2001, 2003) and sulforaphane (Fahey et al. 2001), to protect against benzo[a]pyrene toxicity. In Nrf2-null mice, this protection was lost; not only did the null mice produce more tumors than the wild-type mice, they lacked induction of phase II enzymes, NQO1, and GST. On the other hand, Aoki et al. (2007) showed that the loss of Nrf2 increased the mutagenic activity of benzo[a]pyrene. In this paper, the phosphoribosyltransferase (*gpt*) delta mouse model was used. In this model, the *gpt* gene is integrated in the genome of Nrf2<sup>+/+</sup> mice and Nrf2<sup>-/-</sup> mice to detect

**Table 1** Particulate pollutants as Nrf2 pathway inducers

Pollutant	Organism or cell model	Concentration	Observations	Reference
Diesel exhaust particles	Raw264.7 (murine macrophages)	0–50 µg/mL	ARE-dependent induction of HO-1 luciferase reporter gene	Li et al. 2000
Diesel exhaust	Lung of Nrf2 <sup>+/-</sup> and Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	3 mg/m <sup>3</sup> as SPM	Increased relative DNA adduct formation and oxidative DNA damage in Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	Aoki et al. 2001
Diesel exhaust particles	Alveolar macrophages from male Sprague–Dawley rats	10 µg/mL	Increased gene expression of phase II enzymes (HO-1, TDPX2, GSTP)	Koike et al. 2002
Diesel exhaust particles	Primary cultures of nasal cell line 16HBE	0–150 µg/mL	Nrf2 nuclear translocation and increased NQO1 expression	Baulig et al. 2003
Diesel exhaust particles	Raw264.7 (murine macrophages), human bronchoepithelial cells (BEAS2B) and macrophages of Nrf2 <sup>-/-</sup>	25–50 µg/mL	Nrf2 translocation, increased phase II enzyme expression (e.g., GSTYα, UGT1A6) in Raw264.7 and BEAS2B Lost induction of HO-1 expression in macrophages of Nrf2 <sup>-/-</sup>	Li et al. 2004
Diesel exhaust extracts	Purified B lymphocytes, PBMC and DG75 cell line	0–20 µg/mL	Increased NQO1 expression	Wan and Diaz-Sanchez 2006
Fine and ultrafine particulate matter	Apo E <sup>-/-</sup> male mice	FP=438.29 µg/m <sup>3</sup> UFP=112.61 µg/m <sup>3</sup>	Increased gene expression of Nrf2, antioxidants (e.g., SOD2), phase II enzymes (e.g., NQO1)	Araujo et al. 2008

*ARE* antioxidant response element, *HO-1* heme oxygenase 1, *SPM* suspended particulate matter, *TDPX2* thioredoxin peroxidase 2, *GSTP* glutathione *S*-transferase P subunit, *NQO1* NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *GSTYα* glutathione *S*-transferase isoform Yα, *UGT1A6* UDP-glycosyl transferase 1A6, *PBMC* peripheral blood mononuclear cells, *FP* fine particulate matter, *UFP* ultrafine particulate matter, *SOD2* superoxide dismutase isoform 2

mutations. The authors found that the loss of Nrf2 increased the rate of spontaneous mutations threefold. As well, exposure to benzo[a]pyrene caused a rise in mutation frequency. These results demonstrated that the loss of Nrf2 caused susceptibility to carcinogenic compounds. In a recent study, Garg et al. (2008) established that pretreatment of mice with curcumin reduced the toxic effects of benzo[a]pyrene. They demonstrated the ability of curcumin to activate Nrf2 and, subsequently, phase II enzymes. The activation of Nrf2 reduced the oxidative DNA damage produced by the treatment with benzo[a]pyrene.

Baulig et al. (2003) tested different common PAHs at similar concentrations present in diesel exhaust particles (Table 2). Of the compounds tested, only phenanthrene and 1-nitropyrene produced an increase in ROS concentration. Although their capacity to activate Nrf2 was not assayed,

the generation of ROS might suggest a mechanism of toxicity of these PAHs. In addition, primary hepatocytes from Nrf2<sup>-/-</sup> mice exposed to 9,10-phenanthraquinone, a quinone produced from phenanthrene oxidation, lost cell viability. The authors commented in unpublished data that 9,10-phenanthraquinone was able to activate Nrf2 in vitro (Taguchi et al. 2008). These results are important because phenanthrene is the most abundant PAH in gasoline and diesel (Cheng et al. 2004).

Butadiene soot (BDS) is generated during the combustion of 1,3-butadiene, a volatile organic compound. BDS is rich in particles that can absorb PAHs. Microarray analysis of human bronchoepithelial cells (BEAS-2B) exposed to BDS showed upregulation of Nrf2-associated genes (Murphy et al. 2008). The authors suggested that an increase in cellular oxidative stress was the result of exposure to BDS.

**Table 2** PAHs as Nrf2 pathway inductors

Pollutant	Organism or cell model	Concentration	Observations	Reference
Benzo[a]pyrene	Nrf2 wild-type and Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	120 mg/kg	Increased forestomach tumors in Nrf2 <sup>-/-</sup> mice after treatment	Ramos-Gomez et al. 2001
Benzo[a]pyrene	Nrf2 wild-type and Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	120 mg/kg	Nrf2 wild-type reduce forestomach formation	Fahey et al. 2001
Benzo[a]pyrene	Nrf2 wild-type and Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	100 mg/kg	Increased DNA adduct formation in Nrf2 <sup>-/-</sup> mice.	Ramos-Gomez et al. 2003
Phenanthrene	Primary cultures of nasal cells and cell line 16HBE	20 nM	Phenanthrene and 1-nitropyrene produces an increase of ROS levels	Baulig et al. 2003
Fluoranthene		10 nM		
Chysene		3 nM		
Pyrene		10 nM		
Benzo[a]pyrene		0.5 nM		
1-Nitropyrene		4 nM		
Benzo[a]pyrene	Lungs of Nrf2 <sup>+/-</sup> ; gpt Nrf2 <sup>-/-</sup> ; gpt mice	1 mg	Increased mutations in the lungs of Nrf2-deficient gpt mice	Aoki et al. 2007
Benzo[a]pyrene	Male Swiss albino mice	Pretreatment: curcumin 0.01–0.05% diet Treatment: benzo[a]pyrene: 1 mg	Nrf2 nuclear translocation Increased Nrf2 protein Increase in mRNA, protein activity of GSTY and NQO1	Garg et al. 2008
Butadiene soots	Human bronchoepithelial cells (BEAS-2B)	20 µg/mL	Upregulation of Nrf2 target genes (e.g., NQO1)	Murphy et al. 2008
9,10-Phenanthraquinone	Primary hepatocytes from Nrf2 wild-type and Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	50 µM	Loss of cell viability in Nrf2 <sup>-/-</sup> hepatocytes	Taguchi et al. 2008
2,3,7,8-Tretachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	Human hepatoma cells, HepG2	0.1–1 nM	ARE-reporter gene induction Overexpression of Nrf2 Binding of Nrf2 to ARE	Park and Rho 2002
2,3,7,8-Tretachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	Mouse embryonic fibroblasts from Nrf2 <sup>-/-</sup> mice	1 nM	Loss of induction of NQO1 gene expression	Ma et al. 2004

*Gpt* phosphoribosyl transferase, *GSTY* glutathione *S*-transferase isoform Y, *NQO1* NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *ARE* antioxidant response element



There are reports of exposure to PAHs that are not atmospheric pollutants that can activate Nrf2. Exposure to 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene increases skin tumor formation in Nrf2-knockout mice (Xu et al. 2006). Also, it has been reported that exposure to trans-stilbene oxide, a synthetic proestrogen, induces phase II enzymes via the Nrf2 pathway (Slitt et al. 2006). 3-Methylcholanthrene (3-MC) is a potent inducer of phase II enzymes. It has been found that Nrf2-null mice lose the ability to induce these enzymes after treatment with 3-MC (Kwak and Kensler 2006). Furthermore, compounds like *tert*-butylhydroquinone, a metabolite of butylated hydroxyanisole, and  $\beta$ -naphthoflavone are some of the most potent inducers of the Nrf2 pathway (Ng et al. 1998; Moinova and Mulcahy 1999; Wild et al. 1999; Keum et al. 2006; Yuan et al. 2006). Even though these compounds are not atmospheric compounds, they share similar chemical structures and can be used as models for the ability of PAH to induce an antioxidant response.

HAHs are compounds that enter the atmosphere from combustion and industrial processes, like production of organochlorine products (e.g., herbicides), bleaching of paper, and incineration of waste (Lohmann and Jones 1998; Arisawa et al. 2005). The term dioxin or dioxin-like compound represents an individual or a mixture of these compounds: polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenols. The dioxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is one of the most toxic and studied dioxins (EPA 2006). This dioxin is known to produce ROS and oxidative damage in lipids and DNA (Muhammadpour et al. 1988; Stohs 1990; Alsharif et al. 1994). Park and Rho (2002) reported the induction of an ARE-reporter gene by TCDD in the human hepatoma cell line HepG2. Mutations in the ARE sequence inhibited the induction by TCDD. Moreover, the overexpression of Nrf2 in these cells treated with TCDD caused a major increase in the induction of the ARE-reporter gene. The authors concluded that the ARE element in the promoter of the superoxide dismutase isoform 1 gene is functional and that it can activate the transcription mediated by Nrf2. Similar results were obtained by Ma et al. (2004). In this study, mouse embryonic fibroblasts from Nrf2-null mice lost the capability to induce NQO1 gene expression after treatment with TCDD. The authors suggested that TCDD treatment increases ROS production and consequently activates the Nrf2 pathway.

It is clear that exposure to DEPs or compounds that are present in them causes the activation of the Nrf2–Keap1 pathway. This response can also be seen in concentrations that are not cytotoxic for the organism. This activation protects the cells against the effects of these pollutants by raising the protein concentration of phase II enzymes, detoxifying enzymes, and antioxidants.

#### 4 Gaseous pollutant inducers of the Nrf2 pathway

As was mentioned before, gaseous atmospheric pollutants include ozone, nitrogen oxides, carbon monoxide, sulfur dioxide, and VOCs.

##### 4.1 Ozone

Ozone (O<sub>3</sub>) is a powerful oxidant produced by photochemical reactions involving hydrocarbons and nitrogen oxides (Devlin et al. 1996). Exposure to this pollutant causes reactive species, such as aldehydes, hydrogen peroxides, and singlets of oxygen, hydroxyl, and organic radicals (Lee et al. 2003). Therefore, ozone toxicity is the result of the establishment of oxidative stress (Foucard et al. 2006). It is acknowledged that genetic variability among phase II enzymes provides susceptibility against ozone exposure (Cho and Kleeberger 2007; Hollingsworth et al. 2007), although how ozone affects its regulation by Nrf2 is not established. Kim et al. (2004) monitored Nrf2 induction after ozone treatment. They observed that, after chronic exposure of 0.5 ppm in the liver and lungs of B6C3F1 mice, total Nrf2 protein concentration was increased. On the other hand, when they exposed mice to a combination of ozone, 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, and dibutyl phthalate, the induction was lost. In this paper, the authors focused on different stress response factors and did not report results relating Nrf2 and ozone exposure. Recently, data from our laboratory, working with male mice exposed to ozone by inhalation (0.11 ppm), showed an increase in Nrf2 mRNA and protein in kidney with a concomitant overexpression of HO-1; however, we did not find any change in the pathway in the lung or liver (Rubio et al., in preparation).

##### 4.2 Nitrogen oxides

Nitrogen oxides that yield the formation of nitrogen dioxide are emitted primarily by motor vehicles (WHO 2003). Nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) is an oxidant species (Kelly and Tetley 1997). Exposure to it produces ROS that cause oxidation of membrane constituents (Versor and Postlewait 1997). It can increase the enzymatic activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase (Persinger et al. 2002) and the mRNA, protein level, and activity of  $\gamma$ -glutamyl transferase (Takahashi et al. 1997). There are no reports linking Nrf2 activation and exposure to nitrogen dioxide; however, there are many studies that establish Nrf2 activation by endogenous and exogenous nitric oxide (NO). NO is a molecule that participates in several physiological functions, like apoptosis and proliferation, inflammation, and microbial defense signaling activity in vivo and in vitro (Pae et al. 2004). NO-donor compounds,

like *S*-nitroso-*N*-acetyl-penicillamine (Park and Kim 2005), spermine NONate (Buckley et al. 2003), sodium nitroprusside, Angeli's salt (Liu et al. 2007), inducers of inducible nitric oxide synthetase like lipopolysaccharide (Ashino et al. 2007), and NO-donating aspirin (Gao et al. 2005), provoke Nrf2 translocation to the nucleus, Nrf2 protein accumulation, and induction of phase II enzymes, such as HO-1, GST, and NQO1. ARE activation via Nrf2 protects against NO toxic effects, like apoptosis (Dhakshinamoorthy and Porter 2004; Li and Wogan 2005). Moreover, peroxy-nitrite, another reactive nitrogen species, produces the induction of the Nrf2–Keap1 pathway (Kang et al. 2002). Park and Kim (2005) showed that treatment with 3-morpholinonydnonimene hypochloride (SIN-1), a peroxy-nitrite-induced compound, generates Nrf2 translocation to the nucleus and its coupling to ARE. Similar to NO, this activation protects cells against peroxy-nitrite-induced apoptosis (Li et al. 2006). Therefore, the Nrf2–Keap1 pathway responds not only to oxidative stress but also to nitrosative stress, and this response protects organisms against these molecules (Li and Wogan 2005).

#### 4.3 Carbon monoxide

Carbon monoxide (CO) is a gaseous molecule known to be toxic and lethal to living organisms at high concentrations. However, CO has recently been studied as a regulatory molecule (Song et al. 2004). Exposure to low concentrations of exogenous or endogenous CO (produced by HO-1 catabolism) has antiapoptotic, anti-inflammatory, antiproliferative, and cytoprotective effects (Nakao et al. 2003; Ryter et al. 2002). Nevertheless, the cytoprotective mechanism of CO is not well understood. Lee et al. (2006) reported that exposure of HepG2 cells to gaseous CO and tricarbonyl dichlororuthenium (II) dimmer induced HO-1 and Nrf2 nuclear translocation and increased activity of an ARE-luciferase reporter gene. Similar results were obtained by Li et al. (2007) in PC12 cells. They observed induction of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCL) and nuclear translocation and ARE binding of Nrf2, as well as ROS production after treatment with a CO-releasing molecule. They proposed that exposure to toxic compounds such as SIN-1, a compound that yields peroxy-nitrite, causes the induction and production of CO. CO produces ROS, and this activates the Nrf2–Keap1 pathway and induces the expression of  $\gamma$ -GCL, which protect the cell from toxic exposure.

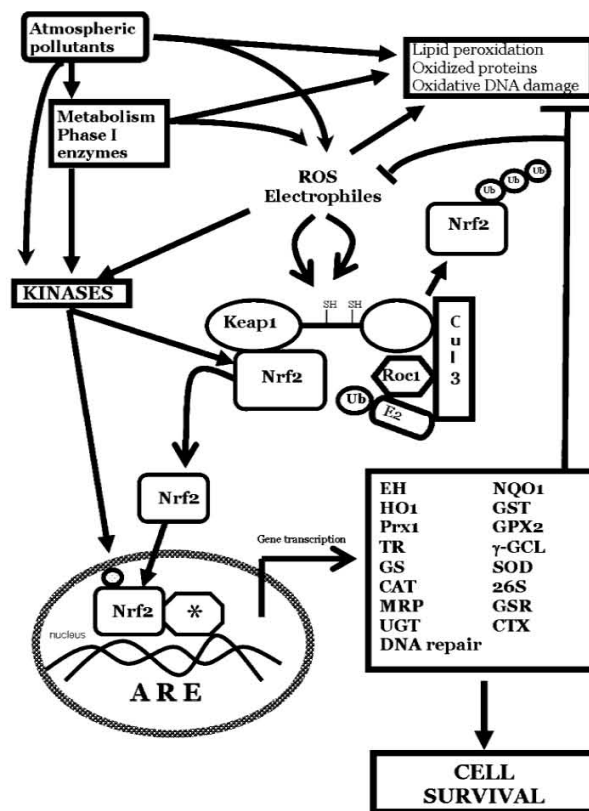
#### 4.4 Volatile organic compounds

Of the literature reviewed, there are no reports of induction of the Nrf2–Keap1 pathway by exposure to sulfur dioxide and VOCs, although Li et al. (2000, 2004) reported that

exposure to quinones that are present in the polar fraction of DEPs produced the activation of this pathway. Benzene, a known VOC and human carcinogen (Powley and Carlson 1999), forms quinones as products of its metabolism (Gaskell et al. 2005). Some of these quinones are potent redox compounds that can enter enzymatic or nonenzymatic redox cycling and produce ROS, such as superoxide anion radicals (Bolton et al. 2000). Meanwhile, we found moderate activation of Nrf2 in kidneys in male mice when they were exposed to a VOC mixture (including benzene, toluene, *m*-xylene, *o*-xylene, *p*-xylene, ethylbenzene, and ethyl *tert*-butyl ether) with a concomitant increase in the protein level of HO1. The formation of these radicals can stimulate the Nrf2 pathway.

### 5 Conclusions

Exposure to atmospheric pollutants produces several toxic effects. Some pollutants are potent oxidants that can react



**Fig. 4** Nrf2 induction by atmospheric pollutants. Exposure to atmospheric pollutants or its metabolites produces Nrf2 activation or kinase activation that could activate the Nrf2 pathway, given as resulting in an increase of cell survival. *asterisk* small maf family member, *ATF4* PMF1 or a member of the Jun family

directly with diverse cellular components and destroy several physiological functions. On the other hand, some of these pollutants go through a series of metabolic reactions in order to be detoxified and excreted. These reactions involve chemical modifications, like oxidation, to increase the solubility of the original compound so that it can be excreted (Shimada 2006). During these metabolic reactions, many reactive intermediates, particularly ROS, are produced. To counteract the presence of reactive molecules, the cell induces phase II enzymes and antioxidants that, via conjugation reactions, inactivate the reactive molecules (Shih et al. 2007). Therefore, this induction represents the primary defense mechanism against oxidant pollutants, and the crucial regulator of this defense mechanism is Nrf2. This transcription factor is activated following exposure; it separates from its cytoplasmic inhibitor, Keap1, translocates into the nucleus of the cell, and induces the transcriptional activation of phase II enzymes and antioxidants (Fig. 4) (Higgins et al. 2008). Nrf2 regulates the expression of numerous cytoprotective genes that function to detoxify reactive species (Osburn and Kensler 2007), and it is clear from the papers highlighted in this review that Nrf2 has an important role in the defense against atmospheric pollutant-induced toxicity.

Our understanding of the molecular mechanisms underlying the Nrf2 pathway has increased enormously since 1994; however, it is still incomplete. Further studies are needed to understand the signaling events that turn on the system in response to atmospheric pollutant stress. This could allow the possibility of targeting the pathway for prevention benefits in the near future.

**Acknowledgements** This paper was partially supported by DGAPA grant number IN212107. RV is a recipient of a CONACyT fellowship. A professional scientific editor at Blue Pencil Science (Sean T. Kim, Ph.D.) was consulted during the preparation of this manuscript.

## References

- Alsharif NZ, Schlueter WJ, Stohs SJ (1994) Stimulation of NADPH dependent reactive oxygen species formation DNA damage by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat peritoneal lavage cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 26:392–397
- Aoki Y, Sato H, Nishimura N, Takahashi S, Ito K, Yamamoto M (2001) Accelerated DNA adduct formation in the lungs of Nrf2 knockout mouse exposed diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* 173:154–160
- Aoki Y, Hashimoto AH, Amanuma K, Matsumoto M, Hiyoshi K, Takano H, Masumura K, Itoh K, Noumi T, Yamamoto M (2007) Enhanced spontaneous benzo[a]pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient-gpt delta mice. *Cancer Res* 67:5643–5648
- Araujo A, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett B, Gong KW, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lusis AJ, Nel AE (2008) Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis systemic oxidative stress. *Circ Res* 102:589–596
- Anisawa K, Takeda H, Mikasa H (2005) Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs its potential health effects: a review of epidemiologic studies. *J Med Invest* 52:10–21
- Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T (2004) Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review meta-analysis. *Environ Health Perspect* 112:970–978
- Ashino T, Yamanaka R, Yamamoto M, Shimokawa H, Sekikawa K, Iwakura Y, Shiod S, Numazawa S, Yoshida T (2007) Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthetase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages. *Mol Immunol* 45(7):2106–2115
- Atariu JM, O'Halloran K, Gooneratne R (2007) Hepatic and immune biological effect assay in C57BL/6 mice to measure polycyclic aromatic hydrocarbons bioavailability under laboratory exposures with increasing environmental relevance. *Sci Pollut Res* 14(4):256–265
- Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohe R (2005) The GI-GPX gene is target of Nrf2. *Mol Cell Biol* 25:4914–4923
- Baulig A, Garlati M, Bonvallot V, March A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A (2003) Involvement of relative oxygen species in the metabolic pathway triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L671–L679
- Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F (2004) Ozone short-term mortality in 95 US urban communities, 1987–2000. *J Am Med Assoc* 292:2372–2378
- Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams B (2004) Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 114:1116–1123
- Bérubé K, Balharry D, Sexton K, Koshy L, Jones T (2007) Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:1044–1055
- Beveler M, Mayette J, Whittaker LA, Pareglio SA, Jones CC, Robbins J, Hemenway D, Akira S, Uematsu S, Poynter ME (2007) Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol* 179:3680–3688
- Bhatnagar A (2006) Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution heart disease. *Circ Res* 99:692–705
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13:135–160
- Borja-Aburto VH, Loomis DP, Bangdiwala SJ, Shy CM, Rascon-Pacheco RA (1997) Ozone, suspended particulates daily mortality in Mexico City. *Am J Epidemiol* 145:258–268
- Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S, Loomis DP (1998) Mortality ambient fine particles in southwest México City, 1993–1995. *Environ Health Perspect* 106:849–855
- Braüner EV, Forchhammer L, Moller P, Simosen J, Glasius M, Wahlin P, Raaschou-Nielsen O, Loft S (2007) Exposure to ultrafine particles from ambient air oxidative stress-induced DNA damage. *Environ Health Perspect* 115:1177–1182
- Brunekreef B, Holgate ST (2002) Air pollution health. *Lancet* 360:1233–1242
- Buckley BJ, Marshall ZM, Whorton AR (2003) Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 307:973–979
- Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, García R, Gambling TM, Osnaya N, Monroy S, del Tizapantzi MR, Carson JL, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B (2002) Air pollution brain damage. *Toxicol Pathol* 9:1029–1054
- Campbell A (2004) Inflammation, neurodegenerative diseases environmental exposure. *Ann N Y Acad Sci* 1035:117–132
- Casalino E, Calzavetti G, Lriscina M, Sblano C, Fabiano A, Lriscina C (2007) The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or

- manganese intoxicated rats: comparison with the toxic effect on NAD(P) H: quinone reductase. *Toxicology* 237:24–34
- Chan K, Kan YW (1999) Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12731–12736
- Chan K, Han XD, Kan YW (2001) An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8:4611–4616
- Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan L, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2002) Loss of the Nrf2 transcription factors causes a marked reduction in constitutive inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3*, *Gstm4* genes in livers of male female mice. *Biochem J* 365:405–416
- Chauhan A, Johnston SL (2003) Air pollution infection in Respiratory illness. *Br Med Bull* 68:95–112
- Chen TM, Shofer S, Gokhale J, Kuschner WG (2007) Outdoor pollution overview historical perspectives. *Am J Med Sci* 333:230–234
- Cheng YM, Lee WW, Li CH, Lee CC, Kang JJ (2004) Genotoxicity of motorcycle exhaust particles in vivo in vitro. *Toxicol Sci* 81:103–111
- Cho XY, Kleeberger SR (2007) Genetic mechanisms of susceptibility to oxidative lung injury in mice. *Free Radic Biol Med* 42:433–445
- Comhair SA, Erzurum SC (2002) Antioxidant Response to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L246–L255
- Curtis L, Rea W, Smith-Willis P, Fenyves E, Pan Y (2006) Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environ Int* 32:815–830
- De Bruin YB, Koistinen K, Kaphalopoulos S, Geiss O, Tirendi S, Kotzias D (2008) Characterization of urban inhalation exposures to benzene, formaldehyde and acetaldehyde in the European Union. *Environ Sci Pollut Res* 15:417–430
- Devlin RB, McDonnell WF, Becker S, Madden MC, McGee MP, Perez R, Hatch G, House DE, Koren HS (1996) Time-dependent changes of inflammation mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:176–185
- Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK (2000) Small Maf (MafG MafK) proteins negatively regulate antioxidant Response element-mediated expression antioxidant induction of the NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1 gene. *J Biol Chem* 276:40134–40141
- Dhakshinamoorthy S, Porter AG (2004) Nitric-oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant Response element counteracts apoptosis in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 279:20096–20107
- Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talay P (2002) Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3404–3409
- Diociaiuti M, Balduzzi M, De Berardis B, Cattani G, Stacchini G, Ziemack G, Marconi A, Paoletti L (2001) The two PM2.5 (fine) PM2.1–10 (coarse) fractions: evidence of different biological activity. *Environ Res* 86:254–262
- Donaldson K, Stone V, Borm PJA, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux S, Brown DM, MacNee W (2003) Oxidative stress calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* 34:1369–1382
- Efstathiou M, Varotsos CA, Kondratyev KY (1998) An estimation of the surface solar ultraviolet irradiance during an extreme total ozone minimum. *Meteorol Atmos Phys* 68:171–176
- Enamoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M (2001) High sensitivity of the Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes antioxidant genes. *Toxicol Sci* 59:169–177
- Englert M (2004) Fine particles human health—a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett* 149:235–242
- EPA (2006) Health risk form dioxin related compounds: evaluation of the EPA reassessment. Environmental Protection Agency National Academy Press
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Schotus I, Stephenson KK, Talay P, Lorzniwski A (2001) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci* 99:7610–7615
- Ferm M, De Santis F, Varotsos C (2005) Nitric acid measurements in connection with corrosion studies. *Atmos Environ* 39(35):6664–6672
- Ferm M, Watt J, O'Hanlon S, De Santis F, Varotsos C (2006) Deposition measurement of particulate matter in connection with corrosion studies. *Anal Bioanal Chem* 384(6):1320–1330
- Finnerty K, Choi JE, Lau A, Davis-Gorman G, Diven C, Seaver W, Linak WP, Witten M, McDonagh PI (2007) Instillation of coarse ash particles matter lipopolysaccharide produces a systemic inflammatory response in mice. *J Toxicol Environ Health A* 70:1957–1966
- Foucard L, Krestadt BD, Caval-Gilly P, Falla J (2006) Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells. *Toxicol In Vitro* 20:101–108
- Franchini M, Mannucci PM (2007) Short-term effects of air pollution on cardiovascular diseases: outcome mechanisms. *J Thromb Haemost* 5:2169–2174
- Gao J, Kashfi K, Liu X, Rigas B (2005) NO-donating aspirin induces phase II enzymes in vitro in vivo. *Carcinogenesis* 27:803–810
- Garg R, Gupta S, Maru G (2008) Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I phase II enzymes in benzo[a]pyrene treated mice: mechanism of its anti-initiating action. *Carcinogenesis* 29(5):1022–1032
- Gaskell M, McLuckie KIE, Fomer PB (2005) Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone p-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene toxicity. *Carcinogenesis* 26:673–680
- Gonzalez-Flecha B (2004) Oxidant mechanisms in Response to ambient air particles. *Mol Aspects Med* 25:169–182
- Gopalakrishnan A, Tony-Kong A (2007) Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: Cytoprotection by Nrf2 in normal cells cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- $\kappa$ B AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem Toxicol* 46(4):1257–1270
- Gryparis A, Forsberg B, Katsouyanni K, Analitis A, Toulouni G, Schwartz J, Samoli E, Medina S, Anderson HR, Nicu EM, Whichmann HE, Kasnik M, Skorkovsky J, Vonk JM, Dörtdubak Z (2004) Acute effects of ozone on mortality from the " Air Pollution and Health: A European Approach Project. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1080–1087
- Haddad JJ (2004) Oxygen sensing oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 316:966–977
- Han X, Naeher LP (2006) A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environ Int* 32:106–120
- Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto Sugiyama MY (2003) Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 310:824–829
- Hayes JD, McMahon M (2000) Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 174:103–113
- He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J (2001) Identification of activating transcription factor 4 (ATF-4) as an

- Nrf2-interacting protein: implication of heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 276:20858–20865
- He X, Chen MG, Lin GX, Ma Q (2006) Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 by disrupting Nrf2-Keap1-Cul3 complex recruiting Nrf2-Maf to the antioxidant response element enhancer. *J Biol Chem* 281:23620–23631
- He X, Chen LGX, MG ZJX, Ma Q (2007) Protection against chromium (VI)-induced oxidative stress apoptosis by Nrf2. Recruiting Nrf2 into the nucleus disrupting the nuclear Nrf2/Keap1 association. *Toxicol Sci* 98:298–309
- Heinrich J, Slama R (2007) Fine particles, a major threat to children. *International. J Hyg Environ Health* 210:617–622
- Higgins LG, Cavin C, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2008) Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol kahweol confer protection against acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol* 226(3):328–337
- Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE (1999) Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 163:5582–5591
- Hollingsworth JW, Kleeberger SR, Foster WM (2007) Ozone pulmonary innate immunity. *Proc Am Thorac Soc* 4:240–246
- Hu X, Roberts JR, Apopa PL, Kan YW, Ma Q (2006) Accelerated ovarian failure induced by 4-vinyl cyclohexene diepoxide in Nrf2 null mice. *Mol Cell Biol* 26:940–954
- Ishii T, Itoh K, Yamamoto M (2002) Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzymes genes via antioxidant Response element. *Methods Enzymol* 348:182–190
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzymes genes through antioxidant Response element. *Biochem Biophys Res Commun* 236:313–322
- Jakab GJ, Spannake EW, Canning BJ, Kleeberger SR, Gilmour MI (1995) The effects of ozone on immune function. *Environ Health Perspect* 103:77–89
- Jeong WS, Jun M, Tony-Kong AH (2006) Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid Redox Signal* 8:99–106
- Jeyapaul J, Jaiswal AK (2000) Nrf2 c-JUN regulation of antioxidant Response element (ARE)-mediated expression induction of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Pharmacol* 59:1433–1439
- Jowsey IR, Jiang Q, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2003) Expression of the aflatoxin B1–8, 9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant Response element. *Mol Pharmacol* 64:1018–1028
- Kang KW, Choi SH, Kim SG (2002) Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant Response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthetase in glutathione S-transferase A2 induction. *Nitric Oxide* 7:244–253
- Kang KW, Lee SJ, Kim SG (2005) Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7:1664–1673
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, synergistically activate transcription. *Genes Cell* 6:857–868
- Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopoli Y, Rossi G, Zmirou D, Ballester F, Boumghar A, Anderson HR, Wojtyniak B, Paldy A, Braunstein R, Pekkanen J, Schindler C, Schwartz J (2001) Confounding effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology* 12(5):521–531
- Kelly FJ, Tetley TD (1997) Nitrogen dioxide depletes uric acid ascorbic acid but not glutathione from lung lining fluid. *Biochem J* 325:95–99
- Keum YS, Han YH, Liew C, Kim JH, Xu C, Yuan X, Shakartian MP, Chong S, Kong AN (2006) Induction of the heme oxygenase 1 (HO-1) NAD[P]H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human rat hepatocytes. *Pharma Res* 23:2586–2594
- Kim MY, Song KS, Park GH, Chang SH, Kim HW, Park JH, Jin H, Eu KJ, Cho HS, Kang G, Kim YC, Cho MH (2004) B6C3F1 mice exposed to ozone with 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone or dibutyl phthalate showed toxicities through alterations of NF-kB, AP1, Nrf2 osteopontin. *J Vet Sci* 5:131–137
- Kim JH, Bogner PN, Rammath N, Park Y, Yu J, Park YM (2007) Elevated peroxiredoxin 1, but not NF-E2-related factor 2, is an independent prognostic factor for disease recurrence reduced survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13:3875–3882
- Knörr-Wittmann C, Hengtermann A, Gebel S, Alam J, Müller T (2005) Characterization of Nrf2 activation heme oxygenase-1 expression in NIH3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 39:1438–1448
- Kobayashi M, Yamamoto M (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 7:385–394
- Kobayashi A, Kan MI, Okawa H, Ohtsuiji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for the Cul3-based E3 ligase to regulate proteosomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24:7130–7139
- Koike E, Hirano S, Shimojo N, Kobayashi T (2002) cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in Response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Sci* 67:241–246
- Kondratyev KY, Varotsos CA (1995) Atmospheric ozone variability in the context of global change. *Int J Remote Sens* 16:1851–1881
- Kooter IM (2004) Inventory of biomarkers of oxidative stress. RIVM report 630111001/2004. Available at <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/630111001.pdf>
- Kwak MY, Kensler TW (2006) Induction of 26S proteasome subunit PSMB5 by the bifunctional inducer 3-methylcholanthrene through the Nrf2-ARE but not the AhR/ARNT-XRE pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 345:1350–1357
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Sutter TR, Kensler TW (2001) Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 antioxidative enzymes in vivo by cancer chemoprotective agent, 3H–I, 2-dimethiole-3-thione. *Mol Med* 7:135–145
- Lebowitz MD (1996) Epidemiological studies of the Respiratory effects of air pollution. *Eur Respir J* 9:1029–1054
- Lee JD, Shur YJ (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 224:171–184
- Lee YK, Kim SM, Hans S (2003) Ozone-induced inactivation of the antioxidant enzymes. *Biochimie* 85:947–952
- Lee J, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA (2005a) Nrf2, a multi-organ protector. *FASEB J* 19(9):1061–1066
- Lee TD, Yang H, Whang J, Lu SC (2005b) Cloning characterization of the human glutathione synthetase 5'-flanking region. *Biochem J* 390:521–528
- Lee BS, Heo JH, Kim YM, Shim SM, Pae HO, Kim YM, Chang HY (2006) Carbon monoxide mediates heme oxygenase 1 induction via Nrf2 activation in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343:965–972
- Lee JT, Son JY, Cho YS (2007a) The adverse effects of fine particle air pollution on Respiratory function on the elderly. *Sci Total Environ* 385:28–36

- Lee O, Jan AK, Papusha V, Jaiswal AK (2007b) An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 282(50):36412–36420
- Lewis JB, Messer RL, McCloud VV, Lockwood PE, Hsu SD, Wataha JC (2006) Niquel (III) activates the Nrf2 signaling pathway in human monocytic cells. *Biomaterials* 27:5348–5356
- Lewtas J (2007) Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents mechanisms associated with cancer, reproductive and cardiovascular effects. *Mutat Res* 636(1–3):95–133
- Li N, Nel AE (2006) Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implication for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal* 8:90–98
- Li CQ, Wogan GN (2005) Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* 226:1–15
- Li N, Venkatesan MI, Miguel A, Kaplan R, Gujuluva C, Alam J, Nel AE (2000) Induction of the heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particles quinones via antioxidant response element. *J Immunol* 165:3393–3401
- Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE (2002) Comparison of the pro-oxidative pro-inflammatory effects of organic diesel exhaust particles chemicals in bronchial epithelial cells macrophages. *J Immunol* 169:4531–4541
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel AE (2003) Ultrafine particulate matter induced oxidative stress mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111:455–460
- Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eituguren-Fernex A, Schmitz D, DiStefano E, Slaughter N, Killeen E, Wang X, Huang A, Wang M, Miguel AH, Cho A, Sioutas C, Nel AE (2004) Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages epithelial cells: protecting against the proinflammatory oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol* 173:3467–3481
- Li MH, Cha YN, Surh YJ (2006) Peroxynitrite induces HO-1 expression via PI3K/Akt-dependent activation of NF-E2 related factor 2 in PC12 cells. *Free Radic Biol Med* 41:1079–1091
- Li MH, Jang JH, HK NA, Cha YN, Surh YJ (2007) Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 in response to nitrosative stress induces expression of glutamate-cysteine ligase in PC12 cells via activation of phosphoinositol 3-kinase Nrf2 signaling. *J Biol Chem* 282:29577–28586
- Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Hannik M, Alam J, Durante W (2007) Nitric oxide stimulates heme-oxygenase 1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. *Cardiovasc Res* 75:381–389
- Lo SC, Hannink M (2006) C/EBP-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. *Mol Cell Biol* 26:1235–1244
- Lohmann R, Jones KC (1998) Dioxins furans in air deposition: a review of levels, behavior processes. *Sci Total Environ* 219:53–81
- Ma Q, Kinner K, Bi Y, Chan JY, Kan YW (2004) Induction of the murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap'n'collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) Nrf2 signal transduction. *Biochem J* 377:205–213
- Magas OK, Gunter JT, Regans JL (2007) Ambient air pollution and daily pediatric hospitalizations for asthma. *Environ Sci Pollut Res* 14(1):19–23
- Maisonet M, Correa A, Misra D, Jaakkola JJK (2004) A review of literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environ Res* 95:106–115
- Maitre A, Bonneterre V, Huillard L, Sabatier P, de Gaudemaris R (2006) Impact of urban atmospheric pollution on coronary disease. *Eur Heart J* 27:2275–2284
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LL, Wolf CR, Cavin C, Hayes JD (2001) The Cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) controls both constitutive inducible expression of intestinal detoxification glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* 61:3299–3307
- McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes J (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degrades the redox-insensitive neh6 degrades. *J Biol Chem* 279:31556–31567
- Mills NL, Tomqvist H, Robinson SD, Gonzalez MC, Soderberg S, Strom T, Blomberg A, Newby DE, Donaldson K (2007) Air pollution atherothrombosis inhalation. *Toxicology* 19:81–89
- Monoiva HR, Mulcahy RT (1999) Up-regulation of the human  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase regulatory sub unit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile Responsive element. *Biochem Biophys Res Commun* 261:661–668
- Motahashi H, O'Connor T, Katshoka F, Engel JD, Yamamoto M (2002) Integration diversity in the regulatory network composed of Maf/CNC families of transcription factors. *Gene* 294:1–12
- Motohashi H, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M (2004) Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1–Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6379–6384
- Muhammadpour H, Murray WJ, Stohs SJ (1988) 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced lipid peroxidation in genetically responsive non-responsive mice. *Arch Environ Contam Toxicol* 16:645–650
- Murphy G, Rouse RL, Polk WW, Henk WG, Barker SA, Boudreaux MJ, Floyd E, Penn AL (2008) Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in Respiratory cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(5):532–540
- Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizy T, Cho AMK, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Ma N, Otterbein LE, Murase N (2003) Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 163:1587–1598
- Ng D, Kokot N, Hiura T, Faris M, Saxon A, Nel A (1998) Macrophage activation by polycyclic aromatic hydrocarbons: evidence for the involvement of stress-activated protein kinases, activator protein 1 antioxidant Response element. *J Immunol* 161:942–951
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant Response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:233–260
- Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2003) Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant Response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 374:337–348
- Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 25:10895–10906
- Osburn WO, Kensler TW (2007) Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 659(1–2):31–39
- Owuor ED, Tony-Kong A (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 64:765–770
- Pae HO, Choi BM, Oh GS, Lee MS, Ryu DG, Rhew HY, Kim YM, Chung HT (2004) Roles of heme oxygenase-1 in the anti-proliferative antiapoptotic effects of nitric oxide on Jurkat T cells. *Mol Pharmacol* 66:122–128
- Park EY, Kim SG (2005) NO signaling in ARE-mediated gene expression. *Methods Enzymol* 396:341–349
- Park EY, Rho HM (2002) The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulatory sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem* 24:47–55

- Peden D (2005) The epidemiology genetics of the asthma risk associated with air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 115:213–219
- Persinger RL, Poynter ME, Ckless K, Janssen-Heininger YMW (2002) Molecular mechanism of nitrogen dioxide induced epithelial injury in the lung. *Mol Cell Biochem* 234(235):71–80
- Pourazar J, Mudway IS, SAmet JM, Helleday R, Blomberg A, Wilson SJ, Frew AJ, Kelly FJ, Sstrom T (2005) Diesel exhaust particles activates redox-sensitive factors kinases in human airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L724–L730
- Powley MW, Carlson GP (1999) Species comparison of hepatic pulmonary metabolism of benzene. *Toxicology* 139:207–217
- Prester T, Holtzclaw WD, Zhang Y, Talay P (1993) Chemical molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2965–2969
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3410–3415
- Ramos-Gomez M, McDolan P, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW (2003) Interactive effects of Nrf2 genotype olipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts tumor yield in mice. *Carcinogenesis* 24:461–467
- Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, Biswal S (2004) Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Clin Invest* 114:1248–1259
- Reddy NM, Kleeberger SR, Yamamoto M, Kensler TW, Scollick C, Biswal S, Reddy SP (2007) Genetic dis'ision of the Nrf2-dependent redox signaling regulated transcriptional programs of cell proliferation cytoprotection. *Physiol Genomics* 32(1):74–81
- Risom L, Moller P, Loft S (2005) Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 592:119–137
- Rojas E, Valverde M, Lopez MC, Naufal T, Sanchez I, Bizarro P, Lopez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P (2000) Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 468:11–17
- Rojas-Martínez R, Pérez-Padilla R, Olaiz-Fernández G, Mendoza-Alvarado L, Moreno-Macías H, Fortoul T, McDonell W, Loomis D, Romieu I (2007) Lung function growth in children with long-term exposure to air pollutants in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med* 176:377–384
- Roubicek DA, Gutiérrez Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P (2007) Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res* 631:9–15
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB (1991) The antioxidant responsive element. *J Biol Chem* 266:11632–11639
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AMK (2002) Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation functional significance. *Mol Cell Biochem* 234(235):249–263
- Sakurai A, Nishimoto N, Himeno S, Imura N, Tsujimoto M, Kunimoto M, Hara S (2005) Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2. *J Cell Physiol* 203:529–537
- Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maehara K, Wang H, Tamba M, Itoh K, Yamamoto M, Bannai S (2002) Electrophile Response element-mediated induction of the cysteine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem* 277:44765–44771
- Schwarze PE, Ovreivik J, Lag M, Refsnes M, Nafstad P, Hetl RB, Dybing E (2006) Particulate matter properties health effects: consistency of epidemiological toxicological studies. *Hum Exp Toxicol* 25:559–579
- Seaton A (1996) Particles in the air: the enigma of urban air pollution. *J R Soc Med* 89:64–67
- Shen G, Hebbar V, Nair S, Xu C, Li W, Lin W, Kerum YS, Gallo HJ, MA Tony-Kong A (2004) Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. *J Biol Chem* 279:23052–23060
- Shih PH, Yeh CT, Yen GC (2007) Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem* 55:9527–9535
- Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokin* 21:257–276
- Singh R, Kaur B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Binkora B, Sram RJ, Taioli E, Farmer PB (2007) Effects of the environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans. *Mutat Res* 620:71–82
- Slitt AL, Cherrington NJ, Dieter MZ, Aleksunes LM, Scheffter GL, Huang W, Moore DD, Klaassen CD (2006) Trans-Stilbene oxide induces expression of genes involved in the metabolism transport in mice liver via CAR Nrf2 transcription factors. *Mol Pharmacol* 69:1554–1569
- Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, Billiar TR, Otterbein LE, Choi AMK (2004) Carbon monoxide inhibits lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol* 172:1220–1226
- Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S (2003) Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 544:255–271
- Srisook K, Kim C, Cha Y (2005) Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme activation by Nrf2, the one-two punch. *Antioxid Redox Signal* 7:1674–1687
- Stohs SJ (1990) Oxidative stress induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Free Radic Biol Med* 9:79–90
- Taguchi K, Shimada M, Fujii S, Sumi D, Pan X, Yamano S, Nishiyama T, Hiratsuka A, Yamamoto M, Cho AK, Froines JR, Kimagai Y (2008) Redox cycling of 9, 10-phenanthraquinone to cause oxidative stress is terminated through its monoglucuronide conjugation in human pulmonary epithelial A549 cells. *Free Radic Biol Med* 44:1645–1655
- Takahashi Y, Oakes SM, Williams MC, Takahashi S, Miura T, Joyce-Brady M (1997) Nitrogen dioxide exposure activates gamma-glutamyl transferase gene expression in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:388–396
- Takizawa H (2004) Diesel exhaust (DE)-induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4:355–359
- Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S (2002) Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide array. *Cancer Res* 62:5196–5203
- Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itho K, Tanaka T, Yamamoto M (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 26:2887–2900
- Tovalin H, Valverde M, Mori MT, Blanco S, Whitehead L, Rojas E (2006) DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental pollutants. *Occup Environ Med* 63:230–236
- Varotsos C (2002) The southern hemisphere ozone hole split in 2002. *Environ Sci Pollut Res* 9:375–376
- Varotsos C (2005) Airborne measurements of aerosol, ozone and solar ultraviolet irradiance in the troposphere. *J Geophys Res* 110(D9):D09202
- Varotsos CA, Efstathiou MN, Kondratyev KY (2003) Long term variation in surface ozone and its precursors in Athens, Greece. A forecasting tool. *Environ Sci Pollut Res* 10(1):19–23
- Venugopal R, Jaiswal AK (1998) Nrf2 Nrf1 in association with JUN proteins regulate antioxidant response element-mediated expression coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17:3145–3156

- Versor DW, Postletwait EM (1997) NO<sub>2</sub>-induced generation of extracellular reactive oxygen is mediated by epithelial lining layer antioxidants. *Am J Physiol* 273:L1265–L1275
- Wan J, Diaz-Sanchez D (2006) Phase II enzymes induction blocks the enhanced IgE production in B cells by diesel exhaust particles. *J Immunol* 177:3477–3483
- Wang L, Pinkerton KE (2007) Air pollution effects on fetal early postnatal development. *Birth Defects Res Part C* 81:144–157
- Wang Y, Devereux W, Stewart TM, Caseno RA Jr (2001) Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor 1 (PMF1) NF-E2 related factor 2 (Nrf2) in the transcriptional regulation of the spermidine/spermine N<sup>7</sup>-acetyltransferase (SSAT) gene. *Biochem J* 355:45–49
- Whitekus MJ, Li N, Zhang M, Wang M, Horwitz MA, Nelson SK, Horwitz LD, Brechum N, Diaz-Sanchez D, Nel AE (2002) Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in murine model for ovalbumin sensitization. *J Immunol* 168:2560–2567
- WHO: World Health Organization Working Group (2003) Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone nitrogen dioxide report on a WHO Working group, Bonn, Germany, 13–15 January
- Wild AC, Monoiva H, Mulcahy R (1999) Regulation of g-glutamylcysteine synthetase regulatory sub unit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 274:33627–33636
- Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, Conney AH, Tony-Kong AN (2006) Inhibition of 7, 12-dimethylbenzo[a]anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulfophane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res* 66:8293–8296
- Yuan X, Xu C, Pan Z, Keum YS, Kim JH, Shen G, Yu S, Oo KT, Ma J, Tony-Kong AN (2006) Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol Carcinog* 45:841–850
- Yueh MF, Tukey RH (2007) Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro in transgenic UGT1 mice. *J Biol Chem* 282:8749–8758
- Zhang Q, Kleeberger SR, Reddy SP (2004) DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L427–L436
- Zhang J, Ohta T, Maruyama A, Hosoya T, Nishikawa K, Maher JM, Shibahara S, Itoh K, Yamamoto M (2006) BRG1 interacts with Nrf2 to selectively mediate HO-1 induction in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 26:7942–7952
- Zhang J, Ghio AJ, Gao M, Wei K, Rosen D, Upadhyay (2007a) Ambient particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest: role of G1 cyclins. *FEBS Lett* 581:5315–5320
- Zhang J, Hosoya T, Maruyama A, Nishikawa K, Maher JM, Ohta T, Motohashi H, Fukamizu A, Shibahara S, Itoh K, Yamamoto M (2007b) Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *Biochem J* 404:459–466
- Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y (2005) Role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen species nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* 579:3029–3036



## **Bibliografía**

- Abernethy, D.J., Kleyменова, E.V., Rose, J., Recio, L. and Faiola, B. 2004. Human CD34+ hematopoietic progenitor cells are sensitive targets for toxicity induced by 1,4-benzoquinone. *Toxicol Sci* 79, 82-89.
- Aibo, D.I., Birmingham, N.P., Lewandowski, R., Maddox, J.F., Roth, R.A., Ganey, P.E., Wagner, J.G. and Harkema, J.R. 2010. Acute Exposure to Ozone Exacerbates Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice. *Toxicol Sci*.
- Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J. and Yaqoob, M.M. 2003. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P4502E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 17, 335-341.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M. and Cook, J.L. 1999. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274, 26071-26078.
- Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K. and Yamamoto, M. 2001. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* 173, 154-160.
- Apopa, P.L., He, X. and Ma, Q. 2008. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol* 22, 63-76.
- Araujo, J.A., Barajas, B., Kleinman, M., Wang, X., Bennett, B.J., Gong, K.W., Navab, M., Harkema, J., Sioutas, C., Lulis, A.J. and Nel, A.E. 2008. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res* 102, 589-596.
- Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J. and Fletcher, T. 2004. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 112, 970-978.
- Badham, H.J. and Winn, L.M. 2010. In utero exposure to benzene disrupts fetal hematopoietic progenitor cell growth via reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 113, 207-215.

Ballinger, C.A., Cueto, R., Squadrito, G., Coffin, J.F., Velsor, L.W., Pryor, W.A. and Postlethwait, E.M. 2005. Antioxidant-mediated augmentation of ozone-induced membrane oxidation. *Free Radic Biol Med* 38, 515-526.

Barreto, G., Madureira, D., Capani, F., Aon-Bertolino, L., Saraceno, E. and Alvarez-Giraldez, L.D. 2009. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: An oxidative DNA damage pathway. *Environ Mol Mutagen*.

Beckman, J.D., Chen, C., Nguyen, J., Thayanithy, V., Subramanian, S., Steer, C.J. and Vercellotti, G.M. 2011. Regulation of Heme Oxygenase-1 Protein Expression by miR-377 in Combination with miR-217. *J Biol Chem* 286, 3194-3202.

Bernstein, J.A., Alexis, N., Barnes, C., Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Nel, A., Peden, D., Diaz-Sanchez, D., Tarlo, S.M. and Williams, P.B. 2004. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 114, 1116-1123.

Bevelander, M., Mayette, J., Whittaker, L.A., Paveglio, S.A., Jones, C.C., Robbins, J., Hemenway, D., Akira, S., Uematsu, S. and Poynter, M.E. 2007. Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol* 179, 3680-3688.

Bhatnagar, A. 2006. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circ Res* 99, 692-705.

Bocci, V. 2006. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol* 216, 493-504.

Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. and Monks, T.J. 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13, 135-160.

Borja-Aburto, V.H., Castillejos, M., Gold, D.R., Bierzwinski, S. and Loomis, D. 1998. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ Health Perspect* 106, 849-855.

Borja-Aburto, V.H., Loomis, D.P., Bangdiwala, S.I., Shy, C.M. and Rascon-Pacheco, R.A. 1997. Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *Am J Epidemiol* 145, 258-268.

Bornholdt, J., Dybdahl, M., Vogel, U., Hansen, M., Loft, S. and Wallin, H. 2002. Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice. *Mutat Res* 520, 63-71.

Bowen, S.E., Hannigan, J.H. and Irtenkauf, S. 2007. Maternal and fetal blood and organ toluene levels in rats following acute and repeated binge inhalation exposure. *Reprod Toxicol* 24, 343-352.

Brunekreef, B. and Holgate, S.T. 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360, 1233-1242.

Calderon-Garciduenas, L., Azzarelli, B., Acuna, H., Garcia, R., Gambling, T.M., Osnaya, N., Monroy, S., MR, D.E.L.T., Carson, J.L., Villarreal-Calderon, A. and Rewcastle, B. 2002. Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol* 30, 373-389.

Campbell, A. 2004. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Ann N Y Acad Sci* 1035, 117-132.

Cao, T.T., Ma, L., Kandpal, G., Warren, L., Hess, J.F. and Seabrook, G.R. 2005. Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage. *J Neurochem* 95, 406-417.

Casalino, E., Calzaretti, G., Landriscina, M., Sblano, C., Fabiano, A. and Landriscina, C. 2007. The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or manganese intoxicated rats: comparison with the toxic effect on NAD(P)H:quinone reductase. *Toxicology* 237, 24-34.

Chan, K., Han, X.D. and Kan, Y.W. 2001. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4611-4616.

Chan, K. and Kan, Y.W. 1999. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12731-12736.

Chanas, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 365, 405-416.

Chauhan, A.J. and Johnston, S.L. 2003. Air pollution and infection in respiratory illness. *Br Med Bull* 68, 95-112.

Chen, C.S., Hseu, Y.C., Liang, S.H., Kuo, J.Y. and Chen, S.C. 2008. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *J Hazard Mater* 153, 351-356.

Chen, C.Y., Jang, J.H., Li, M.H. and Surh, Y.J. 2005. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 993-1000.

Chen, J. and Shaikh, Z.A. 2009. Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 241, 81-89.

Chen, K.M., El-Bayoumy, K., Cunningham, J., Aliaga, C., Li, H. and Melikian, A.A. 2004. Detection of nitrated benzene metabolites in bone marrow of B6C3F1 mice treated with benzene. *Chem Res Toxicol* 17, 370-377.

Chen, L.C. and Qu, Q. 1997. Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 96-101.

Chen, T.M., Shofer, S., Gokhale, J. and Kuschner, W.G. 2007. Outdoor air pollution: overview and historical perspective. *Am J Med Sci* 333, 230-234.

Cheng, T.J., Kao, H.P., Chan, C.C. and Chang, W.P. 2003. Effects of ozone on DNA single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells. *Environ Res* 93, 279-284.

Coleman, C.A., Hull, B.E., McDougal, J.N. and Rogers, J.V. 2003. The effect of m-xylene on cytotoxicity and cellular antioxidant status in rat dermal equivalents. *Toxicol Lett* 142, 133-142.

Comhair, S.A. and Erzurum, S.C. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L246-255.

Committee-of-Toxicology. 2000 "Ozone" Emergency and continuous exposure limits for selected airborne contaminants. Board on Toxicology and Environmental Health Hazards Commission on Life Sciences National Research Council., National Academy Press, Washington D.C.

Corradi, M., Alinovi, R., Goldoni, M., Vettori, M., Folesani, G., Mozzoni, P., Cavazzini, S., Bergamaschi, E., Rossi, L. and Mutti, A. 2002. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 134, 219-225.

Costa, C., Pasquale, R.D., Silvani, V., Barbaro, M. and Catania, S. 2006. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol In Vitro* 20, 324-331.

Csallany, A.S., Manwaring, J.D. and Menken, B.Z. 1985. Ozone-related fluorescent compounds in mouse liver and lung. *Environ Res* 37, 320-326.

Cui, Y., Gao, C.Q., Sun, G., Zhou, Y., Qu, F., Tang, C., Yu, F. and Guan, C. 2011. l-Arginine promotes DNA repair in cultured bronchial epithelial cells exposed to ozone: involvement of the ATM pathway. *Cell Biol Int* 35, 273-280.

Cullinan, S.B. and Diehl, J.A. 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 317-332.

Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W. and Diehl, J.A. 2004. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24, 8477-8486.

Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J. and Diehl, J.A. 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23, 7198-7209.

Demirbag, S., Uysal, B., Guven, A., Cayci, T., Ozler, M., Ozcan, A., Kaldirim, U., Surer, I. and Korkmaz, A. 2010. Effects of medical ozone therapy on acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* 32, 493-497.

Devlin, R.B., McDonnell, W.F., Becker, S., Madden, M.C., McGee, M.P., Perez, R., Hatch, G., House, D.E. and Koren, H.S. 1996. Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 138, 176-185.

Dhakshinamoorthy, S. and Jaiswal, A.K. 2000. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* 275, 40134-40141.

Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11908-11913.

Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D. and Wakabayashi, N. 2005. Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 44, 6889-6899.

Dinkova-Kostova, A.T., Massiah, M.A., Bozak, R.E., Hicks, R.J. and Talalay, P. 2001. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3404-3409.

Eggler, A.L., Liu, G., Pezzuto, J.M., van Breemen, R.B. and Mesecar, A.D. 2005. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10070-10075.

Emara, A.M. and El-Bahrawy, H. 2008. Green tea attenuates benzene-induced oxidative stress in pump workers. *J Immunotoxicol* 5, 69-80.

Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T. and Yamamoto, M. 2001. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* 59, 169-177.

EPA. (2006) Air and Radiation: Air pollution. Environmental Protection Agency, United States of America.

EPA. (2009) Benzene (71-43-2) Hazard Summary Environmental Protection Agency, United States of America.

EPA. (2010) Ground-level ozone. Environmental Protection Agency, United States of America.

EPA. (2011) An introduction to Indoor Air Quality (IAQ): Volatile organic compounds. Environmental Protection Agency, United States of America.

Ferm, M., Watt, J., O'Hanlon, S., De Santis, F. and Varotsos, C. 2006. Deposition measurement of particulate matter in connection with corrosion studies. *Anal Bioanal Chem* 384, 1320-1330.

Flescher, E. and Snyder, C.A. 1995. Aspirin-like drugs can protect human T lymphocytes against benzoquinone cytotoxicity: evidence for a NAD(P)H:quinone reductase-dependent mechanism. *Arch Toxicol* 69, 684-689.

Foucaud, L., Bennisroune, A., Klestadt, D., Laval-Gilly, P. and Falla, J. 2006. Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells. *Toxicol In Vitro* 20, 101-108.

Franchini, M. and Mannucci, P.M. 2007. Short-term effects of air pollution on cardiovascular diseases: outcomes and mechanisms. *J Thromb Haemost* 5, 2169-2174.

Gao, X. and Talalay, P. 2004. Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10446-10451.

Garg, R., Gupta, S. and Maru, G.B. 2008. Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo[a]pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action. *Carcinogenesis* 29, 1022-1032.

Goldstein, B.D. 1978. The pulmonary and extrapulmonary effects of ozone. *Ciba Found Symp*, 295-319.

Gopalakrishnan, A. and Tony Kong, A.N. 2008. Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem Toxicol* 46, 1257-1270.

Gryparis, A., Forsberg, B., Katsouyanni, K., Analitis, A., Touloumi, G., Schwartz, J., Samoli, E., Medina, S., Anderson, H.R., Niciu, E.M., Wichmann, H.E., Kriz, B., Kosnik, M., Skorkovsky, J., Vonk, J.M. and Dortbudak, Z. 2004. Acute effects of ozone on mortality from the "air pollution and health: a European approach" project. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1080-1087.

Gut, I., Nedelcheva, V., Soucek, P., Stopka, P. and Tichavska, B. 1996. Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 6, 1211-1218.

Haddad, J.J. 2004. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 969-977.

Han, X. and Naeher, L.P. 2006. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environ Int* 32, 106-120.

Harkema, J.R. and Wagner, J.G. 2005. Epithelial and inflammatory responses in the airways of laboratory rats coexposed to ozone and biogenic substances: enhancement of toxicant-induced airway injury. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1, 129-141.

Hayes, J.D., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G.J., Wolf, C.R. and Yamamoto, M. 2000. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem Soc Trans* 28, 33-41.

Hayes, J.D. and McMahon, M. 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 34, 176-188.

He, C.H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M.E., Choi, A.M. and Alam, J. 2001. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 276, 20858-20865.

He, X., Chen, M.G., Lin, G.X. and Ma, Q. 2006. Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2 x Keap1 x Cul3 complex and recruiting Nrf2 x Maf to the antioxidant response element enhancer. *J Biol Chem* 281, 23620-23631.

Hrelia, P., Maffei, F., Angelini, S. and Forti, G.C. 2004. A molecular epidemiological approach to health risk assessment of urban air pollution. *Toxicol Lett* 149, 261-267.



Hsieh, T.C., Lu, X., Wang, Z. and Wu, J.M. 2006. Induction of quinone reductase NQO1 by resveratrol in human K562 cells involves the antioxidant response element ARE and is accompanied by nuclear translocation of transcription factor Nrf2. *Med Chem* 2, 275-285.

Huang, H.C., Nguyen, T. and Pickett, C.B. 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12475-12480.

Huang, H.C., Nguyen, T. and Pickett, C.B. 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277, 42769-42774.

IARC. 1997 Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, International Agency for Research of Cancer, Lyon, France.

Ibuki, Y. and Goto, R. 2004. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1690, 11-21.

Ishii, T., Itoh, K. and Yamamoto, M. 2002. Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. *Methods Enzymol* 348, 182-190.

Ishii, Y., Nurrochmad, A. and Yamada, H. 2010. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by endogenous compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 25, 134-148.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322.

Itoh, K., Tong, K.I. and Yamamoto, M. 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36, 1208-1213.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86.

Jain, A.K., Bloom, D.A. and Jaiswal, A.K. 2005. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* 280, 29158-29168.

Jain, A.K. and Jaiswal, A.K. 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* 281, 12132-12142.

Jeyapaul, J. and Jaiswal, A.K. 2000. Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Pharmacol* 59, 1433-1439.

Jonek, J. and Kaminski, M. 1971. Submicroscopic changes in renal cells in subacute benzene poisoning. *Acta Med Pol* 12, 285-288.

Jowsey, I.R., Jiang, Q., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. 2003. Expression of the aflatoxin B1-8,9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant response element. *Mol Pharmacol* 64, 1018-1028.

Kalthoff, S., Ehmer, U., Freiberg, N., Manns, M.P. and Strassburg, C.P. 2010. Coffee induces expression of glucuronosyltransferases by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. *Gastroenterology* 139, 1699-1710, 1710 e1691-1692.

Kamijima, M., Nakazawa, Y., Yamakawa, M., Shibata, E., Hisanaga, N., Ono, Y., Toida, M. and Takeuchi, Y. 1994. Metabolic acidosis and renal tubular injury due to pure toluene inhalation. *Arch Environ Health* 49, 410-413.

Kaminski, M., Karbowski, A. and Jonek, J. 1970. Some histochemical renal changes in mice during acute poisoning with benzene. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 8, 63-75.

Kang, E.S., Woo, I.S., Kim, H.J., Eun, S.Y., Paek, K.S., Kim, H.J., Chang, K.C., Lee, J.H., Lee, H.T., Kim, J.H., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C. and Seo, H.G. 2007. Up-regulation of aldose reductase expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Nrf2 is involved in the protective effect of curcumin against oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 43, 535-545.

Kang, K.W., Lee, S.J. and Kim, S.G. 2005. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7, 1664-1673.

Kang, K.W., Lee, S.J., Park, J.W. and Kim, S.G. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* 62, 1001-1010.

Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G. and Yamamoto, M. 2004. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2046-2051.

Kanofsky, J.R. and Sima, P.D. 1993. Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reactions. *Photochem Photobiol* 58, 335-340.

Karabulut, I., Balkanci, Z.D., Pehlivanoglu, B., Erdem, A. and Fadillioglu, E. 2009. Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions with assessment of oxidant/antioxidant status. *Toxicol Ind Health* 25, 545-550.

Kaspar, J.W., Niture, S.K. and Jaiswal, A.K. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 47, 1304-1309.

Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. and Yamamoto, M. 2001. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 6, 857-868.

Katsouyanni, K., Touloumi, G., Samoli, E., Gryparis, A., Le Tertre, A., Monopoli, Y., Rossi, G., Zmirou, D., Ballester, F., Boumghar, A., Anderson, H.R., Wojtyniak, B., Paldy, A., Braunstein, R., Pekkanen, J., Schindler, C. and Schwartz, J. 2001. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology* 12, 521-531.

Kennedy, C.H., Hatch, G.E., Slade, R. and Mason, R.P. 1992. Application of the EPR spin-trapping technique to the detection of radicals produced in vivo during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 114, 41-46.

Kim, J.H., Moon, J.Y., Park, E.Y., Lee, K.H. and Hong, Y.C. 2011. Changes in oxidative stress biomarker and gene expression levels in workers exposed to volatile organic compounds. *Ind Health* 49, 8-14.

Klaassen, C.D. and Reisman, S.A. 2010. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 57-65.

Knorr-Wittmann, C., Hengstermann, A., Gebel, S., Alam, J. and Muller, T. 2005. Characterization of Nrf2 activation and heme oxygenase-1 expression in NIH3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 39, 1438-1448.

Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. and Yamamoto, M. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24, 7130-7139.

Kobayashi, M. and Yamamoto, M. 2005. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 7, 385-394.

Kooter, I.M. (2004) Inventory of biomarker of oxidative stress. RIVM Report

Koski, J.M. and Isomaki, H. 1990. Ultrasonography may reveal synovitis in a clinically silent hip joint. *Clin Rheumatol* 9, 539-541.

Kosmider, B., Loader, J.E., Murphy, R.C. and Mason, R.J. 2010. Apoptosis induced by ozone and oxysterols in human alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 48, 1513-1524.

Kwak, M.K., Egner, P.A., Dolan, P.M., Ramos-Gomez, M., Groopman, J.D., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T.W. 2001a. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutat Res* 480-481, 305-315.

Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T.W. 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 22, 2883-2892.

Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T.R. and Kensler, T.W. 2001b. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol Med* 7, 135-145.

Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Kensler, T.W. 2003. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278, 8135-8145.

Last, J.A., Gohil, K., Mathrani, V.C. and Kenyon, N.J. 2005. Systemic responses to inhaled ozone in mice: cachexia and down-regulation of liver xenobiotic metabolizing genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 208, 117-126.

Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L. and Abraham, N.G. 1993. Novel regulatory sites of the human heme oxygenase-1 promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 336-341.

Lebowitz, M.D. 1996. Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution. *Eur Respir J* 9, 1029-1054.

Lee, H.R., Cho, J.M., Shin, D.H., Yong, C.S., Choi, H.G., Wakabayashi, N. and Kwak, M.K. 2008. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol Cell Biochem* 318, 23-31.

Lee, J.G., Madden, M.C., Reed, W., Adler, K. and Devlin, R. 1996. The use of the single cell gel electrophoresis assay in detecting DNA single strand breaks in lung cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 141, 195-204.

Lee, J.M., Chan, K., Kan, Y.W. and Johnson, J.A. 2004. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9751-9756.

Lee, J.M., Shih, A.Y., Murphy, T.H. and Johnson, J.A. 2003a. NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 278, 37948-37956.

Lee, J.Y., Kim, J.Y., Lee, Y.G., Shin, W.C., Chun, T., Rhee, M.H. and Cho, J.Y. 2007. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. *Mol Cells* 23, 198-206.

Lee, Y.K., Mok Kim, S. and Han, S. 2003b. Ozone-induced inactivation of antioxidant enzymes. *Biochimie* 85, 947-952.

Lewis, J.B., Messer, R.L., McCloud, V.V., Lockwood, P.E., Hsu, S.D. and Wataha, J.C. 2006. Ni(II) activates the Nrf2 signaling pathway in human monocytic cells. *Biomaterials* 27, 5348-5356.

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

Li, J., Johnson, D., Calkins, M., Wright, L., Svendsen, C. and Johnson, J. 2005. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicol Sci* 83, 313-328.

Li, N., Alam, J., Venkatesan, M.I., Eiguren-Fernandez, A., Schmitz, D., Di Stefano, E., Slaughter, N., Killeen, E., Wang, X., Huang, A., Wang, M., Miguel, A.H., Cho, A., Sioutas, C. and Nel, A.E. 2004a. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol* 173, 3467-3481.

Li, W., Yu, S.W. and Kong, A.N. 2006. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem* 281, 27251-27263.

Li, X., Zhang, D., Hannink, M. and Beamer, L.J. 2004b. Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *J Biol Chem* 279, 54750-54758.

Li, Y., Lafuente, A. and Trush, M.A. 1994. Characterization of quinone reductase, glutathione and glutathione S-transferase in human myeloid cell lines: induction by 1,2-dithiole-3-thione and effects on hydroquinone-induced cytotoxicity. *Life Sci* 54, 901-916.

Li, Y.J., Takizawa, H., Azuma, A., Kohyama, T., Yamauchi, Y., Takahashi, S., Yamamoto, M., Kawada, T., Kudoh, S. and Sugawara, I. 2008. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clin Immunol* 128, 366-373.

Li, Y.J., Takizawa, H., Azuma, A., Kohyama, T., Yamauchi, Y., Takahashi, S., Yamamoto, M., Kawada, T., Kudoh, S. and Sugawara, I. 2010. Nrf2 is closely related to allergic airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clin Immunol* 137, 234-241.

Lim, Y., Phung, A.D., Corbacho, A.M., Aung, H.H., Maioli, E., Reznick, A.Z., Cross, C.E., Davis, P.A. and Valacchi, G. 2006. Modulation of cutaneous wound healing by ozone: differences between young and aged mice. *Toxicol Lett* 160, 127-134.

Lin, W., Shen, G., Yuan, X., Jain, M.R., Yu, S., Zhang, A., Chen, J.D. and Kong, A.N. 2006. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *J Biochem Mol Biol* 39, 304-310.

Liu, Y., Zhou, Q., Xie, X., Lin, D. and Dong, L. 2010. Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology* 19, 1551-1559.

Lo, S.C. and Hannink, M. 2006. CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. *Mol Cell Biol* 26, 1235-1244.

Luo, L., Jiang, L., Geng, C., Cao, J. and Zhong, L. 2008. Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 173, 1-8.

Ma, Q., Kinneer, K., Bi, Y., Chan, J.Y. and Kan, Y.W. 2004. Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem J* 377, 205-213.

Maher, J. and Yamamoto, M. 2010. The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 4-15.

Maisonet, M., Correa, A., Misra, D. and Jaakkola, J.J. 2004. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environ Res* 95, 106-115.

Mattia, C.J., Adams, J.D., Jr. and Bondy, S.C. 1993. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 46, 103-110.

McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 278, 21592-21600.

McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 279, 31556-31567.

Medinsky, M.A. and Bond, J.A. 2001. Sites and mechanisms for uptake of gases and vapors in the respiratory tract. *Toxicology* 160, 165-172.

Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J. and Batist, G. 2005. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem* 280, 20340-20348.

Moran, J.L., Siegel, D. and Ross, D. 1999. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8150-8155.

Morsy, M.D., Hassan, W.N. and Zalat, S.I. 2010. Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats. *Diabetol Metab Syndr* 2, 29.

Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M. 2004. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6379-6384.

Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M. 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294, 1-12.

Mudway, I.S. and Kelly, F.J. 1998. Modeling the interactions of ozone with pulmonary epithelial lining fluid antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 148, 91-100.



Na, H.K. and Surh, Y.J. 2008. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol* 46, 1271-1278.

Nedelcheva, V., Gut, I., Soucek, P., Tichavska, B., Tynkova, L., Mraz, J., Guengerich, F.P. and Ingelman-Sundberg, M. 1999. Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch Toxicol* 73, 33-40.

Nguyen, T., Huang, H.C. and Pickett, C.B. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem* 275, 15466-15473.

Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 233-260.

Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B. 2005. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 25, 10895-10906.

Niture, S.K., Kaspar, J.W., Shen, J. and Jaiswal, A.K. 2009. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol*.

Oguro, T., Hayashi, M., Numazawa, S., Asakawa, K. and Yoshida, T. 1996. Heme oxygenase-1 gene expression by a glutathione depletor, phorone, mediated through AP-1 activation in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 221, 259-265.

Oosting, R.S., Van Rees-Verhoef, M., Verhoef, J., Van Golde, L.M. and Van Bree, L. 1991. Effects of ozone on cellular ATP levels in rat and mouse alveolar macrophages. *Toxicology* 70, 195-202.

OSHA. (2009) Benzene regulation (standards-29 CFR) In: D.o. Labor (Ed), Occupational Safety and Health Administration.

Otitolaju, A. and Olagoke, O. 2010. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Monit Assess*.

Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K. and Bach, F.H. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24, 449-455.

Owuor, E.D. and Kong, A.N. 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 64, 765-770.

Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R. and Immenschuh, S. 2010. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 80, 1895-1903.

Papaiahgari, S., Kleeberger, S.R., Cho, H.Y., Kalvakolanu, D.V. and Reddy, S.P. 2004. NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 42302-42312.

Pariselli, F., Sacco, M.G., Ponti, J. and Rembges, D. 2009. Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Exp Toxicol Pathol* 61, 381-386.

Park, E.Y. and Rho, H.M. 2002. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem* 240, 47-55.

Pi, J., Bai, Y., Reece, J.M., Williams, J., Liu, D., Freeman, M.L., Fahl, W.E., Shugar, D., Liu, J., Qu, W., Collins, S. and Waalkes, M.P. 2007. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* 42, 1797-1806.

Postlethwait, E.M., Cueto, R., Velsor, L.W. and Pryor, W.A. 1998. O<sub>3</sub>-induced formation of bioactive lipids: estimated surface concentrations and lining layer effects. *Am J Physiol* 274, L1006-1016.

Powley, M.W. and Carlson, G.P. 1999. Species comparison of hepatic and pulmonary metabolism of benzene. *Toxicology* 139, 207-217.

Powley, M.W. and Carlson, G.P. 2000. Cytochromes P450 involved with benzene metabolism in hepatic and pulmonary microsomes. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 303-309.

Powley, M.W. and Carlson, G.P. 2001. Hepatic and pulmonary microsomal benzene metabolism in CYP2E1 knockout mice. *Toxicology* 169, 187-194.

Powley, M.W. and Carlson, G.P. 2002. Benzene metabolism by the isolated perfused lung. *Inhal Toxicol* 14, 569-584.

Prawan, A., Kundu, J.K. and Surh, Y.J. 2005. Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox Signal* 7, 1688-1703.

Prester, T., Holtzclaw, W.D., Zhang, Y. and Talalay, P. 1993. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2965-2969.

Pryor, W.A. 1994. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med* 17, 451-465.

Pryor, W.A. and Church, D.F. 1991. Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med* 11, 41-46.

Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L. and Davies, K.J. 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R491-511.

Pryor, W.A., Squadrito, G.L. and Friedman, M. 1995. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 19, 935-941.

Qin, X.Q., Sun, X.H., Lou, Z.Q., Guan, C.X. and Zhang, C.Q. 1996. [Cytoprotective effect of epidermal growth factor on cultured rabbit airway epithelial cells exposed to ozone]. *Sheng Li Xue Bao* 48, 190-194.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. and Kensler, T.W. 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3410-3415.

Revilla, A.S., Pestana, C.R., Pardo-Andreu, G.L., Santos, A.C., Uyemura, S.A., Gonzales, M.E. and Curti, C. 2007. Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling. *Toxicol In Vitro* 21, 782-788.

Riediker, M., Williams, R., Devlin, R., Griggs, T. and Bromberg, P. 2003. Exposure to particulate matter, volatile organic compounds, and other air pollutants inside patrol cars. *Environ Sci Technol* 37, 2084-2093.

Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martinez, C., Colin-Barenque, L., Kendrick, K.M., de la Riva, C. and Guevara-Guzman, R. 2003. Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 891-900.

Rivas-Arancibia, S., Vazquez-Sandoval, R., Gonzalez-Kladiano, D., Schneider-Rivas, S. and Lechuga-Guerrero, A. 1998. Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ Res* 76, 33-39.

Rodolfo Sosa, E., Humberto Bravo, A., Violeta Mugica, A., Pablo Sanchez, A., Emma Bueno, L. and Krupa, S. 2009. Levels and source apportionment of volatile organic compounds in southwestern area of Mexico City. *Environ Pollut* 157, 1038-1044.

Rojas, E., Valverde, M., Lopez, M.C., Naufal, I., Sanchez, I., Bizarro, P., Lopez, I., Fortoul, T.I. and Ostrosky-Wegman, P. 2000. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 468, 11-17.

Roma-Torres, J., Teixeira, J.P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L.M., Mendez, J. and Mayan, O. 2006. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res* 604, 19-27.

Romieu, I., Meneses, F., Ramirez, M., Ruiz, S., Perez Padilla, R., Sienna, J.J., Gerber, M., Grievink, L., Dekker, R., Walda, I. and Brunekreef, B. 1998. Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 226-232.

Ross, D. and Zhou, H. 2010. Relationships between metabolic and non-metabolic susceptibility factors in benzene toxicity. *Chem Biol Interact* 184, 222-228.

Rubio, V., Valverde, M. and Rojas, E. 2010. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ Sci Pollut Res Int* 17, 369-382.

Rushmore, T.H., King, R.G., Paulson, K.E. and Pickett, C.B. 1990. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element

controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3826-3830.

Rushmore, T.H., Morton, M.R. and Pickett, C.B. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266, 11632-11639.

Saintot, M., Bernard, N., Astre, C. and Gerber, M. 1999. Ozone exposure and blood antioxidants: a study in a periurban area in Southern France. *Arch Environ Health* 54, 34-39.

Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M. and Cuadrado, A. 2006. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 281, 14841-14851.

Sarma, S.N., Kim, Y.J., Song, M. and Ryu, J.C. 2011. Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene. *Toxicology* 280, 109-117.

Satoh, T., Saitoh, S., Hosaka, M. and Kosaka, K. 2009. Simple ortho- and para-hydroquinones as compounds neuroprotective against oxidative stress in a manner associated with specific transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 537-541.

Schrenk, D., Orzechowski, A., Schwarz, L.R., Snyder, R., Burchell, B., Ingelman-Sundberg, M. and Bock, K.W. 1996. Phase II metabolism of benzene. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 6, 1183-1188.

Sehirli, O., Tozan, A., Omurtag, G.Z., Cetinel, S., Contuk, G., Gedik, N. and Sener, G. 2008. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 71, 301-308.

SEMARNAT. (2008) Informe de la situacion del medio ambiente en Mexico: Atmosfera. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales.

Serrano-Trespacios, P.I. (2011) Indicadores ambientales de compuestos organicos volatiles en el aire ambiente de la ciudad de Mexico.

Serrano-Trespalacios, P.I., Ryan, L. and Spengler, J.D. 2004. Ambient, indoor and personal exposure relationships of volatile organic compounds in Mexico City Metropolitan Area. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 14 Suppl 1, S118-132.

SETRAVI. (2011) Informe de la situación del medio ambiente en Mexico. Secretaria de transporte y vialidad, Gobierno del Distrito Federal.

Sheets, P.L., Yost, G.S. and Carlson, G.P. 2004. Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *J Biochem Mol Toxicol* 18, 92-99.

Shen, Y., Shen, H.M., Shi, C.Y. and Ong, C.N. 1996. Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells. *Hum Exp Toxicol* 15, 422-427.

Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M. and Hirohashi, S. 2008. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13568-13573.

Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J.A. and Murphy, T.H. 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23, 3394-3406.

Singh, N.P., Singh, U.S., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P.S. 2011. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) protects pregnant mother and fetus from the immunotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Nutr Food Res* 55, 209-219.

SMA. (2008) Programa de calidad del aire: Inventario de emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de Mexico. Secretaria de medio ambiente, Gobierno del Distrito Federal.

Smart, R.C. and Zannoni, V.G. 1984. DT-diaphorase and peroxidase influence the covalent binding of the metabolites of phenol, the major metabolite of benzene. *Mol Pharmacol* 26, 105-111.

Smith, M.T. 1999. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7624-7626.

Snyder, R. 2002. Benzene and leukemia. *Crit Rev Toxicol* 32, 155-210.

Snyder, R., Dimitriadis, E., Guy, R., Hu, P., Cooper, K., Bauer, H., Witz, G. and Goldstein, B.D. 1989. Studies on the mechanism of benzene toxicity. *Environ Health Perspect* 82, 31-35.

Snyder, R. and Hedli, C.C. 1996. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 6, 1165-1171.

Snyder, R., Witz, G. and Goldstein, B.D. 1993. The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect* 100, 293-306.

Soucek, P., Ivan, G. and Pavel, S. 2000. Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 126, 45-61.

SSA. (1993) Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-11993. "Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del airre ambiente, con respecto al ozono (O3) en el aire ambiente, como medida de proteccion a la salud de la poblacion". Secretaria de salud.

Sugatani, J., Yamakawa, K., Tonda, E., Nishitani, S., Yoshinari, K., Degawa, M., Abe, I., Noguchi, H. and Miwa, M. 2004. The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 67, 989-1000.

Sun, P., Qian, J., Zhang, Z.B., Wan, J.X., Wu, F., Jin, X.P., Fan, W.W., Lu, D.R., Zhao, N.Q., Christiani, D.C. and Xia, Z.L. 2008. Polymorphisms in phase I and phase II metabolism genes and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Carcinogenesis* 29, 2325-2329.

Takahashi, Y., Takahashi, S., Yoshimi, T., Miura, T., Mochitate, K. and Kobayashi, T. 1997. Increases in the mRNA levels of gamma-glutamyltransferase and heme oxygenase-1 in the rat lung after ozone exposure. *Biochem Pharmacol* 53, 1061-1064.

Tang, H.L., Chu, K.H., Cheuk, A., Tsang, W.K., Chan, H.W. and Tong, K.L. 2005. Renal tubular acidosis and severe hypophosphataemia due to toluene inhalation. *Hong Kong Med J* 11, 50-53.

Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S.P., Villalta, F. and Arinze, I.J. 2008. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 283, 8984-8994.

Togawa, H., Shinkai, S. and Mizutani, T. 2008. Induction of human UGT1A1 by bilirubin through AhR dependent pathway. *Drug Metab Lett* 2, 231-237.

Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T. and Yamamoto, M. 2006. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 26, 2887-2900.

Tovalin-Ahumada, H. and Whitehead, L. 2007. Personal exposures to volatile organic compounds among outdoor and indoor workers in two Mexican cities. *Sci Total Environ* 376, 60-71.

Tovalin, H., Valverde, M., Morandi, M.T., Blanco, S., Whitehead, L. and Rojas, E. 2006. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. *Occup Environ Med* 63, 230-236.

Trush, M.A., Twerdok, L.E., Rembish, S.J., Zhu, H. and Li, Y. 1996. Analysis of target cell susceptibility as a basis for the development of a chemoprotective strategy against benzene-induced hematotoxicities. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 6, 1227-1234.

Twerdok, L.E., Rembish, S.J. and Trush, M.A. 1992. Induction of quinone reductase and glutathione in bone marrow cells by 1,2-dithiole-3-thione: effect on hydroquinone-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 273-281.

Twerdok, L.E. and Trush, M.A. 1990. Differences in quinone reductase activity in primary bone marrow stromal cells derived from C57BL/6 and DBA/2 mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 67, 375-386.

Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A.M., Olano, E., Davis, P.A., Packer, L. and Cross, C.E. 2004. In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radic Biol Med* 36, 673-681.

Valacchi, G., Pagnin, E., Okamoto, T., Corbacho, A.M., Olano, E., Davis, P.A., van der Vliet, A., Packer, L. and Cross, C.E. 2003. Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 741-746.



Valacchi, G., van der Vliet, A., Schock, B.C., Okamoto, T., Obermuller-Jevic, U., Cross, C.E. and Packer, L. 2002. Ozone exposure activates oxidative stress responses in murine skin. *Toxicology* 179, 163-170.

Valverde, M., del Carmen Lopez, M., Lopez, I., Sanchez, I., Fortoul, T.I., Ostrosky-Wegman, P. and Rojas, E. 1997. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen* 30, 147-152.

Vasiliou, V., Ross, D. and Nebert, D.W. 2006. Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum Genomics* 2, 329-335.

Venugopal, R. and Jaiswal, A.K. 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145-3156.

Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P. 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2040-2045.

Wan, J. and Winn, L.M. 2008. In utero exposure to benzene increases embryonic c-Myb and Pim-1 protein levels in CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 228, 326-333.

Wang, B. and Williamson, G. 1996. Transcriptional regulation of the human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene by monofunctional inducers. *Biochim Biophys Acta* 1307, 104-110.

Wang, L. and Pinkerton, K.E. 2007. Air pollutant effects on fetal and early postnatal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81, 144-154.

Wang, X.J., Hayes, J.D., Higgins, L.G., Wolf, C.R. and Dinkova-Kostova, A.T. 2010. Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem Biol* 17, 75-85.

Wang, Y., Devereux, W., Stewart, T.M. and Casero, R.A., Jr. 2001. Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor (PMF-1) and NF-E2-related factor 2

(Nrf-2) in the transcriptional regulation of the spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) gene. *Biochem J* 355, 45-49.

Wetmore, B.A., Struve, M.F., Gao, P., Sharma, S., Allison, N., Roberts, K.C., Letinski, D.J., Nicolich, M.J., Bird, M.G. and Dorman, D.C. 2008. Genotoxicity of intermittent co-exposure to benzene and toluene in male CD-1 mice. *Chem Biol Interact* 173, 166-178.

Whitekus, M.J., Li, N., Zhang, M., Wang, M., Horwitz, M.A., Nelson, S.K., Horwitz, L.D., Brechun, N., Diaz-Sanchez, D. and Nel, A.E. 2002. Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovalbumin sensitization. *J Immunol* 168, 2560-2567.

Winn, L.M. 2003. Homologous recombination initiated by benzene metabolites: a potential role of oxidative stress. *Toxicol Sci* 72, 143-149.

Xu, C., Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J.H., Yu, S., Khor, T.O., Li, W., Ma, J. and Kong, A.N. 2006. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther* 5, 1918-1926.

Yang, F. and Zhou, J.H. 2010. Cytotoxicity and DNA damage induced by 1, 4-benzoquinone in v79 Chinese hamster lung cells. *J Toxicol Environ Health A* 73, 483-489.

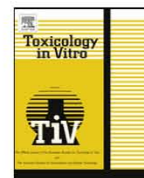
Yin, S.N., Hayes, R.B., Linet, M.S., Li, G.L., Dosemeci, M., Travis, L.B., Zhang, Z.N., Li, D.G., Chow, W.H., Wacholder, S. and Blot, W.J. 1996. An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. *Benzene Study Group. Environ Health Perspect* 104 Suppl 6, 1339-1341.

Yip, M. and Madl, P. (2000) Air pollution in Mexico City. University of Salzburg, Austria.

Yoon, M., Madden, M.C. and Barton, H.A. 2007. Extrahepatic metabolism by CYP2E1 in PBPK modeling of lipophilic volatile organic chemicals: impacts on metabolic parameter estimation and prediction of dose metrics. *J Toxicol Environ Health A* 70, 1527-1541.

Yuan, X., Xu, C., Pan, Z., Keum, Y.S., Kim, J.H., Shen, G., Yu, S., Oo, K.T., Ma, J. and Kong, A.N. 2006. Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol Carcinog* 45, 841-850.

- Yueh, M.F. and Tukey, R.H. 2007. Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. *J Biol Chem* 282, 8749-8758.
- Zavala, M., Lei, W., Molina, M.J. and L.T., M. (2009) Modeled and observed ozone sensitivity to mobile-source emissions in Mexico City. *Atmos. Chem. Phys.*
- Zhang, D.D., Lo, S.C., Sun, Z., Habib, G.M., Lieberman, M.W. and Hannink, M. 2005. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol Chem* 280, 30091-30099.
- Zhang, J., Ohta, T., Maruyama, A., Hosoya, T., Nishikawa, K., Maher, J.M., Shibahara, S., Itoh, K. and Yamamoto, M. 2006. BRG1 interacts with Nrf2 to selectively mediate HO-1 induction in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 26, 7942-7952.
- Zhang, M., Wang, Y., Wang, Q., Yang, J., Yang, D., Liu, J. and Li, J. 2010. Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in ethylbenzene-induced renal toxicity in rat. *Toxicol Sci* 115, 295-303.
- Zhang, Z.M., Yang, X.Y., Yuan, J.H., Sun, Z.Y. and Li, Y.Q. 2009. Modulation of NRF2 and UGT1A expression by epigallocatechin-3-gallate in colon cancer cells and BALB/c mice. *Chin Med J (Engl)* 122, 1660-1665.
- Zhu, H., Jia, Z., Zhang, L., Yamamoto, M., Misra, H.P., Trush, M.A. and Li, Y. 2008. Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 463-474.
- Zhu, H., Zhang, L., Itoh, K., Yamamoto, M., Ross, D., Trush, M.A., Zweier, J.L. and Li, Y. 2006. Nrf2 controls bone marrow stromal cell susceptibility to oxidative and electrophilic stress. *Free Radic Biol Med* 41, 132-143.
- Zipper, L.M. and Mulcahy, R.T. 2002. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem* 277, 36544-36552.



## Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity

Valentina Rubio<sup>a,b</sup>, Jiawei Zhang<sup>b,1</sup>, Mahara Valverde<sup>a</sup>, Emilio Rojas<sup>a,\*</sup>, Zheng-Zheng Shi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México

<sup>b</sup>The Methodist Hospital Research Institute, Department of Radiology, The Methodist Hospital, Houston, TX 77030, United States

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 August 2010

Accepted 29 October 2010

Available online 6 November 2010

#### Keywords:

Hydroquinone

Benzoquinone

Nrf2

ARE-driven

Apoptosis

Glutathione

### ABSTRACT

Benzene is a well-established human carcinogen. Benzene metabolites hydroquinone (HQ) and benzoquinone (BQ) are highly reactive molecules capable of producing reactive oxygen species and causing oxidative stress. In this study, we investigated the role of the Nrf2, a key nuclear transcription factor that regulates antioxidant response element (ARE)-containing genes, in defense against HQ- and BQ-induced cytotoxicity in cultured human lung epithelial cells (Beas-2B). When the cells were exposed to HQ or BQ the activity of an ARE reporter was induced in a dose-dependent manner, meanwhile Nrf2 protein levels were elevated and accumulated in the nucleus. Increased expression of well-known Nrf2-dependent proteins including NQO1, GCLM, GSS and HMOX was also observed in the HQ/BQ-treated cells. Moreover, transient overexpression of Nrf2 conferred protection against HQ- and BQ-induced cell death, whereas knockdown of Nrf2 by small interfering RNA resulted in increased apoptosis. We also found that the increased susceptibility of Nrf2-knockdown cells to HQ and BQ was associated with reduced glutathione levels and loss of inducibility of ARE-driven genes, suggesting that deficiency of Nrf2 impairs cellular redox capacity to counteract oxidative damage. Altogether, these results suggest that Nrf2-ARE pathway is essential for protection against HQ- and BQ-induced toxicity.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Air pollution is a worldwide problem and has become a major environmental health issue (Chen et al., 2007; WHO, 2005). Air pollution is defined as a mixture of particulate matter (PM) and

gaseous chemicals consisting primarily of nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>), carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>), and volatile organic compounds (VOCs) (Ferm et al., 2006; Han and Naeher, 2006). In recent years, due to increasing emissions from outdoor (Riediker et al., 2003; Rodolfo Sosa et al., 2009) and indoor sources (Carrer et al., 2000), and individual activities (e.g. smoking) (Serrano-Trespacios et al., 2004), populations in large urban areas are exposed to high levels of VOCs (Tovalin et al., 2006), predominantly, monocyclic aromatic hydrocarbons, in particular benzene, toluene, ethylbenzene, and isomers of xylene (*m*-, *o*-, *p*-xylene) (Tovalin-Ahumada and Whitehead, 2007; Tovalin et al., 2006). Exposure to benzene has been associated with aplastic anemia, leukemia and lymphoma (Snyder, 2002; Yin et al., 1996). Besides its oncogenic effect on hematopoietic tissue, recent studies have correlated benzene exposure with tumor formation in human (Yin et al., 1996) and animal (Maltoni et al., 1989; Snyder et al., 1988) lungs, indicating that the lung is also a target of benzene-induced toxicity. Benzene toxicity is attributed to its metabolism, mainly in the liver (Koop et al., 1989; Nedelcheva et al., 1999; Ross, 2000; Snyder et al., 1989) and probably in the lungs (Powley and Carlson, 2000, 2001, 2002; Sheets et al., 2004), which leads to the formation of reactive metabolites hydroquinone (1,4-benzenediol or 1,4-hydroquinone; HQ) and its oxidized form benzoquinone

**Abbreviations:** ARE, antioxidant response element; BQ, benzoquinone; CO, carbon monoxide; ED50, effective dose 50; GCLM, glutamate cysteine ligase modifier subunit; GSH, glutathione; GSS, glutathione synthetase; GSTs, glutathione-S-transferases; HMOX1, heme oxygenase 1; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HQ, hydroquinone; OH·, hydroxyl radical; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; Maf, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene; MTS, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase quinone 1; NO<sub>x</sub>, nitrogen oxides; Nrf2, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; O<sub>3</sub>, ozone; ROS, reactive oxygen species; siRNA, short interference RNA; SO<sub>2</sub>, sulfur dioxide; O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, superoxide; UGTs, UDP-glucuronosyltransferases; VOCs, volatile organic compounds.

\* Corresponding author. Address: Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Apdo. Postal 70228, Código Postal 04510 México D.F., México. Tel.: +52 55 56 22 9177; fax: +52 55 55 50 0048.

E-mail address: [emilior@servidor.unam.mx](mailto:emilior@servidor.unam.mx) (E. Rojas).

<sup>1</sup> Present address: Cancer Institute (National Ministry of Education Key Laboratory of Cancer Prevention and Intervention) the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China.

(1,4-benzoquinone or *p*-benzoquinone; BQ). HQ and BQ are highly reactive molecules and, through redox cycling, they produce reactive oxygen species (ROS) (Bolton et al., 2000), including superoxide ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), nitric oxide (NO) and ultimately hydroxyl radical ( $OH^\bullet$ ); resulting in oxidative stress (Luo et al., 2008; Snyder and Hedli, 1996) and oxidative damage to DNA (Abernethy et al., 2004; Luo et al., 2008), proteins, and lipids (Gut et al., 1996; Winn, 2003). Moreover, addition of antioxidant enzymes (e.g. catalase) and *N*-acetyl cysteine, a glutathione precursor (GSH), has been shown to block oxidative damage induced by these metabolites (Barreto et al., 2009; Ruiz-Ramos et al., 2005) confirming the role of ROS production and oxidative stress in HQ and BQ cytotoxicity.

To counteract damage induced by oxidative stress, cells have developed an adaptive defense mechanism that leads to rapid and efficient induction of detoxifying enzymes (phase II enzymes) and antioxidants (Kang et al., 2005). Induction of these molecules is through a *cis*-acting element in the promoter region known as the antioxidant response element (ARE) (Lee et al., 2005). The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), a basic leucine zipper member of the cap 'n' collar family of transcription factors (Shen et al., 2004), is the principal regulator of the ARE-driven cellular defense system. Under homeostatic conditions, Nrf2 is present in the cytoplasm attaching to an actin-binding protein named Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (Lee et al., 2007). Keap1 functions as a suppressor of Nrf2 by retaining it in the cytosol and enhancing its proteasomal degradation (Lo and Hannink, 2006). Exposure to electrophiles and ROS uncouples the Nrf2–Keap1 complex, leading to the release of Nrf2 and its nuclear translocation where it dimerizes with other transcription factors such as members of the small Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene) family (Motohashi et al., 2004). Binding of these heterodimers to ARE enables transcriptional activation of many target genes including those encoding antioxidants (e.g. GSH), drug-metabolizing enzymes (Phase I and Phase II), drug-efflux pumps (Phase III), 26S proteasome subunits, heat shock proteins, growth factors, and transcription factors (Hayes and McMahon, 2009; Itoh et al., 1997; Owuor and Kong 2002). The up-regulation of these genes promotes cell survival and protection against oxidative damage (Lee et al., 2004; Li et al., 2005).

It has been demonstrated that the Nrf2-dependent adaptive response provides a pivotal defense mechanism against environmental hazards, including various air pollutants (reviewed in (Osburn and Kensler, 2008) and (Rubio et al., 2010)). In this study, we have explored the role of Nrf2 in protection against benzene metabolites HQ and BQ in human lung cells. Our results demonstrate that these metabolites are able to induce ARE-driven gene expression through the activation of Nrf2. However, knockdown of Nrf2 greatly enhances HQ- and BQ-induced cytotoxicity and cell death, and the increased susceptibility of the Nrf2-knockdown cells is associated with reduced levels of GSH and loss of induction of ARE-driven genes, suggesting that Nrf2 is essential for the survival of lung cells against the toxic effects of these benzene metabolites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and cell culture

All chemicals used in this study were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Human bronchial epithelial cells (Beas-2B) were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville MD). Beas-2B cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, South Logan UT) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Corporation, Carlsbad CA) and

antibiotics (100 U penicillin/ml and 100 µg streptomycin/ml (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

### 2.2. Plasmids and transient transfections

The plasmids pcDNA-Nrf2-V5 (referred as Nrf2-V5) (Jain et al., 2005) and pGL2B-NQO1-ARE-LUC (referred as ARE-LUC) (Dhakshinamoorthy and Jaiswal 2000) were a kind gift from Dr. Anil Jaiswal (University of Maryland). Transient transfection of Beas-2B cells were carried out using Lipofectamine 2000 following the manufacturer's instructions (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA). Briefly, the cells were seeded in 6-well plates at a density of  $3 \times 10^5$  cells/well (>90% confluence). Twenty-four hours after plating, cells were transfected with 4 µg of either the above plasmids or the pcDNA 3.1 empty vector diluted in Opti-MEM media (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA).

### 2.3. siRNA transfection

Control siRNA (5'-UAACGACGCGACGACGUAATT-3' and 5'-UUA CGUCGUCGCGUUAATT-3') and siRNA targeting human Nrf2 siRNA (Lee et al., 2008) (5'-GCUUUUGGCGCAGACAUUCTT-3' and 5'-GAAUGUCUGCGCAAAGCTG-3') were obtained from Ambion Inc. (Austin, TX). Beas-2B cells were transiently transfected with 100 nM of control siRNA or Nrf2 siRNA mixed with DharmaFect1 Transfection Reagent (Dharmacon, Lafayette, CO) according to the manufacturer's protocol.

### 2.4. Luciferase assay

Twenty-four hours after transfection with ARE-LUC, the cells were seeded in 96-well plates at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well and treated with conditions as elsewhere indicated. After the treatment, luciferase activity was determined using the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega Corporation, Madison WI) according to the manufacturer's instructions. Luminescence was recorded using a FLUOstar Optima plate reader (BMG Labtech Inc., Cary, NC).

### 2.5. Nuclear extraction

Nuclear extracts were prepared using the NE-PER system (Pierce Chemical Co., Rockford IL) following the manufacturer's recommendations. Briefly,  $3 \times 10^5$  control and treated cells were harvested and suspended in 100 µl of the cytoplasmic extraction reagent I (CER I) and incubated on ice for 10 min. The cytoplasmic extraction reagent II (CER II, 5 µL) was then added, vortexed for 5 s, incubated on ice for 1 min and centrifuged ( $16,000 \times g$ ) at 4 °C for 5 min. The pellet was suspended in 50 µl of nuclear extraction reagent (NER) and incubated on ice for 40 min, vortexing for 15 s every 10 min. After incubation, the sample was centrifuged at 4 °C ( $16,000 \times g$ ) for 5 min and the supernatant was collected and frozen at –80 °C until further use.

### 2.6. Cell viability

Cell viability was assessed by the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)-based assay following the manufacturer's instructions (Promega Corporation, Madison, WI).

### 2.7. Flow cytometry

Analysis of different stages of apoptosis was performed using Annexin-V/PI and Annexin-V/7-AAD staining kits (BD Pharmingen, San Jose, CA) following manufacturer's protocol, and analyzed by

flow cytometry (BD LSR II cytometer). Briefly,  $2 \times 10^5$  HQ or BQ-treated cells were harvested, washed with PBS, stained with either Annexin-V/PI or Annexin-V/7-AAD for 15 min at room temperature and analyzed by flow cytometry.

### 2.8. GSH measurement

GSH was assessed using the intracellular thiol probe ThioTracker Violet (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA) following the manufacturer's instructions. Briefly, Beas-2B cells were treated with various concentrations of either HQ or BQ in serum-free media for 2 h, washed twice with PBS, and stained with ThioTracker Violet for 30 min at 37 °C. Then, the dye was replaced with pre-warmed PBS and fluorescence intensity (410 nm excitation/520 nm emission) was measured using a FLUOstar Optima plate reader (BMG Labtech Inc., Cary, NC).

### 2.9. Western blot

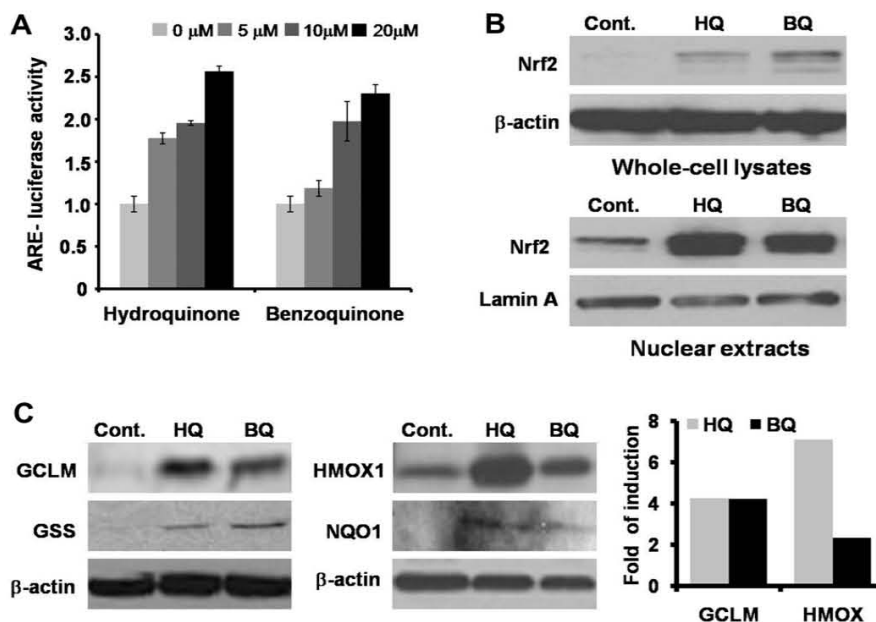
Cell lysates were prepared in lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) followed by centrifugation at  $16,000 \times g$  for 10 min at 4 °C. Total protein was quantified using a bicinchoninic acid kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Equal amounts of protein were loaded in a 4–20% gradient polyacrylamide gel (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and transferred to a PVDF membrane. The membrane was blocked with 5% non-fat milk solution and sequentially incubated with primary antibody and enzyme-conjugated secondary antibody. The bands were visualized using the chemiluminescence

method according to the manufacturer's guidelines (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Antibodies used were purchased from the following suppliers: Nrf2, HMOX1, GSS, NQO1, GCLM and lamin A from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA);  $\beta$ -actin and GAPDH from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO); and anti-rabbit, anti-goat and anti-mouse IgG peroxidase linked whole antibody from GE Healthcare (GE Healthcare, Waukesha, WI).

## 3. Results

### 3.1. Induction of ARE-driven gene expression and Nrf2 activation by HQ and BQ

To examine the capability of HQ and BQ in the induction of ARE-driven gene expression, human bronchial epithelial cells, Beas-2B, were transiently transfected with a luciferase reporter plasmid driven by the NQO1 gene ARE (referred as ARE-LUC) (Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000). The cells were exposed to various concentrations (5–20  $\mu$ M) of HQ or BQ for 16 h and assayed for luciferase activity. These doses were found to produce mild to moderate stress to the cells without causing appreciable cytotoxicity that may interfere with the reporter gene assay (Crisman et al., 2007; Fan and Wood, 2007). Both HQ and BQ treatments resulted in a dose-dependent induction of ARE-driven luciferase activity (Fig. 1A). When used at a lower concentration (5  $\mu$ M), HQ seemed to be a stronger ARE inducer than BQ. However, when a higher concentration (20  $\mu$ M) was used, they induced luciferase activities at a comparable rate ( $\sim$ 2.5-fold). We then evaluated if the observed ARE induction could correlate with the activation of the Nrf2 pathway. A rapid elevation of Nrf2



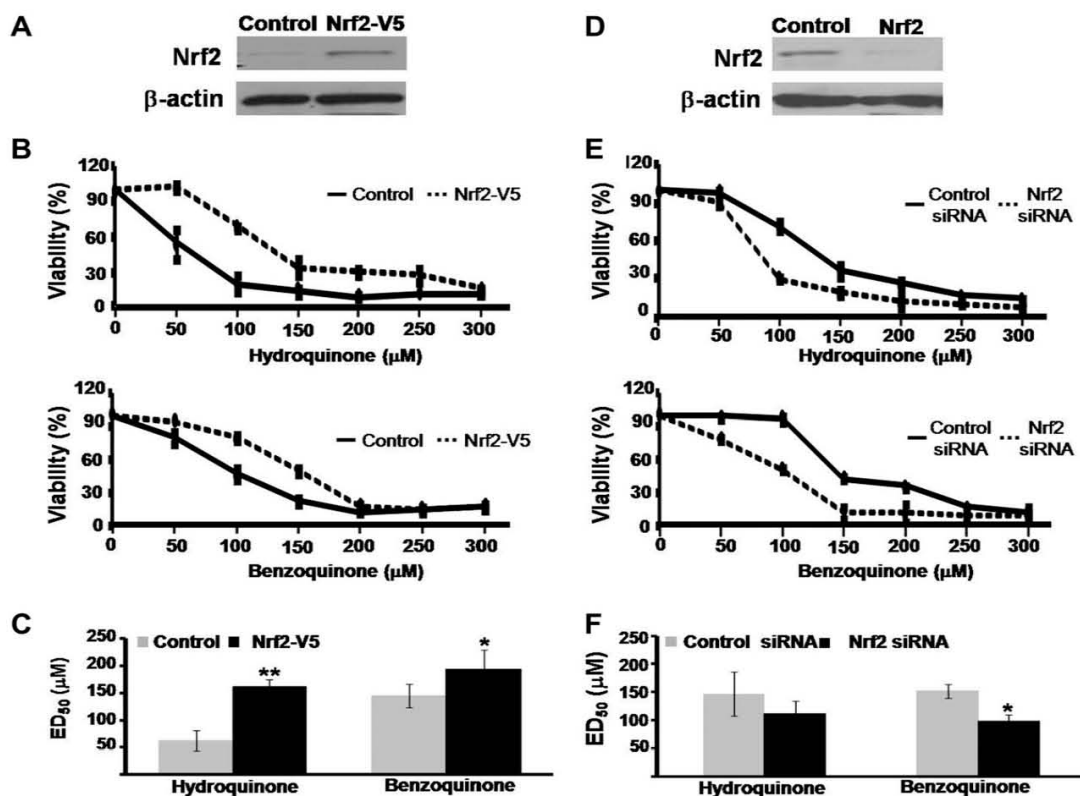
**Fig. 1.** Induction of ARE-driven gene expression and activation of Nrf2 by HQ and BQ. (A) Beas-2B cells were transfected with the ARE-LUC reporter vector. Forty-eight hours after transfection, the cells were treated with various concentrations of HQ or BQ for  $\sim$ 16 h and luciferase activity was measured. Data are expressed as fold of induction of luciferase activity compared to vehicle-control (dimethyl sulfoxide) (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ). (B) Exposure to either HQ or BQ increases Nrf2 protein expression and causes Nrf2 nuclear accumulation. Beas-2B cells were treated with 20  $\mu$ M of HQ or 10  $\mu$ M of BQ for 4 h. Nuclear extracts and whole-cell lysates were prepared as described in Section 2.  $\beta$ -actin and lamin A antibodies were used as loading controls for whole-cell lysates and nuclear extracts respectively. (C) Up-regulation of Nrf2-dependent enzymes. Western blot analysis of Beas-2B cells treated with up to 20  $\mu$ M of HQ or 10  $\mu$ M of BQ for 16 h.  $\beta$ -actin antibody was used as loading control. Quantification of band intensity was performed by ImageJ version 1.42q software (developed by the National Institute of Health) (right panel) and expressed as percentage of induction compare to vehicle-treated cells (control). Data are representative of three independent experiments with similar results. GCLM, glutamate cysteine ligase modifier subunit; GSS, glutathione synthetase; HMOX1, heme oxygenase 1; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase quinone 1.

protein was detected in whole-cell lysates prepared after a short term treatment (4 h) with either HQ or BQ (Fig. 1B). Since Nrf2 nuclear translocation is a key event in the activation of this pathway, we examined Nrf2 nuclear accumulation in either HQ or BQ treated Beas-2B cells. Western blot analysis showed that HQ and BQ led to Nrf2 accumulation in nuclear extracts after 4 h treatment (Fig. 1B). These data indicate that Nrf2 is rapidly stabilized and mobilized to the nucleus in response to HQ and BQ treatments. Next, to determine the effect of Nrf2 activation on gene expression, levels of several well-known Nrf2 target proteins were analyzed. These included GSH synthesis enzymes glutamate cysteine ligase modifier subunit (GCLM) and glutathione synthetase (GSS), the drug-metabolizing enzyme NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1), and the antioxidant enzyme heme oxygenase 1 (HMOX1). As shown in Fig. 1C, induction of these proteins was confirmed in cells exposed to either HQ or BQ for 16 h. Levels of HMOX1 and GCLM were markedly increased by both compounds, whereas expression of GSS and NQO1 only became detectable after treatment with either HQ or BQ. Noteworthy, HQ treatment caused a greater accumulation of HMOX1 (7-fold induction) as compared to the BQ treatment (2-fold). These results demonstrate that HQ and BQ activate Nrf2 by triggering its nuclear translocation and protein accumulation

leading to the transcriptional up-regulation of ARE-driven genes in Beas-2B cells.

### 3.2. Protection against HQ- and BQ-induced cytotoxicity and cell death by Nrf2

To evaluate the role of Nrf2 in HQ- and BQ-induced cytotoxicity, we explored whether Nrf2 overexpression could confer cytoprotection against these xenobiotics in lung epithelial cells. Beas-2B cells were transfected with Nrf2-V5 plasmid to establish the transient overexpression of wild-type Nrf2 (Fig. 2A). Transfected cells were treated with different concentrations of either HQ or BQ for 5 h and cell viability was assessed by MTS reduction assay. As shown in Fig. 2B, cells overexpressing Nrf2 exhibited significantly attenuated loss of viability caused by HQ or BQ treatments compared to control cells, as reflected by either raised viability curves (Fig. 2B) or increased effective dose 50 (ED<sub>50</sub>, yielding 50% cell viability) (Fig. 2C). To further stress the importance of Nrf2 in protection against HQ and BQ cytotoxicity, Nrf2 in Beas-2B cells was silenced by siRNA (short silencing RNA) and tested for their susceptibility to these metabolites. Nrf2 siRNA transfection led to a knockdown of Nrf2 protein to an undetectable level as determined



**Fig. 2.** The role of Nrf2 in protection against HQ- and BQ-induced cytotoxicity. Overexpression experiments (A–C). (A) Western blot analysis of Nrf2 expression in Beas-2B cells transiently transfected with pcDNA 3.1 or Nrf2-V5 plasmid.  $\beta$ -actin was used as loading control. (B) Beas-2B cells overexpressing Nrf2 were exposed to various concentrations of either HQ or BQ for 5 h and cytotoxicity was determined by MTS reduction assay. The curves represent the percentage of viability of treated cells relative to untreated-control cells (mean  $\pm$  SD;  $n > 3$ ). Note: data are representative of at least three independent experiments with similar results. (C) Based on the cytotoxicity assays, effective dose 50 (ED<sub>50</sub>) was calculated for HQ and BQ in control and Nrf2-overexpressing cells (mean  $\pm$  SD;  $n > 4$ ). Knockdown experiment (D–F). (D) Western blot analysis of Nrf2 in Beas-2B cells transfected with control siRNA or siRNA targeting Nrf2.  $\beta$ -actin was used as loading control. (E) Forty-eight hours after siRNA transfection, Beas-2B cells were exposed to various concentrations of either HQ or BQ for 5 h and cytotoxicity was evaluated by MTS reduction assay. The curves represent the percentage of viability of treated cells relative to untreated-control cells (mean  $\pm$  SD;  $n > 3$ ). Note: data are representative of at least three independent experiments with similar results. (F) Based on the cytotoxicity assays, effective dose 50 (ED<sub>50</sub>) was calculated for HQ and BQ in control and Nrf2-knockdown Beas-2B cells (mean  $\pm$  SD;  $n > 4$ ). Student's *t*-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

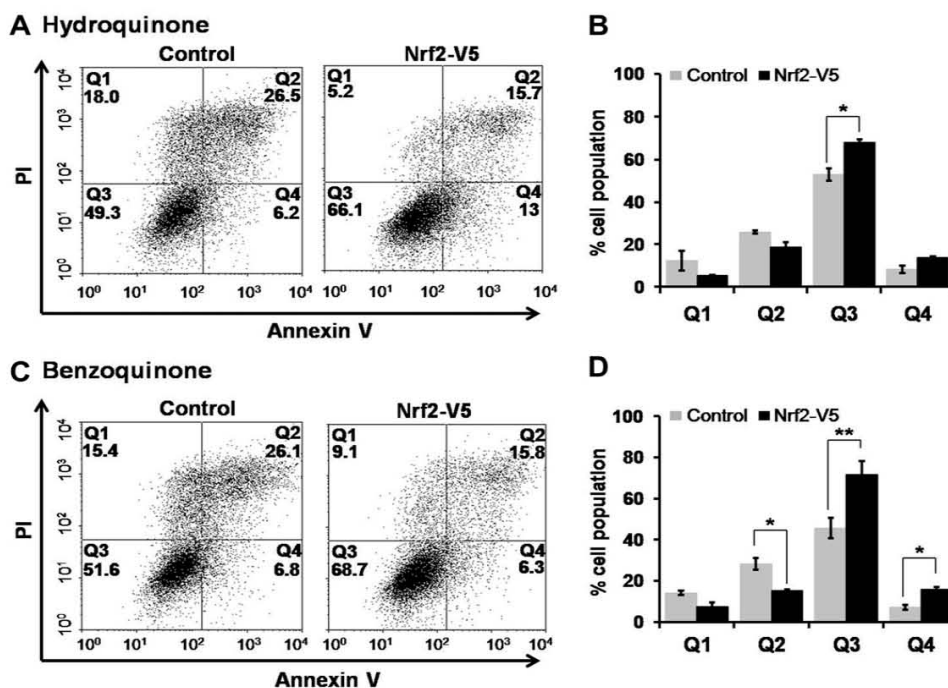
by Western blot analysis (Fig. 2D). The Nrf2-knockdown cells exhibited increased susceptibility to either HQ- or BQ-induced cytotoxicity as reflected by lowered viability curves (Fig. 2E) and decreased ED50s for HQ and BQ as compared to control-siRNA transfected cells (Fig. 2F).

Since the above cell viability assay (MTS) was based on measuring mitochondrial function and unable to differentiate the processes of cell death in detail, we further assessed cytotoxicity of HQ and BQ in Nrf2 overexpressing and knockdown cells using cell death-based assays. Apoptosis was determined by annexin V/PI (overexpression experiments) and annexin V/7-AAD (knockdown experiments) staining followed by flow cytometry analysis. Although pronounced induction of cell death was observed in both controls and Nrf2 overexpressing Beas-2B cells after the treatment of either HQ or BQ (4 h, 50  $\mu$ M) (Fig. 3), Nrf2 overexpressing cells showed a relatively lower rate of cell death compared to control cells (empty vector transfected cells) (Fig. 3). Noteworthy, early apoptotic cells (annexin<sup>V</sup>/PI<sup>+</sup>) were, in fact, slightly increased in the Nrf2-overexpressing cells, but the overall apoptotic process was remarkably reduced in these cells. In addition, we also tested if lack of Nrf2 could enhance apoptotic cell death induced by either HQ or BQ (Fig. 4). After HQ treatment (4 h, 50  $\mu$ M) ~40% of Nrf2-knockdown cells were dead or in later stages of apoptosis whereas only ~20% of control cells were dead or apoptotic (Fig. 4A and C). Moreover, the percentage of viable cells was significantly lower in Nrf2-knockdown cells than that of control cells. Similar results were obtained from the BQ treatment, in which ~60% of Nrf2-knockdown cells were dead or in later stages of apoptosis but only ~40% of control cells were the case (Fig. 4B and D). Taken together, these results demonstrate that Nrf2 overexpression attenuates cytotoxicity and cell death induced by both HQ and BQ whereas

Nrf2 deficiency increases susceptibility of Beas-2B cells to these compounds.

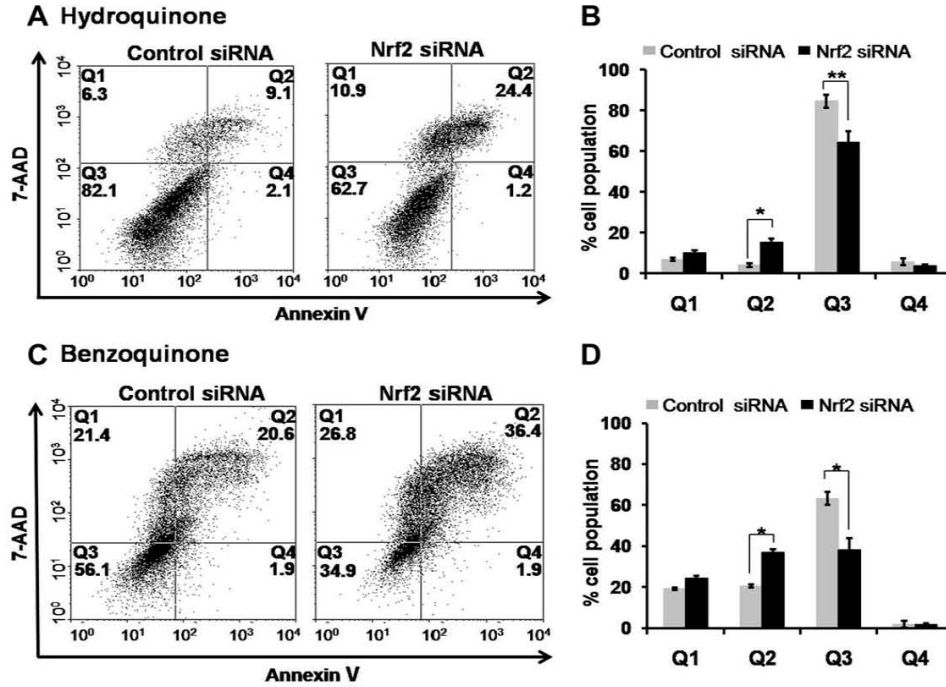
### 3.3. Reduced GSH levels and loss of inducibility of ARE-driven genes in Nrf2-knockdown cells

GSH is the most abundant cellular non-protein thiol, it plays a central role in maintaining cellular redox status and protecting against oxidative damage (Zhang et al., 2009). GSH depletion appears to be one of the key mechanisms underlying HQ and BQ toxicity in other human cells (Luo et al., 2008; Smith, 1999; Trush et al., 1996). We measured GSH levels in Beas-2B cells treated with various concentrations of either HQ or BQ for a short period (2 h). As shown in Fig. 5A, cellular GSH decreased in a dose-response manner in both treatments, with relatively greater depletion of GSH in BQ treatment. Since Nrf2 is a master regulator of antioxidant transcriptional response, we hypothesized that the initial depletion of GSH by HQ and BQ could trigger an Nrf2-dependent up-regulation of detoxifying enzymes and antioxidants, which could help detoxify these compounds (Bolton et al., 2000; Moran et al., 1999; Smith, 1999). In order to delineate the role of Nrf2 in this detoxification mechanism, we studied the effect of Nrf2-knockdown in the same cellular model. As expected, Nrf2-knockdown cells had lower basal levels of GSH compared to the control-transfected cells (80%) (Fig. 5B). When the siRNA transfected cells were treated with either 20  $\mu$ M of HQ or 10  $\mu$ M of BQ for 16 h, protein levels of HMOX and GSS were markedly increased in control-siRNA transfected cells, but this induction was totally absent in Nrf2-knockdown cells (Fig. 5C). These results suggest that the previously observed enhanced HQ/BQ cytotoxicity in Nrf2-knockdown cells is due to decreased production of GSH and

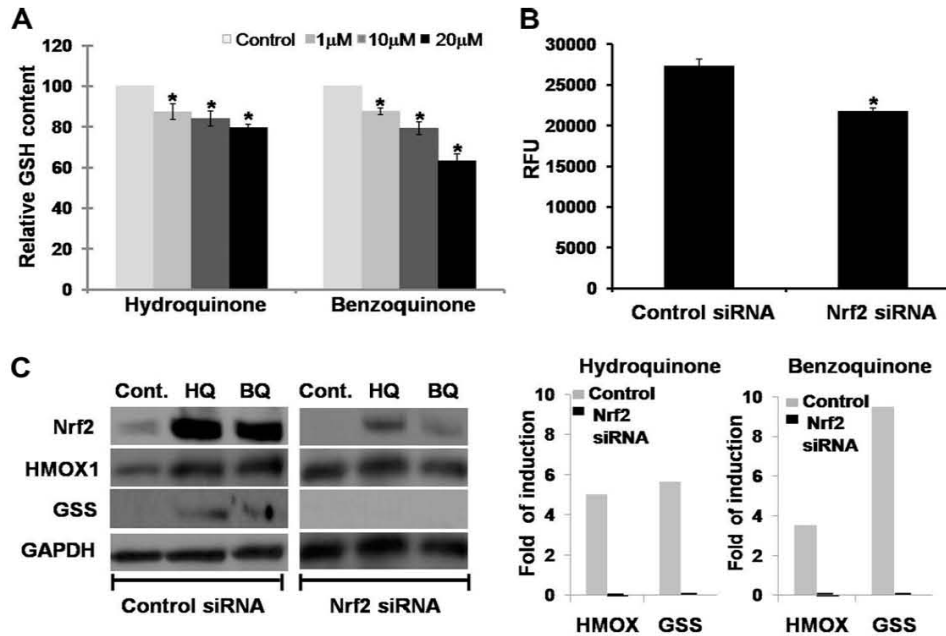


**Fig. 3.** Nrf2 overexpression renders protection against HQ- and BQ-induced apoptotic cell death induction. Forty-eight hours after transfection with control or Nrf2-V5 plasmid Beas 2-B cells were exposed to 50  $\mu$ M of either HQ or BQ for ~4 h. Apoptosis and cell death induction was evaluated by Annexin-V/PI staining followed by flow cytometry analysis. Data from  $1 \times 10^4$  cells were acquired. Representative flow cytometry profiles are presented for HQ (A) and BQ (C) treated cells. The percentage of cell population in each quadrant is indicated. (B) and (D) Data shown as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Q1, dead cells (annexin<sup>V</sup>/PI<sup>+</sup>); Q2, late apoptotic cells (annexin<sup>V</sup>/PI<sup>+</sup>); Q3, viable cells (annexin<sup>V</sup>/PI<sup>-</sup>); Q4, early apoptotic cells (annexin<sup>V</sup>/PI<sup>+</sup>). Student's *t*-test \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.





**Fig. 4.** Nrf2-knockdown enhances HQ- and BQ-induced apoptotic cell death. Forty-eight hours after transfection with control or Nrf2 siRNA, Beas 2-B cells were exposed to 50  $\mu$ M of either HQ or BQ for ~4 h. Apoptosis and cell death induction was evaluated by Annexin-V/7-AAD staining followed by flow cytometry analysis. Data from  $1 \times 10^4$  cells were acquired. Representative flow cytometry profiles are presented for HQ (A) and BQ (C) treated cells. The percentage of cell population in each quadrant is indicated. (B) and (D) Data shown as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Q1, dead cells (annexinV<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>); Q2, late apoptotic cells (annexinV<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup>); Q3, viable cells (annexinV<sup>-</sup>/7AAD<sup>-</sup>); Q4, early apoptotic cells (annexinV<sup>-</sup>/7AAD<sup>+</sup>). Student's *t*-test \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

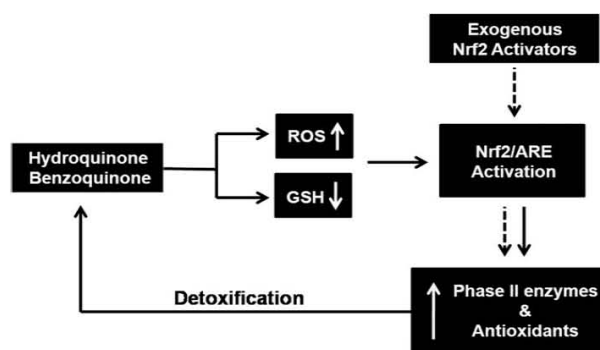


**Fig. 5.** Reduced GSH and loss of inducibility of HMOX1 and GSS in Nrf2-knockdown cells. (A) Beas-2B were treated at the indicated concentrations for 2 h followed by measurement of GSH intracellular content (mean  $\pm$  SD; *n* = 4). (B) GSH content was measured 48 h after transfection with either control siRNA or Nrf2 siRNA (mean  $\pm$  SD; *n* = 3) as described in Section 2. (C) Forty-eight hours after transfection, control and Nrf2-knockdown cells were treated with the indicated concentrations of HQ or BQ for 16 h. After treatment, protein levels of Nrf2, HMOX1 and GSS were determined by Western blot analysis. GAPDH was used as loading control. Quantification of bands intensity was performed by ImageJ version 1.42q software (developed by the National Institute of Health) (right panel) and expressed as percentage of induction compared to vehicle-treated cells (control). Data are representative of three independent experiments with similar results. Student's *t*-test \**p* < 0.05.

loss of inducibility of Nrf2-dependent antioxidant enzymes including HMOX and enzymes responsible for GSH metabolism (e.g. GSS). Therefore, the deficiency of Nrf2 reduces cellular redox capacity to counteract oxidative damage induced by HQ and BQ.

#### 4. Discussion

In this study, we used human bronchial epithelial cells (Beas-2B) as a cellular model to explore the role of the Nrf2 pathway in the defense against HQ- and BQ-induced cytotoxicity in lung. We have shown that both HQ and BQ are able to induce ARE-driven gene expression in the lung cells, as reflected by an increase in ARE-dependant luciferase reporter activity (Fig. 1A). HQ and BQ exposures also lead to increased Nrf2 total protein levels, as well as Nrf2 nuclear accumulation (Fig. 1B). It is well established that Nrf2 nuclear accumulation and protein stabilization are indicators of Nrf2 activation (Li et al., 2005; Niture et al., 2009). Hence, these results reveal that HQ and BQ are Nrf2 activators, capable of inducing ARE-driven gene expression. Furthermore, we confirmed that HQ and BQ can induce endogenous ARE-driven genes, including those encoding GSH synthesis enzymes GCLM and GSS, the drug-metabolizing enzyme NQO1, and the antioxidant enzyme HMOX1. The induction of detoxifying enzymes (phase II enzymes) and antioxidants is critical for detoxification of benzene metabolites. NQO1 and GSH have been found to be key intrinsic molecules that defend against benzene-induced toxicity in hematopoietic cells (reviewed in (Bolton et al., 2000) and (Ross and Zhou, 2009)). NQO1 is a flavoprotein that catalyzes the beneficial two-electron reduction of benzoquinone to hydroquinone, preventing unwanted one-electron reduction which results in formation of ROS, thus avoiding redox cycling of semiquinone radicals and the subsequent covalent modification of cellular components (Vasiliou et al., 2006). It has been clearly demonstrated that NQO1 induction protects against cell death induced by HQ (Smith 1999) and BQ (Flescher and Snyder, 1995). Moreover, conjugation of HQ and BQ to GSH and other endogenous substrates (e.g. glucuronic acid) enables the formation of less reactive and toxic metabolites, with increased solubility and excretion (Snyder et al., 1993). Induction of the GSH synthesis enzymes and enzymes that catalyze the conjugation reactions (such as glutathione-S-transferases (GSTs) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs)) is mostly regulated by Nrf2 (Biswas and Rahman, 2009; Cho et al., 2002). Nrf2-dependent gene expression not only counteracts oxidative stress produced by HQ and BQ exposures, but also participates in the biotransformation and excretion of these metabolites. Our study demonstrated that exposure to either HQ or BQ causes a rapid GSH depletion (Fig. 5A) likely due to production of ROS or direct conjugation with the compounds (Luo et al., 2008; Smith, 1999; Trush et al., 1996), leading to Nrf2 activation and subsequent induction of GCLM and GSS (Fig. 1C), two major enzymes involved GSH synthesis (Biswas and Rahman, 2009). On the other hand, HQ and BQ are Michael reaction acceptors (Bolton et al., 2000), compounds that have been shown to react with SH groups of Keap1 leading to Nrf2 nuclear translocation and the subsequent activation of the pathway (Dinkova-Kostova et al., 2001; Wang et al., 2010). It is more likely that both of these two mechanisms of Nrf2 induction contribute to the observed Nrf2 activation. These results allow us to assemble a series of consequential events: exposure to HQ and BQ → ROS production → depletion of GSH and generation of oxidative stress → Nrf2 activation → induction of ARE-driven gene expression → detoxification of HQ and BQ and repair of oxidative damage (Fig. 6). This suggests that there exists an auto-regulation mechanism (Rubio et al., 2010) for the detoxification of HQ/BQ compounds and it is largely dependent on the activation of the Nrf2/ARE pathway.



**Fig. 6.** Model detoxification pathway involved in the activation of Nrf2. Exposure to benzene metabolites HQ and BQ causes GSH depletion and ROS generation, resulting in changes in the redox status of the cell, which triggers nuclear translocation of Nrf2 and the activation of the Nrf2/ARE pathway, in turn leading to up-regulation of Phase II detoxification enzymes and enzymes responsible for the synthesis of endogenous antioxidants such as GSH. This auto-regulation mechanism is suggested as a therapeutic target to prevent or reduce benzene toxicity using pharmaceutical or natural dietary agents.

To further elucidate the protective role of Nrf2 against HQ- and BQ-induced cytotoxicity and cell death, two strategies were used to manipulate Nrf2 levels: gene overexpression and knockdown. While Nrf2 overexpression significantly reduced the cytotoxicity and apoptotic cell death induced by either HQ or BQ (Figs. 2 and 3), knockdown of Nrf2 by siRNA led to the opposite effects (Figs. 4 and 5). These results are in agreement with several previous reports in which neurons and kidney cells with Nrf2 overexpression showed enhanced resistance against oxidant-induced cell death (Chen and Shaikh, 2009; Shih et al., 2003), however, Nrf2-knockdown bone marrow stromal cells exhibited increased sensitivity to HQ and BQ (Zhu et al., 2006). Finally, we demonstrated that (1) reduced cellular GSH (Fig. 5B) and (2) impaired induction of ARE-driven genes including GSS and HMOX (Fig. 5C), both due to the loss of Nrf2, are the mechanistic explanations for the observed enhanced susceptibility of Nrf2-knockdown cells to HQ and BQ. In other words, once the “auto-regulation” mechanism (Fig. 6) is disrupted, e.g., by inactivation of Nrf2, cells are more susceptible to these compounds. It is noteworthy that BQ appears to be relatively more potent than HQ in terms of depleting GSH and causing cytotoxicity (Figs. 1, 4 and 5). Compared to HQ, BQ is considered a less stable, but more reactive electrophile (Gaskell et al., 2005) capable of reacting directly with cellular components (e.g. DNA and proteins) and GSH (Snyder and Hedli, 1996). Nevertheless, manipulation of Nrf2 significantly affects cytotoxicity induced by either HQ or BQ (Figs. 2–4).

Our study demonstrated that the Nrf2/ARE pathway is essential in the intrinsic defense against inhaled benzene and its metabolites HQ and BQ. This knowledge is critical for the development of strategies to help susceptible populations exposed to these air pollutants. One of the most prominent developing strategies to prevent or reduce the benzene-induced damage is to enhance the Nrf2-dependent antioxidant response. It has been suggested that failure to induce functional NQO1 contributes to increased risk of benzene hematotoxicity (Moran et al., 1999) and induction of this enzyme by a well-known Nrf2 inducer, (Kwak et al., 2001) was proven to increase protein levels preventing HQ-induced apoptosis in hematopoietic cells. Furthermore, NQO1 can facilitate the formation of less toxic and soluble metabolites that are easier to be eliminated (Schrenk et al., 1996). Recently, several dietary chemopreventive compounds (e.g. curcuminoids, resveratrol, and isothiocyanates) have been reported to increase Nrf2 levels, disassociate

Nrf2 of its cytosolic inhibitor Keap1, or/and enhance Nrf2 protein stabilization, resulting in the activation of Nrf2-dependent gene expression (reviewed in (Kwak et al., 2004) and (Jeong et al., 2006)). Use of these common and abundant compounds could prove to be a simple and safe strategy to provide protection against benzene- and benzene metabolite-induced toxicity. With tens of millions of people living and working in densely populated cities and industrial areas, such a preventive strategy – if successful – could have a significant impact on lessening the public health burden from exposure to oxidant pollutants.

### Acknowledgment

This work is supported by the Methodist Hospital Research Institute Faculty Seed Fund to Z.-Z.S. and partially by DGAPA-UNAM grant number IN212107. V.R. is a recipient of a CONACYT fellowship. We thank Audrey Ponce de Leon and Yu Li for technical assistance and Philip Randall for comments on the manuscript.

### References

- Abernethy, D.J., Klymenova, E.V., Rose, J., Recio, L., Faiola, B., 2004. Human CD34+ hematopoietic progenitor cells are sensitive targets for toxicity induced by 1,4-benzoquinone. *Toxicol. Sci.* 79, 82–89.
- Barreto, G., Madureira, D., Capani, F., Aon-Bertolino, L., Saraceno, E., Alvarez-Giraldez, L.D., 2009. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 771–780.
- Biswas, S.K., Rahman, I., 2009. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol. Aspects Med.* 30, 60–76.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 135–160.
- Carrer, P., Maroni, M., Alcini, D., Cavallo, D., Fustinoni, S., Lovato, L., Visigalli, F., 2000. Assessment through environmental and biological measurements of total daily exposure to volatile organic compounds of office workers in Milan, Italy. *Indoor Air* 10, 258–268.
- Chen, J., Shaikh, Z.A., 2009. Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 81–89.
- Chen, T.M., Shofer, S., Gokhale, J., Kuschner, W.G., 2007. Outdoor air pollution: overview and historical perspective. *Am. J. Med. Sci.* 333, 230–234.
- Cho, H.Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.Y., Kleeberger, S.R., 2002. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 175–182.
- Crisman, T.J., Parker, C.N., Jenkins, J.L., Scheiber, J., Thoma, M., Kang, Z.B., Kim, R., Bender, A., Nettles, J.H., Davies, J.W., Glick, M., 2007. Understanding false positives in reporter gene assays: in silico chemogenomics approaches to prioritize cell-based HTS data. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 1319–1327.
- Dhakshinamoorthy, S., Jaiswal, A.K., 2000. Small maf (MafC and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J. Biol. Chem.* 275, 40134–40141.
- Dinkova-Kostova, A.T., Massiah, M.A., Bozak, R.E., Hicks, R.J., Talalay, P., 2001. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3404–3409.
- Fan, F., Wood, K.V., 2007. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.* 5, 127–136.
- Ferm, M., Watt, J., O'Hanlon, S., De Santis, F., Varotsos, C., 2006. Deposition measurement of particulate matter in connection with corrosion studies. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1320–1330.
- Flescher, E., Snyder, C.A., 1995. Aspirin-like drugs can protect human T lymphocytes against benzoquinone cytotoxicity: evidence for a NAD(P)H:quinone reductase-dependent mechanism. *Arch. Toxicol.* 69, 684–689.
- Gaskell, M., McLuckie, K.L., Farmer, P.B., 2005. Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and *p*-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity. *Carcinogenesis* 26, 673–680.
- Gut, I., Nedelcheva, V., Soucek, P., Stopka, P., Tichavska, B., 1996. Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1211–1218.
- Han, X., Naeher, L.P., 2006. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environ. Int.* 32, 106–120.
- Hayes, J.D., McMahon, M., 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 34, 176–188.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322.
- Jain, A.K., Bloom, D.A., Jaiswal, A.K., 2005. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J. Biol. Chem.* 280, 29158–29168.
- Jeong, W.S., Jun, M., Kong, A.N., 2006. Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 99–106.
- Kang, K.W., Lee, S.J., Kim, S.G., 2005. Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1664–1673.
- Koop, D.R., Laethem, C.L., Schrier, G.G., 1989. Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a (P450III<sub>A1</sub>) as a benzene and phenol hydroxylase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98, 278–288.
- Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T.R., Kensler, T.W., 2001. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol. Med.* 7, 135–145.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Kensler, T.W., 2004. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* 555, 133–148.
- Lee, H.R., Cho, J.M., Shin, D.H., Yong, C.S., Choi, H.G., Wakabayashi, N., Kwak, M.K., 2008. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S, R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol. Cell Biochem.* 318, 23–31.
- Lee, J.M., Chan, K., Kan, Y.W., Johnson, J.A., 2004. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9751–9756.
- Lee, J.M., Li, J., Johnson, D.A., Stein, T.D., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Johnson, J.A., 2005. Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J.* 19, 1061–1066.
- Lee, O.H., Jain, A.K., Papusha, V., Jaiswal, A.K., 2007. An auto-regulatory loop between stress sensors Nrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J. Biol. Chem.* 282, 36412–36420.
- Li, J., Johnson, D., Calkins, M., Wright, L., Svendsen, C., Johnson, J., 2005. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicol. Sci.* 83, 313–328.
- Lo, S.C., Hannink, M., 2006. CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. *Mol. Cell Biol.* 26, 1235–1244.
- Luo, L., Jiang, L., Geng, C., Cao, J., Zhong, L., 2008. Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem. Biol. Interact.* 173, 1–8.
- Maltoni, C., Ciliberti, A., Cotti, G., Conti, B., Belpoggi, F., 1989. Benzene, an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Environ. Health Perspect.* 82, 109–124.
- Moran, J.L., Siegel, D., Ross, D., 1999. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8150–8155.
- Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D., Yamamoto, M., 2004. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6379–6384.
- Nedelcheva, V., Gut, I., Soucek, P., Tichavska, B., Tynkova, L., Mraz, J., Guengerich, F.P., Ingelman-Sundberg, M., 1999. Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch. Toxicol.* 73, 33–40.
- Niture, S.K., Kaspar, J.W., Shen, J., Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 37–42.
- Osburn, W.O., Kensler, T.W., 2008. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659, 31–39.
- Owuor, E.D., Kong, A.N., 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 64, 765–770.
- Powley, M.W., Carlson, G.P., 2000. Cytochromes P450 involved with benzene metabolism in hepatic and pulmonary microsomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 303–309.
- Powley, M.W., Carlson, G.P., 2001. Hepatic and pulmonary microsomal benzene metabolism in CYP2E1 knockout mice. *Toxicology* 169, 187–194.
- Powley, M.W., Carlson, G.P., 2002. Benzene metabolism by the isolated perfused lung. *Inhal. Toxicol.* 14, 569–584.
- Riediker, M., Williams, R., Devlin, R., Griggs, T., Bromberg, P., 2003. Exposure to particulate matter, volatile organic compounds, and other air pollutants inside patrol cars. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2084–2093.
- Rodolfo Sosa, E., Humberto Bravo, A., Violeta Mugica, A., Pablo Sanchez, A., Emma Bueno, L., Krupa, S., 2009. Levels and source apportionment of volatile organic compounds in southwestern area of Mexico City. *Environ. Pollut.* 157, 1038–1044.
- Ross, D., 2000. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *J. Toxicol. Environ. Health A* 61, 357–372.
- Ross, D., Zhou, H., 2009. Relationships between metabolic and non-metabolic susceptibility factors in benzene toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 184, 222–228.
- Rubio, V., Valverde, M., Rojas, E., 2010. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17, 369–382.
- Ruiz-Ramos, R., Cebrán, M.E., Garrido, E., 2005. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology* 209, 279–287.
- Schrenk, D., Orzechowski, A., Schwarz, L.R., Snyder, R., Burchell, B., Ingelman-Sundberg, M., Bock, K.W., 1996. Phase II metabolism of benzene. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1183–1188.

- Serrano-Trespalacios, P.I., Ryan, L., Spengler, J.D., 2004. Ambient, indoor and personal exposure relationships of volatile organic compounds in Mexico City Metropolitan Area. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 14 (Suppl. 1), S118–S132.
- Sheets, P.L., Yost, G.S., Carlson, G.P., 2004. Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 92–99.
- Shen, G., Hebbbar, V., Nair, S., Xu, C., Li, W., Lin, W., Keum, Y.S., Han, J., Gallo, M.A., Kong, A.N., 2004. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* 279, 23052–23060.
- Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J.A., Murphy, T.H., 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* 23, 3394–3406.
- Smith, M.T., 1999. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7624–7626.
- Snyder, C.A., Sellakumar, A.R., James, D.J., Albert, R.E., 1988. The carcinogenicity of discontinuous inhaled benzene exposures in CD-1 and C57Bl/6 mice. *Arch. Toxicol.* 62, 331–335.
- Snyder, R., 2002. Benzene and leukemia. *Crit. Rev. Toxicol.* 32, 155–210.
- Snyder, R., Dimitriadis, E., Guy, R., Hu, P., Cooper, K., Bauer, H., Witz, G., Goldstein, B.D., 1989. Studies on the mechanism of benzene toxicity. *Environ. Health Perspect.* 82, 31–35.
- Snyder, R., Hedli, C.C., 1996. An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1165–1171.
- Snyder, R., Witz, G., Goldstein, B.D., 1993. The toxicology of benzene. *Environ. Health Perspect.* 100, 293–306.
- Tovalin-Ahumada, H., Whitehead, L., 2007. Personal exposures to volatile organic compounds among outdoor and indoor workers in two Mexican cities. *Sci. Total Environ.* 376, 60–71.
- Tovalin, H., Valverde, M., Morandi, M.T., Blanco, S., Whitehead, L., Rojas, E., 2006. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. *Occup. Environ. Med.* 63, 230–236.
- Trush, M.A., Twerdok, L.E., Rembish, S.J., Zhu, H., Li, Y., 1996. Analysis of target cell susceptibility as a basis for the development of a chemoprotective strategy against benzene-induced hematotoxicities. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1227–1234.
- Vasilou, V., Ross, D., Nebert, D.W., 2006. Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum. Genomics* 2, 329–335.
- Wang, X.J., Hayes, J.D., Higgins, L.G., Wolf, C.R., Dinkova-Kostova, A.T., 2010. Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem. Biol.* 17, 75–85.
- WHO 2005. Air Quality Guidelines-global Update 2005 World Health Organization.
- Winn, L.M., 2003. Homologous recombination initiated by benzene metabolites: a potential role of oxidative stress. *Toxicol. Sci.* 72, 143–149.
- Yin, S.N., Hayes, R.B., Linet, M.S., Li, G.L., Dosemeci, M., Travis, L.B., Zhang, Z.N., Li, D.G., Chow, W.H., Wacholder, S., Blot, W.J., 1996. An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. Benzene study group. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1339–1341.
- Zhang, J.W., Rubio, V., Zheng, S., Shi, Z.Z., 2009. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 796–804.
- Zhu, H., Zhang, L., Itoh, K., Yamamoto, M., Ross, D., Trush, M.A., Zweier, J.L., Li, Y., 2006. Nrf2 controls bone marrow stromal cell susceptibility to oxidative and electrophilic stress. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 132–143.

**Oxidative stress induced by inhalation of a mixture of ozone and volatile organic compounds**

**Running title:** Oxidative stress induction by ozone and VOCs

Valentina Rubio, Mahara Valverde, Emilio Rojas\*.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad Universitaria, México D.F. 04510.

\*Correspondence to: Emilio Rojas Ph. D.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México  
México D.F. Coyoacán, Apdo. Postal 70228, Código Postal 04510 México.  
Telephone: (52) (55) 56 22 9177  
Fax: (52) (55) 55 50 0048  
Email address: [emilior@servidor.unam.mx](mailto:emilior@servidor.unam.mx)

## **Abstract**

The promotion of oxidative stress had been implicated as an important mechanism by which air pollutants, like ozone and volatile organic compounds (VOCs) exerts their toxicity. In this study, we compare the oxidative effects of an acute (1 hr) exposure to a mixture of ozone and VOCs to either ozone or VOCs alone exposures in lungs, liver and kidneys of male CD-1 mice. Exposure to the mixture of  $1 \pm 0.12$  ppm of ozone and 5 ppm of VOCs induced oxidative stress and damage to lipids and DNA in all three organs. Our results demonstrate that the oxidative stress and damage observed in the lungs are caused mainly by ozone, while the liver and kidneys were affected primarily by VOCs toxicity; although extrapulmonary ozone effects were also detected. The rapid induction of phase II enzymes and antioxidants mediated by Nrf2 is a major defensive mechanism to counteract oxidative stress-induced damage by environmental pollutants. Hence, we explored the inducibility of the Nrf2 pathway by the co-exposure to these pollutants. Herein, we established that the exposure to the mixture of ozone and VOCs up-regulated two well-known Nrf2 effectors, heme oxygenase 1 (Hmox1) and UDP-glucuronosyltransferase 1 family polypeptide A1 (Ugt1a1). These results suggest the activation of the Nrf2 pathway by these air pollutants, nevertheless future studies will be required to fully determine Nrf2 activation and function in the protection against ozone and VOCs.

**Key Words:** inhalation, Nrf2, oxidative damage, air pollution

## 1. Introduction

The concentrations of recognized or suspected genotoxic and carcinogenic agents found in the air of many cities in developed and, in particular, developing countries have raised concerns about potential acute and/or chronic health effects experienced by exposed populations (IARC 2002). Mexico City Metropolitan Area (MCMA) has experienced declines in ambient concentrations of criteria pollutants over the last decade. However, these concentrations remain above the United States Environmental Protection Agency (USEPA) National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) with ozone and particulate matter (PM) frequently exceeding these standards (GDF 2003).

Several studies evaluated the presence of DNA damage potentially associated with exposure to outdoor air pollutants in MCMA. Increased DNA damage in nasal, blood, and tear cells have been observed in people living and/or working in the South of MCMA compared to those living in the North (Calderon-Garciduenas et al. 1996; Valverde et al. 1997; Rojas et al. 2000). Typically, the South of MCMA experiences elevated ozone concentrations, while the North presents higher airborne PM levels (GDF 2001). Recently, in a study using personal exposure measurements of air pollutants among MCMA outdoor workers, performed by our group, observed a positive correlation between DNA damage and exposure to ozone, PM (particle diameter 2.5  $\mu$ m), and several volatile organic compounds (VOCs) including benzene (ethyl and trimethyl), xylene, methyl tert-butyl ether (MTBE) and hexane (Tovalin et al. 2006).

Ozone is a powerful oxidant produced by photochemical reactions involving hydrocarbons and nitrogen oxides (Devlin et al. 1996). Ozone-induced toxicity is mediated partially by oxidative stress (Pryor 1994). Acute exposure to ozone causes reactive oxygen species (ROS), such as aldehydes, hydrogen peroxides, oxygen singlets, hydroxyl, and organic radicals and oxidative damage DNA, proteins and membranes lipids (Lee, Mok Kim, and Han 2003). Likewise, exposure to certain VOCs, particularly monocyclic aromatic hydrocarbons (e.g. benzene, toluene and xylenes), induced ROS formation followed their metabolic activation mainly in liver (Nedelcheva et al. 1999). Consequently, the promotion of

oxidative stress has been identified as one of the most important mechanisms responsible for ozone and VOCs cytotoxic effects.

Oxidative stress triggers redox sensitive pathways that lead to different biological processes, like inflammation, genotoxicity and cell death (Kooter 2004). However, to minimize oxidative stress-induced damage cells have developed efficient antioxidants defense systems, such as the rapid induction and activation of detoxifying enzymes and antioxidants (Kang, Lee, and Kim 2005). The promoter region of genes encoding phase II detoxifying enzymes and antioxidants contains a *cis-acting* element called the antioxidant response element (ARE) (Lee et al. 2005). Nrf2, a basic leucine zipper, member of the “cap’n’collar” family of transcriptional factors, is the principal regulator of the ARE-driven cellular defense. Under homeostatic conditions Nrf2 is in the cytoplasm of the cell, attached to an actin-binding cytosolic protein named Keap1 (Kelch-like ECH associated protein) (Lee et al. 2007). Exposure to electrophiles and ROS, uncouples the Nrf2-Keap1 complex, leading to Nrf2 nuclear translocation and dimerization with others transcription factors (e.g. members of the small maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen) family) (Motohashi et al. 2004). These heterodimers bind to the ARE element inducing the transcriptional activation of target genes, including phase II enzymes and antioxidants (Owuor and Kong 2002).

Considering that exposure to air pollutants occurs in mixtures (Harkema and Wagner 2005) the present study mimics an acute exposure (1 hr) to ozone and a mixture of VOCs. It evaluates changes in the antioxidant response and damage to biological molecules (lipid membranes, DNA and proteins) after the exposure to the mixture of ozone and VOCs compared to either ozone or VOCs alone exposures, not only in lung, the main target for inhaled pollutants but in the liver and kidneys of male CD-1 mice. Hence, the present study provides insights of the interactions between these two main air pollutants and its effects compared to single pollutant exposures. In addition, extrapulmonary effects of ozone as well as extrahepatic potential targets of VOCs induced toxicity, such as the kidneys are investigated. Moreover, Nrf2 pathway activation by these pollutants is also explored.



## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Ozone was produced in a corona discharge generator (Ozone Air purifier XT-120/240, Suffol, VA) and monitored regularly during the exposure using an ozonometer (Ozone sensor Model A-21ZX, Eco Sensor Inc., Santa Fe, NM). As VOCs supply the BTEX/MTBE mix by Supelco Inc. (Bellefonte, PA), containing 2000µg/ml of benzene, toluene, ethyl benzene, p-xylene and methyl tert-butyl ether, was used.

### 2.2. Animals

All animals were handled under the protocol for care and use of laboratory animals approved in our Institute. CD-1 male mice (From Instituto de Investigaciones Biomédicas *vivarium*, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México), 45 days old and weighing 30-35 g, were housed in hanging plastic cages under controlled lighting conditions (12 h light/12 h dark regime), relative humidity (50 ± 5%) and temperature (17 ± 2°C) and fed with Purina rat chow and water *ad libitum*. Animals were allotted randomly to four experimental groups; group 1, controls (deionized water-exposed); group 2, animals exposed to ozone; group 3, animals exposed to mixture of VOCs; and group 4, animals exposed to ozone and a mixture of VOCs. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and complied with the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources 1996).

### 2.3. Exposure

Inhalation experiments were performed in an acrylic box (50 X 30 X 50 cm) with a flux of 10 l/min. The exposure protocol was as previously described (Valverde et al. 2002). Briefly, the animals were placed in the acrylic box, and exposed to either ozone, a mixture of VOCs or to ozone and VOCs for 1 hr. As controls the animals inhaled ultrapure-deionized water for the same period of time. The work concentrations were as follows: 1 ± 0.12 ppm for ozone and for 5 ppm VOCs. These concentrations correspond to the emergency exposure limit (EEL) suggested by the Committee on Toxicology (Committee-of-Toxicology 2000) for an acute ozone exposure and the maximum dose allowed in an acute occupational exposure to VOCs (OSHA 2009) (Table 1). As mentioned above as VOCs supply the

BTEX/MTBE mixture (Suppelco Inc, Bellefonte, PA) was selected since it represents, to certain extent, air pollution conditions in MCMA (Tovalin et al. 2006). To guaranty that the pollutants were uniformly distributed in the acrylic box, filtered air was injected to maintain the pollutants circulating.

#### **2.4. Cell Suspensions and Tissue Homogenates**

After exposure the animals were sacrificed by cervical dislocation and the lungs, liver and kidneys were removed and placed in cold saline solution (0.9% NaCl) until cell suspensions and tissue homogenates were prepared. For the cell suspensions a lung, a kidney and a piece of liver (approximately 1/3 of the total volume) per animal, were minced into 1 mm<sup>3</sup> pieces. The cell suspensions were kept at 4°C until sediment was observed (~30 minutes) and immediately assayed for reactive oxygen species and DNA damage (Comet assay). For tissues homogenates a piece of lung, liver and kidney were perfused and homogenized (10,000 rpm for 15 seconds) in PBS buffer supplemented with protease inhibitors cocktail (Calbiochem, EMB Bioscience Inc., La Jolla CA). The tissues homogenates were centrifuge at 4°C (14,000 rpm) for 10 minutes, the supernatants were collected and frozen -80°C until further use. The other organs were rapidly frozen and stored in liquid nitrogen.

#### **2.5. Reactive oxygen species detection**

This technique is based on the oxidation of the dihidrorhodamine-123 to rhodamine-123 caused by intracellular reactive oxygen species. ROS production was measured as previously reported (Lee et al. 2003). The absorbance was measured in a microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) at 505 nm wavelength.

#### **2.6. Catalase activity determination**

Catalase activity was measured as previously described (Aebi 1984). The assay is based in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption by catalase in the sample. Briefly, tissue homogenates were centrifuged at 4°C, 10,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was collected and catalase activity was determined. To normalize the samples, protein concentration was measured using a bicinchoninic acid kit following manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL).

## 2.7. Total superoxide Dismutase activity determination

Total superoxide dismutase activity was measured as previously described (Sun, Oberley, and Li 1988). Formazan production was determined at 560 nm in a microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). The percent inhibition is calculated as below:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

One unit of SOD is defined as the amount of protein that inhibits the rate of NET reduction by 50%.

## 2.8. Lipoperoxidation

The thiobarbituric acid method was employed to analyze malondialdehyde (MDA) level as a marker of lipoperoxidation. Briefly, a 100  $\mu\text{L}$  aliquot of the tissue homogenates previously prepared was added to 100  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 3,000 x g for 10 minutes. The supernatant was added to 1 ml of thiobarbituric acid reagent (0.375%) and heated for 45 minutes at 92°C. The absorbance at 532 nm (thiobarbituric acid-MDA complex) was recorded in a spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

## 2.9. DNA damage assessed by Single Cell Gel Electrophoresis or comet assay (SCGE)

An appropriate number of cells was obtained in 30  $\mu\text{L}$  of cell suspension and mixed with 75  $\mu\text{L}$  of 0.5% LMP agarose. The cells and LMP agarose at 0.36% final concentration were loaded onto microscope slides pre-layered with 200  $\mu\text{L}$  of 0.5% normal melting point agarose. The SCGE assay was performed as described by Valverde *et al.*, (2000). Individual cells were visualized at 20X magnification under an Olympus BX-60 microscope (Olympus America Inc, Center Valley, PA) with fluorescence attachments (515–560 nm excitation filter, 590 nm barrier filter). To identify the tail, the head of the comet was defined as the most brilliant circular region in the image. The percentage of DNA in the tail of the comet was recorded using the software Comet 3 (Kinetic Instruments, UK), this parameter represents the percentage of migrated DNA (% tail DNA). To evaluate the percentage of tail DNA, 100 cells/tissue/animal were scored for each exposure.

## 2.10. Protein Oxidation

Protein oxidation in the tissues homogenates previously prepared was determined using a commercial kit (Chemicon International Inc, Temecula, CA) following the manufacturer's protocol. In this assay the oxidative modification of proteins, in particular the presence of carbonyls groups is detected by their derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The carbonyl-DNP adduct was separated by polyacrilamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. The results are presented as the sum of the intensity of the bands detected by the computer program EDAS 290 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). The control values were adjusted to 1 and exposure values were calculated as fold change compared to controls (deionized water-exposed animals).

## 2.11. RT-PCR

From a small piece of liver, lung and kidney total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen Corporation, Life Technologies Corporation, Carsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCR reactions were performed using the Access RT-PCR Systems (Promega Corporation, Madison, WI). *L32*, a constitutively expressed gene was included as an internal reference. RT-PCR primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems; ABI 2.0). The primer sequences used were as follows:

*Nrf2* 5'-TGGACGGGACTATTGAAGGCTGC-3' and 5'-GCCGCCTTTTTCAGTAGATGGAGG-3'; heme oxygenase 1 (*Hmox1*) 5'-ATGTAAAGCGTCTCCACGAGGT-3' and 5'-AAGGCGGTCTTAGCCTCTTCTG-3'; UDP-glucuronosyltransferase 1 family polypeptide A1 (*Ugt1a1*) 5'-TTGGTGGAAGTGGACGGACT-3' and 5'-GCTGTAGGAAGTTCATGCGGTC-3' and *L32* 5'-TTGAGGCCAATGGCAACCCT-3' and 5'-ACAAAGTTCTGAGCGATGGCC-3'

## 2.12. Western blot

The western blot analysis was performed according to standards protocols.  $\beta$ -actin was used as loading control. The *Nrf2*, *Ugt1a1*, *Hmox1* and  $\beta$ -actin antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). The bands were visualized using

chemiluminescence method according to the manufacturer's guidelines (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). To determine the band intensity the films were analyzed using the computer program EDAS 290 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

**Table I.** Experimental conditions

<b>Experimental condition</b>	<b>Concentrations</b>
Control	Deionized water
Ozone	1 ± 0.12 ppm
VOCs	5 ppm
Ozone + VOCs	1 ± 0.12 ppm of Ozone and 5 ppm of VOCs

\* The animals were exposed for 1 hr and immediately sacrificed by cervical dislocation.

### **3. Results and Discussion**

#### **3.1. Oxidative stress and damage induced by exposure to ozone, VOCs or the mixture of ozone and VOCs.**

To evaluate the generation of oxidative stress caused by the exposures in liver, lungs and kidneys, ROS production and the activity of two of the main antioxidants enzymes, total superoxide dismutase (SOD) and catalase, were assayed. Oxidative stress and damage was observed in liver, lungs and kidneys of mice exposed to an acute inhalation of the mixture of ozone and VOCs (Table 2). To elucidate the mechanism by which these pollutants induced oxidative stress and damage, exposures to either ozone or VOCs alone were also performed. The results indicate that the pulmonary effects observed in the animals exposed to the mixture of ozone and VOCs are caused mainly by ozone. Increased ROS production and decreased activity of total SOD were observed in the lungs of animals exposed to either ozone or the mixture of ozone and VOCs (Table 2). The data confirms previous reports of ROS induction (Pryor 1994; Pryor and Church 1991) and inactivation of SOD (Lee, Mok Kim, and Han 2003; Rivas-Arancibia et al. 1998) after ozone exposure. Enzyme fragmentation (Lee, Mok Kim, and Han 2003) and reduced SOD levels have been reported (Rivas-Arancibia et al. 1998), suggesting the formation of superoxide after ozone exposure. Ozone will react instantaneously with surfactant's polyunsaturated fatty acids in the air-

epithelial lining fluid in the airways generating toxic molecules such as ROS, hydroperoxides and alkenales (Pryor and Church 1991) which oxidize lipids forming lipid oxidation products, like malondialdehyde (MDA) (Postlethwait et al. 1998). Comparable lipoperoxidation values were observed in the lungs of animals exposed to either ozone or ozone and VOCs (Fig. 1b), suggesting that the lipid damage observed after the exposure to the mixture of pollutants is consequence of ozone rather than VOCs toxicity. Although, ROS production and changes in the activities of antioxidants enzymes were also detected in the lungs of VOCs exposed animals, no damage to lipids was observed (Fig.1b). These results may suggest that even though the exposure to VOCs induced oxidative stress in lungs, its intrinsic defense mechanisms were able to counteract or overcome the stress. Based in the previous results and considering that population in urban areas is exposed to mixtures of pollutants we decided to further evaluate damage to DNA and proteins in animals exposed to the mixture of ozone and VOCs. DNA damage and protein oxidation were observed in lungs of mice exposed to the mixture of pollutants. Considering our results and several previous reports (Mudway and Kelly 1998; Rojas et al. 2000; Valverde et al. 1997), we can conclude that the oxidative damage to DNA and proteins observed is consequence mainly of ozone toxicity rather than an effect of VOCs metabolism in the lungs.

**Table II.** ROS production and oxidative stress related enzymes activities of liver, lungs and kidneys of mice exposed to ozone, VOCs and a mixture of ozone and VOCs.

Organ	ROS ( $\mu\text{g}$ rhodamine/ g protein)	SOD (U/mg protein)	Catalase (mK15 s/mg protein)
<b>Liver</b>			
Control	0.64 $\pm$ 0.25	6.91 $\pm$ 0.16	2.31 $\pm$ 0.03
Ozone	0.78 $\pm$ 0.31	3.44 $\pm$ 0.12*	3.38 $\pm$ 0.11*
VOCs	0.61 $\pm$ .33	6.7 $\pm$ .09	4.6 $\pm$ 0.004**
Ozone + VOCs	0.81 $\pm$ 0.46	4.62 $\pm$ 0.15*	8.2 $\pm$ 0.05**
<b>Lung</b>			
Control	0.14 $\pm$ 0.02	23.85 $\pm$ 1.35	3.35 $\pm$ 0.007
Ozone	0.39 $\pm$ 0.125	9.11 $\pm$ 1.25*	5.82 $\pm$ 0.01
VOCs	0.24 $\pm$ 0.03*	14.45 $\pm$ 0.78*	2.27 $\pm$ 0.03
Ozone + VOCs	0.41 $\pm$ 0.18*	10.84 $\pm$ 1.62**	3.5 $\pm$ .004
<b>Kidney</b>			
Control	0.45 $\pm$ 0.19	6.5 $\pm$ 0.21	2.53 $\pm$ 0.012
Ozone	0.17 $\pm$ 0.078	7.13 $\pm$ 0.33	1.89 $\pm$ 0.06**
VOCs	0.60 $\pm$ .331	6.3 $\pm$ 0.11	3.23 $\pm$ 0.01**
Ozone + VOCs	0.26 $\pm$ 0.09	4.89 $\pm$ 0.13*	0.523 $\pm$ 0.76**

Note: ANOVA test \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  (mean  $\pm$  SE; n=3). Concentrations used were as follows: Ozone: 1  $\pm$  0.12 ppm, VOCs: 5 ppm of a mixture of VOCs and Ozone + VOCs: 1  $\pm$  0.12 ppm of ozone + 5 ppm of a mixture of VOCs.

In liver and kidneys, the exposure to the mixture of ozone and VOCs induced oxidative stress, reflected by changes in the activities of antioxidant enzymes SOD and catalase (Table 2) and lipoperoxidation (Fig. 1a and c). Since metabolic activation of VOCs occurs primarily in the liver (Nedelcheva et al. 1999) changes in catalase activity may reflect the formation of hydrogen peroxide as a sub-product of the metabolism of organic solvents, such as benzene (Shen et al. 1996). Similar results were observed for SOD activity, the exposure to the mixture of ozone and VOCs decreased the activity of SOD in both the liver and kidneys of exposed animals. When compared to either ozone or VOCs alone exposures, the decrease in total SOD activity was only detected in the livers of ozone-exposed animals (Table 2). These changes in the activities of antioxidant enzymes could indicate that ozone has an effect in these extrapulmonary tissues. Due to the reactivity of ozone, it will not penetrate far into other internal organs (Pryor, Squadrito, and Friedman 1995) so ozone toxicity is due mainly by a secondary metabolites generated by the reactions of ozone with the earliest molecules it encounters (Pryor, Squadrito, and

Friedman 1995). Also, it has been reported oxidative effects of ozone exposure in liver (Aibo et al. 2010; Csallany, Manwaring, and Menken 1985). Changes in GSH/GSSG ratio and increase in antioxidants enzymes were observed in livers of exposed mice to ozone (Aibo et al. 2010). It has been suggested that ozone toxicity in extrapulmonary tissues is the result of long-lived signaling molecules produced by inflammatory epithelial cells in the lung in response to oxidative injury (Last et al. 2005) and by-products of lipid oxidation (e.g. MDA) (Goldstein 1978). Here in, it is possible that the changes in SOD and catalase activities reflect ozone toxicity in liver, with similar effects observed in the lungs of ozone-exposed animals. Ozone exposure induced changes in the activities of antioxidants enzymes in liver and kidneys, although damage to lipid membranes was not detected after the exposure (Fig. 1a and c). The lack of lipid damage may suggest that oxidative stress generated by ozone exposure was counteracted by the defense mechanisms of these organs. Although, considering that the exposure was acute (1 hr) it cannot be excluded that long-lived ozone by-products wouldn't induce damage afterward. These results suggest that oxidative stress and lipoperoxidation observed in liver and kidneys exposed to the mixture of ozone and VOCs are mainly attributed to VOCs toxicity; though ozone generated oxidative stress in these extrapulmonary organs it did not induced oxidative damage. Noteworthy, when compared the VOCs-exposed and the co-exposed with ozone animals, there seems to be a synergetic effect between these pollutants (Table 2 and Fig. 1) reflected by enhanced lipid damage and oxidative stress. In a similar way, DNA damage observed in liver and kidneys of ozone and VOCs-exposed mice (Fig. 2a) are more likely consequence of VOCs-induced toxicity. VOCs metabolic activation, produce reactive metabolites and ROS (Shen et al. 1996) which induce DNA damage and lipid oxidation, not only in liver main organ for VOCs metabolisms (Nedelcheva et al. 1999) but also in kidneys were extrahepatic metabolism of VOCs occurs causing renal toxicity (Bowen, Hannigan, and Irtenkauf 2007; Yoon, Madden, and Barton 2007).



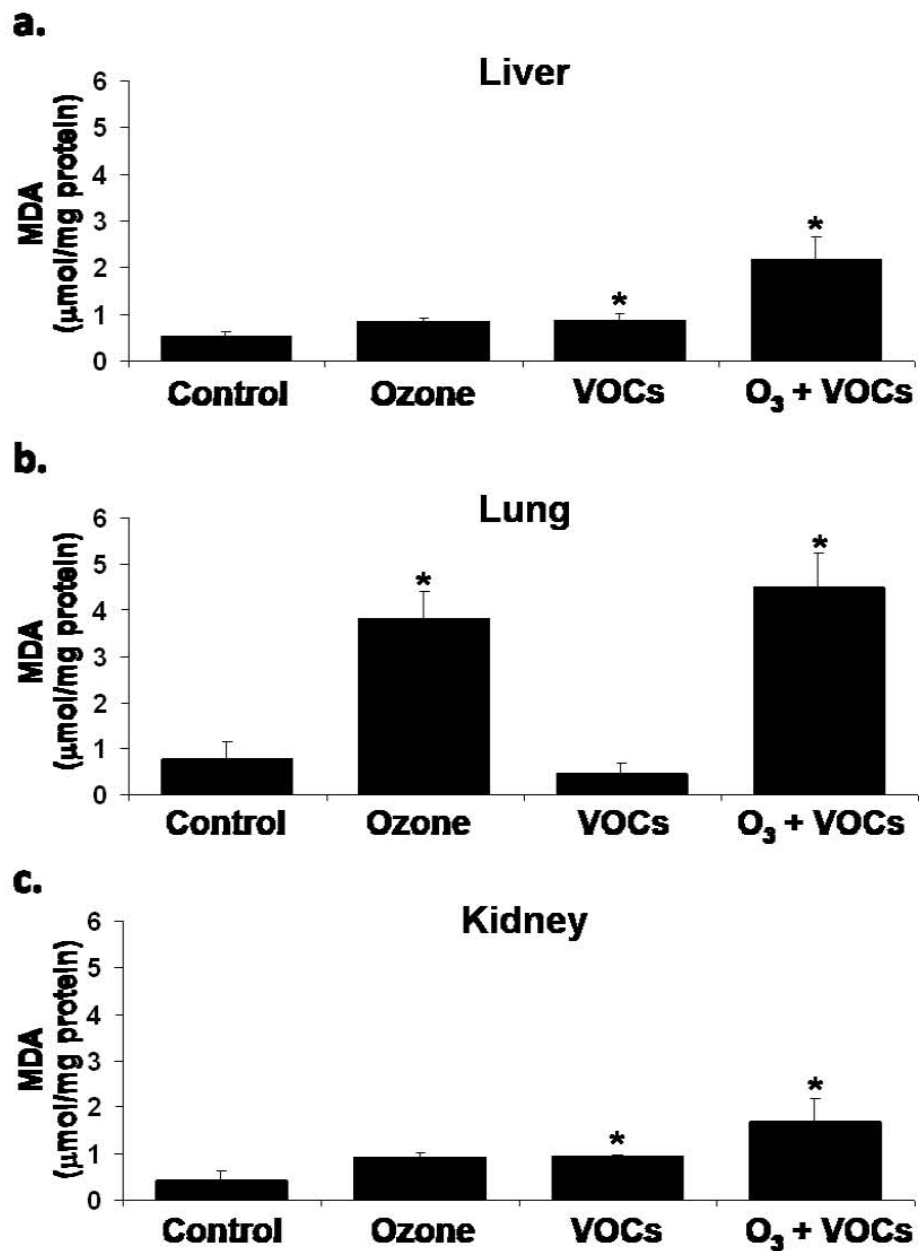
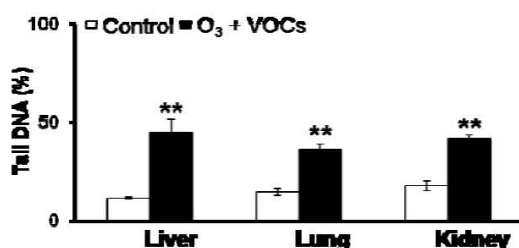


Fig. 1 Oxidative damage induced to lipids in liver (a), lungs (b) and kidneys (c) after an acute exposure to either  $1 \pm 0.12$  ppm of ozone (ozone), 5 ppm of a mixture of VOCs (VOCs) or  $1 \pm 0.12$  ppm of ozone and 5 ppm of a mixture of VOCs (O<sub>3</sub> + VOCs). Malondialdehyde (MDA) levels were used as an index of lipoperoxidation. Student's T test \* $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD; n=3).

### a. DNA Damage



### b. Protein Oxidation

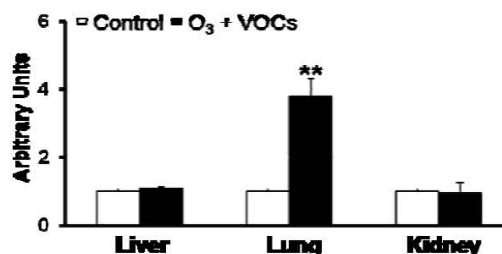
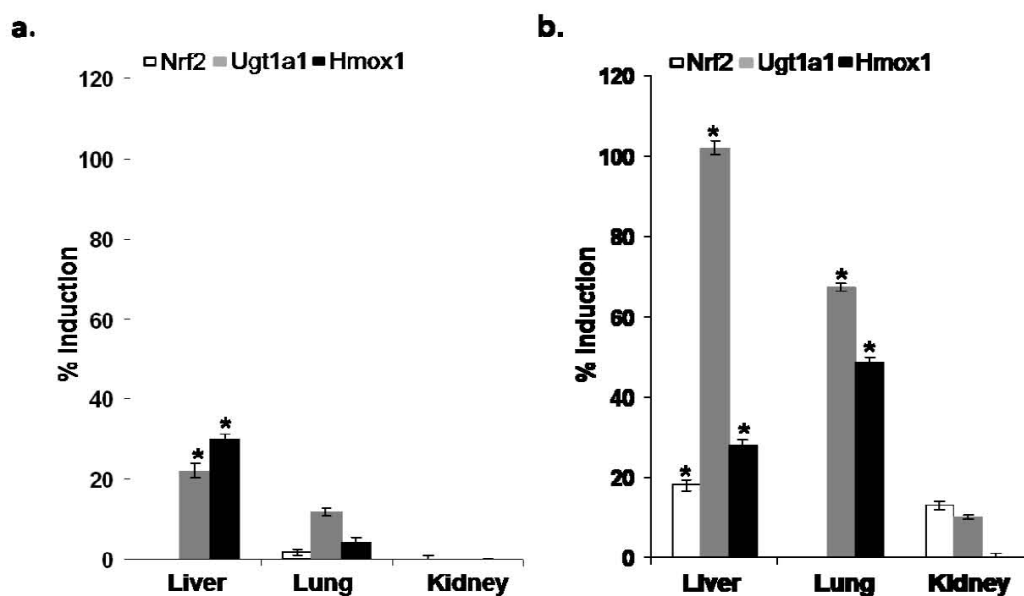


Fig. 2 Damage induced to DNA (a) and proteins (b) after an acute exposure to  $1 \pm 0.12$  ppm of ozone and 5 ppm of VOCs. a. DNA damage determined as Tail DNA by single cell gel electrophoresis (SCGE) or Comet assay. b. Detection of carbonyls groups formation as marker of protein oxidative damage. Student's T test \*\*\* $p < 0.001$  (mean  $\pm$  SD;  $n=3$ ).

### 3.2. Up-regulation of Nrf2 effectors, Hmox and Ugt1a1, induced by ozone and VOCs exposure.

Our results showed that an acute exposure to the mixture of ozone and VOCs produces oxidative stress as reflected by ROS production, changes in the activity of antioxidants enzymes and oxidative damage to DNA, lipids and proteins. The activation of the Nrf2 pathway is an adaptive mechanism of protection against several environmental xenobiotics (Rubio, Valverde, and Rojas 2010). Nrf2 activation leads to the transcriptional induction of phase II enzymes and antioxidants (Owuor and Kong 2002) which counteract ROS and metabolites of phase I enzymes (e.g. cytochromes P450)(Higgins et al. 2009). As marker of the activation this pathway, the induction of two Nrf2 effectors, Hmox1 and Ugt1a1, was evaluated after exposure to ozone and VOCs. Our results showed a vast increase of Hmox and Ugt1a1 (Fig. 3b) in livers and lungs of exposed animals. The observed induction could indicate the activation of the Nrf2 pathway, although considering that only minor changes in the mRNA level of these enzymes were only detected in the liver of exposed animals (Fig.3a) and the short exposure time (1 hr), it can't be excluded that non-transcriptional regulation (e.g. post-translational or degradation mechanisms) may contribute to the induction of these enzymes. In recent years several reports established Hmox1 induction after ozone

exposure (Foucaud et al. 2006; Valacchi et al. 2004) and activation of Ugt1a family members by benzene (Schrenk et al. 1996), providing a mechanism of detoxification against these pollutants. Our results suggest that an acute exposure to 1 ppm of ozone and 5 ppm of VOCs produced oxidative stress which could lead to the activation of Nrf2 and the subsequent induction of Hmox and Ugt1a1.



**Fig. 3** Changes in gene and protein expression of liver, lung and kidney of mice exposed to a mixture of  $1 \pm 0.12$  ppm of ozone and 5 ppm of VOCs for 1 hr. Changes in gene and protein expression were evaluated by RT-PCR (a) and Western blot (b), respectively. The results were normalized with *L32* and  $\beta$ -actin for gene and protein expression, respectively. The percentage of induction was evaluated using the band intensity measured by densitometry after computer analysis. The percentage of induction represents the ratio between ozone and VOC's-exposed animals and deionized water-exposed controls. Student's T test \* $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD;  $n=3$ ). Ugt1a1, UDP-glucuronosyltransferase 1 family polypeptide A1; Hmox1, heme oxygenase.

Finally, human populations are exposed to complex mixtures of air pollutants; nevertheless current knowledge of toxicity of air xenobiotics is based primarily in single-pollutant exposure studies. The present study, and similar ones, provides understanding of toxicity mechanisms underlying exposure to complex mixtures of xenobiotics as well as possible interactions between different pollutants and toxic

effects induced in different organs. It also provides insights into the cellular molecular mechanisms involved in the protection against the exposure to these common air pollutants.

#### **4. Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### **5. Acknowledgments**

The authors thank Irak Leon O'Farrill for help in the manuscript preparation as well as all members in the Rojas-Valverde group for their technical assistance. This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) project U44260-M and the project 212007 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México). VR is a recipient of a fellowship from CONACYT.

#### **6. References**

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-6.
- Aibo, D. I., N. P. Birmingham, R. Lewandowski, J. F. Maddox, R. A. Roth, P. E. Ganey, J. G. Wagner, and J. R. Harkema. 2010. Acute Exposure to Ozone Exacerbates Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice. *Toxicol Sci.*
- Bowen, S. E., J. H. Hannigan, and S. Irtenkauf. 2007. Maternal and fetal blood and organ toluene levels in rats following acute and repeated binge inhalation exposure. *Reprod Toxicol* 24, 343-52.
- Calderon-Garciduenas, L., N. Osnaya-Brizuela, L. Ramirez-Martinez, and A. Villarreal-Calderon. 1996. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution. *Environ Health Perspect* 104, 160-8.
- Committee-of-Toxicology. 2000. "Ozone" Emergency and continuous exposure limits for selected airborne contaminants. Board on Toxicology and Environmental Health Hazards Commission on Life Sciences National Research Council. Vol. 1. Washington D.C.: National Academy Press.
- Csallany, A. S., J. D. Manwaring, and B. Z. Menken. 1985. Ozone-related fluorescent compounds in mouse liver and lung. *Environ Res* 37, 320-6.

- Devlin, R. B., W. F. McDonnell, S. Becker, M. C. Madden, M. P. McGee, R. Perez, G. Hatch, D. E. House, and H. S. Koren. 1996. Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 138, 176-85.
- Foucaud, L., A. Bennasroune, D. Klestadt, P. Laval-Gilly, and J. Falla. 2006. Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells. *Toxicol In Vitro* 20, 101-8.
- GDF. 2001. Informe del estado de la calidad del aire. Tendencias 2001 para la Zona Metropolitana del Valle de Mexico. Mexico City: Secretaria del Medio Ambiente, Gobierno del Distrito Federal.
- . 2003. Indice Metropolitano de la Calidad del Aire. Mexico City: Secretaria del Medio Ambiente: Gobierno del Distrito Federal.
- Goldstein, B. D., 1978. The pulmonary and extrapulmonary effects of ozone. *Ciba Found Symp* 295-319.
- Harkema, J. R., and J. G. Wagner. 2005. Epithelial and inflammatory responses in the airways of laboratory rats coexposed to ozone and biogenic substances: enhancement of toxicant-induced airway injury. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1, 129-41.
- Higgins, L. G., M. O. Kelleher, I. M. Eggleston, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes. 2009. Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts in vitro against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- IARC. 2002. Complete lists of agents, mixture, and exposures evaluated and their classification (Monographs 1-100A). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Kang, K. W., S. J. Lee, and S. G. Kim. 2005. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7, 1664-73.
- Kooter, I.M. 2004. Inventory of biomarker of oxidative stress. In RIVM Report
- Last, J. A., K. Gohil, V. C. Mathrani, and N. J. Kenyon. 2005. Systemic responses to inhaled ozone in mice: cachexia and down-regulation of liver xenobiotic metabolizing genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 208, 117-26.
- Lee, J. M., J. Li, D. A. Johnson, T. D. Stein, A. D. Kraft, M. J. Calkins, R. J. Jakel, and J. A. Johnson. 2005. Nrf2, a multi-organ protector? *Faseb J* 19, 1061-6.
- Lee, O. H., A. K. Jain, V. Papusha, and A. K. Jaiswal. 2007. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 282, 36412-20.
- Lee, V. M., P. A. Quinn, S. C. Jennings, and L. L. Ng. 2003. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* 41, 925-31.
- Lee, Y. K., S. Mok Kim, and S. Han. 2003. Ozone-induced inactivation of antioxidant enzymes. *Biochimie* 85, 947-52.

- Motohashi, H., F. Katsuoka, J. D. Engel, and M. Yamamoto. 2004. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6379-84.
- Mudway, I. S., and F. J. Kelly. 1998. Modeling the interactions of ozone with pulmonary epithelial lining fluid antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 148, 91-100.
- Nedelcheva, V., I. Gut, P. Soucek, B. Tichavska, L. Tynkova, J. Mraz, F. P. Guengerich, and M. Ingelman-Sundberg. 1999. Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch Toxicol* 73, 33-40.
- OSHA. Part number 1910. Benzene regulation (standards-29 CFR) Occupational Safety and Health Administration, June 2009 2009 [cited Part number 1910]. Available from [www.osha.gov](http://www.osha.gov).
- Owuor, E. D., and A. N. Kong. 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 64, 765-70.
- Postlethwait, E. M., R. Cueto, L. W. Velsor, and W. A. Pryor. 1998. O<sub>3</sub>-induced formation of bioactive lipids: estimated surface concentrations and lining layer effects. *Am J Physiol* 274, L1006-16.
- Pryor, W. A., 1994. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med* 17, 451-65.
- Pryor, W. A., and D. F. Church. 1991. Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med* 11, 41-6.
- Pryor, W. A., G. L. Squadrito, and M. Friedman. 1995. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 19, 935-41.
- Rivas-Arancibia, S., R. Vazquez-Sandoval, D. Gonzalez-Kladiano, S. Schneider-Rivas, and A. Lechuga-Guerrero. 1998. Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ Res* 76, 33-9.
- Rojas, E., M. Valverde, M. C. Lopez, I. Naufal, I. Sanchez, P. Bizarro, I. Lopez, T. I. Fortoul, and P. Ostrosky-Wegman. 2000. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 468, 11-7.
- Rubio, V., M. Valverde, and E. Rojas. 2010. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ Sci Pollut Res Int* 17, 369-82.
- Schrenk, D., A. Orzechowski, L. R. Schwarz, R. Snyder, B. Burchell, M. Ingelman-Sundberg, and K. W. Bock. 1996. Phase II metabolism of benzene. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 6, 1183-8.
- Shen, Y., H. M. Shen, C. Y. Shi, and C. N. Ong. 1996. Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells. *Hum Exp Toxicol* 15, 422-7.

- Sun, Y., L. W. Oberley, and Y. Li. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34, 497-500.
- Tovalin, H., M. Valverde, M. T. Morandi, S. Blanco, L. Whitehead, and E. Rojas. 2006. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. *Occup Environ Med* 63, 230-6.
- Valacchi, G., E. Pagnin, A. M. Corbacho, E. Olano, P. A. Davis, L. Packer, and C. E. Cross. 2004. In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radic Biol Med* 36, 673-81.
- Valverde, M., M. del Carmen Lopez, I. Lopez, I. Sanchez, T. I. Fortoul, P. Ostrosky-Wegman, and E. Rojas. 1997. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen* 30, 147-52.
- Valverde, M., T. I. Fortoul, F. Diaz-Barriga, J. Mejia, and E. R. del Castillo. 2002. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis* 17, 55-61.
- Yoon, M., M. C. Madden, and H. A. Barton. 2007. Extrahepatic metabolism by CYP2E1 in PBPK modeling of lipophilic volatile organic chemicals: impacts on metabolic parameter estimation and prediction of dose metrics. *J Toxicol Environ Health A* 70, 1527-41.