



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Geología

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DEL ADUCTO
8-OHdG Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN
LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS
EXPUESTOS *IN VITRO* A HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS CON Y SIN
ACTIVACIÓN METABÓLICA ANIMAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ ROMERO

TUTORA PRINCIPAL: Dra. María Elena Calderón Segura

**COMITÉ TUTOR: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Dr. Luis Felipe Jiménez García**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de octubre del presente, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ ROMERO** con número de cuenta **83377879** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DEL ADUCTO 8-OHdG Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS EXPUESTOS *IN VITRO* A HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS CON Y SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA ANIMAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA**:

Presidente: DR. RAFAEL DE JESÚS VILLALOBOS Y PIETRINI
Vocal: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Secretario: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAÍZ
Suplente: DR. ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de noviembre de 2011.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al CONACYT por la beca recibida durante la realización de esta tesis

Apoyos Complementarios a Investigadores en Fase de Consolidación SNI nivel I

Proyecto de Investigación PAPIIT DGAPA-UNAM IN213908

Al Comité Tutor

Dra. María Elena Calderón Segura

Dra Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Agradecimientos

Mi más grande agradecimiento a Jehová Dios por permitirme terminar satisfactoriamente este proyecto.

Agradezco especialmente a mi directora de tesis, Dra. María Elena Calderón Segura, por apoyarme y guiarme en esta carrera hasta llegar a la meta, por lo que he aprendido de tu ejemplo de dedicación y constancia, por todos los consejos que siempre han sido para mejorar, por la ayuda incondicional, porque siempre has estado cuando he necesitado tanto profesional como personalmente, por contar con tu amistad. Muchas Gracias

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo, gracias por las enseñanzas que todos los días aprendo de usted, por el apoyo que me ha brindado desde el día que llegué al laboratorio hace ya algunos años, por las excelentes sugerencias para llevar a término este proyecto, por su disposición para escucharme siempre y por su amistad que es de gran valor para mí.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, estoy muy agradecida con usted por estar pendiente del desarrollo de esta tesis, gracias por sus valiosas aportaciones y porque sé que siempre podré contar con su ayuda, tengo gran orgullo de que haya sido parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini, gracias por estar siempre interesado en el seguimiento del presente trabajo y por los excelentes comentarios hechos al mismo durante todo este tiempo, es seguro que ayudaron notablemente a concluirlo satisfactoriamente.

A la Dra. Rosario Rodríguez Arnaíz, agradezco su fina atención y los valiosos comentarios que sin duda mejoraron la tesis.

Al Dr. Emilio Pimentel Peñaloza, agradezco enormemente las aportaciones hechas a esta tesis realmente fueron excelentes.

Al Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, por las facilidades para la realización de este proyecto, ahora hecho realidad.

También a todos los integrantes del Laboratorio, las Doctoras Sandra Gómez Arroyo, María Elena Calderón, Josefina Cortés, Mary Carmen Calderón, a la M en C Ana Rosa Flores, a todos los estudiantes que he visto pasar y que de alguna forma me han dejado enseñanzas, a Vicky y a Elena: “Es un gran equipo” gracias por su ayuda e interés en mi trabajo hasta verlo terminado.

Al Dr. José Luis Gallegos Pérez del Laboratorio de Espectrometría de Masas, Unidad de Proteómica Médica del Instituto Mexicano de Medicina Genómica (INMEGEN), por el gran apoyo en una parte importante de la fase experimental, su ayuda fue indispensable para llegar al término.

Al Dr. Francisco Martínez del Laboratorio de Biomedicina y Bioterapéutica del Instituto Nacional de Rehabilitación, por la ayuda técnica para el tratamiento de algunas proteínas en la fase experimental.

A Mary Carmen Martínez, gracias por estar siempre que he necesitado y por contar con tu amistad.

A Yolanda Carbajal, eres una gran compañera, gracias por todos los momentos que compartimos durante este tiempo y que seguramente seguiremos compartiendo.

A todos los Profesores y compañeros que han contribuido en mi desarrollo académico y personal.

Agradezco especialmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas y por la formación profesional que es invaluable, estoy realmente orgullosa de mi universidad.

Dedicatoria

Dedico esta tesis especialmente y con mucho cariño a mi papá Francisco Rodríguez, por enseñarme valores importantes como ser trabajadora, responsable y agradecida, gracias a tu ejemplo soy esta persona y gracias a tu esfuerzo he llegado hasta donde ahora estoy, todos los días estás en mi mente y en mi corazón.

Te extraño tanto ...

A mi mamá Ana Romero, por la educación que me dieron, por el ejemplo de fortaleza a pesar de todo, el mismo que me transmites y me hace ser también fuerte al enfrentar cualquier adversidad, gracias porque siempre estás conmigo apoyándome.

Te quiero mucho

A mis hermanos, Roberto siempre presente en mi corazón, Miguel Ángel, Felipe y Pedro que son parte importante en mi vida y siempre me demuestran su amor e interés en todo lo que hago, porque en los momentos difíciles hemos estado juntos.

Yo también los quiero

A mis abuelitos Manuel y María, todas las enseñanzas que me dejaron las aplico en la vida cotidiana, tengo bellos recuerdos de ustedes.

Doy gracias porque pude disfrutarlos por mucho tiempo

A la familia Hernández Rodríguez, agradezco profundamente el cariño que me demuestran a cada momento.

Gracias por todo su apoyo

A Manuel, gracias por recorrer junto conmigo este camino, por tenerme paciencia y ayudarme en todo lo que está en tus manos para llegar a esta otra meta.

Sé que siempre puedo contar contigo

A Jaasiel, especialmente a ti, porque eres la razón de mi vida, porque cuando me siento muy mal solo basta con tenerte presente para que todo cambie, gracias por entender mi trabajo, por apoyarme y ayudarme, los tres hacemos un excelente equipo. Esfuérate siempre por mejorar en todos los aspectos.

Te amo con todo mi corazón

Índice

| | Página |
|---|---------------|
| RESUMEN _____ | 1 |
| ABSTRACT _____ | 2 |
| 1. INTRODUCCION _____ | 3 |
| 2. ANTECEDENTES _____ | 5 |
| 2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) _____ | 5 |
| 2.2 Fuentes de emisión de HAPs _____ | 5 |
| 2.3 HAPs en el aire urbano de la Ciudad de México _____ | 7 |
| 2.4 Benzo(a)pireno _____ | 8 |
| 2.5 DB(a,h)antraceno _____ | 9 |
| 2.6 Benzo(b)fluoranteno _____ | 10 |
| 2.7 Benzo(ghi)perileno _____ | 10 |
| 2.8 Biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad _____ | 11 |
| 2.9 Genotoxicidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de HAPs _____ | 14 |
| 2.10 Evaluación del riesgo carcinogénico de los HAPs _____ | 18 |
| 2.11 Metabolismo de HAPs _____ | 20 |
| 2.12 Aductos de ADN como biomarcadores de exposición _____ | 23 |
| 2.13 Estrés oxidante _____ | 25 |
| 2.14 Aducto 8-OHdG _____ | 26 |
| 2.15 Aducto 8-OHdG como biomarcador de estres oxidante _____ | 29 |
| 2.16 Ensayo cometa _____ | 31 |
| 2.17 Ensayo cometa como biomarcador de daño genotóxico _____ | 34 |
| 3. JUSTIFICACIÓN _____ | 36 |
| 4. OBJETIVOS _____ | 37 |

| | |
|---|----|
| 5. HPOTESIS | 38 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| 6.1 Aislamiento de linfocitos | 39 |
| 6.2 Viabilidad celular | 39 |
| 6.3 Tratamientos de linfocitos periféricos humanos con HAPs <i>in vitro</i> sin activación metabólica animal | 40 |
| 6.4. Tratamientos de linfocitos periféricos humanos con HAPs <i>in vitro</i> con activación metabólica animal | 40 |
| 6.5 Ensayo cometa alcalino | 41 |
| 6.6 Extracción de ADN | 43 |
| 6.7 Diálisis de enzimas | 44 |
| 6.8 Digestión del ADN | 44 |
| 6.9 Detección de los niveles del aducto 8-OHdG por inmunoensayo de ELISA | 45 |
| 6.10 Análisis estadístico | 45 |
| 7. RESULTADOS | 47 |
| 7.1 Genotoxicidad de HAPs en linfocitos periféricos humanos <i>in vitro</i> sin activación metabólica animal (HAPs-S9) | 47 |
| 7.2 Genotoxicidad de HAPs en linfocitos periféricos humanos <i>in vitro</i> con activación metabólica animal (HAPs+S9) | 48 |
| 7.3 Niveles de 8-OHdG en linfocitos periféricos humanos <i>in vitro</i> a HAPs sin activación metabólica animal (HAPs-S9) | 49 |
| 7.4 Niveles de 8-OHdG en linfocitos periféricos humanos <i>in vitro</i> a HAPs con activación metabólica animal (HAPs+S9) | 49 |

| | |
|---|----|
| 7.5 Citotoxicidad de HAPs sin y con activación metabólica animal <i>in vitro</i> _____ | 50 |
| 8. DISCUSIÓN _____ | 51 |
| 9. CONCLUSIONES _____ | 58 |
| 10. TABLAS Y FIGURAS _____ | 60 |
| 11. REFERENCIAS _____ | 68 |
| 12. ANEXO _____ | 92 |
| 12.1 Artículo publicado _____ | 92 |
| Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed <i>in vitro</i> to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation | |

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) dibenzo(*a,h*)antraceno, benzo(*ghi*)perileno, benzo(*b*)fluoranteno y el benzo(*a*)pireno se han identificado en el aire urbano de la Ciudad de México y se clasifican como carcinógenos humanos. En el presente estudio, se coincubaron linfocitos periféricos humanos *in vitro* a diferentes concentraciones de los cuatro HAPs con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica animal. Los efectos genotóxico y citotóxico de cada HAP se evaluaron con el ensayo cometa alcalino y tinción de exclusión con azul tripano respectivamente, mientras que el daño oxidante al ADN se determinó con la detección de los niveles del aducto 8-OHdG por el método de ELISA. El daño al ADN se analizó mediante dos parámetros genotóxicos: la frecuencia de cometas y la longitud de la cauda. Las concentraciones de 20, 40, 80, 160 y 320 μM de DB(*a, h*)A -S9; 20, 40, 80, 160 y 240 μM de B(*ghi*)P-S9; 20, 30, 40, 60 y 80 μM de B(*b*)F-S9 y 80 μM de B(*a*)P-S9 por 24 h indujeron poco aumento pero significativo en el promedio de la frecuencia de cometas, en la longitud de la cauda y en el nivel de 8-OHdG en relación con el testigo (0.5 % DMSO-S9). Sin embargo, cuando los HAPs se coincubaron con la mezcla enzimática (HAPs+S9) produjeron mayor incremento siendo significativo en ambos parámetros genotóxicos comparado con el testigo (0.5 % DMSO+S9). Los HAPs-S9 y HAPs+S9 mostraron una relación de concentración-efecto. La viabilidad de los linfocitos expuestos a todos los HAPs-S9 y HAPs+S9 no se modificó en comparación con los testigos. Los resultados de este estudio demuestran que los ensayos cometa y ELISA son rápidos, adecuados y sensibles para detectar daño en el ADN *in vitro* inducido por HAPs en linfocitos periféricos humanos.

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dibenzo(*a,h*)anthracene, benzo(*ghi*)perylene, benzo(*b*)fluoranthene and benzo(*a*)pyrene have been identified in urban air from Mexico City, and some are classified as human carcinogens. In the present study, human peripheral blood lymphocytes were exposed *in vitro* to different concentrations of PAHs with (+S9) or without (-S9) metabolic activation. The genotoxic and cytotoxic effects of each PAH were examined with an alkaline comet assay and trypan blue dye exclusion, and oxidative DNA damage was determined via the detection of 8-OHdG adduct levels by ELISA. The DNA damage was evaluated with two genotoxicity parameters: the frequency of comets and the comet tail length. Concentrations of 20, 40, 80, 160 and 320 μM DB(*a,h*)A-S9; 20, 40, 80, 160 and 240 μM B(*ghi*)P-S9; 20, 30, 40, 60 and 80 μM B(*b*)F-S9; and 80 μM B(*a*)P-S9 for 24 hours induced a small but significant increase in the means of comet frequency, in the tail length and in the 8-OHdG levels in relation to the control (0.5 % DMSO-S9). However, all PAHs+S9 produced a more significant increase in DNA strand breaks and the level of 8-OHdG compared to the control (0.5 % DMSO+S9), with a concentration-effect relationship. The viability of lymphocytes exposed to all PAHs-S9 and PAHs+S9 was not modified compared with the control. The results of this study demonstrate that the comet and ELISA are rapid, suitable and sensitive methods to detect *in vitro* PAHs-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes.

1. Introducción

Muchos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son agentes ambientales con capacidad para inducir cáncer humano. En 1775, el médico cirujano británico Sir Percival Pott demostró una relación entre los limpiadores de las chimeneas expuestos prolongadamente al hollín y la incidencia de cáncer de escroto (Baird et al., 2005).

Desde 1876, se ha reportado cáncer de piel en trabajadores de las destilerías de alquitrán (Kriek et al., 1998), pero las investigaciones en carcinogénesis inducida por HAPs iniciaron en los años 30 cuando Kennaway (1930) identificó y aisló al benzo(a)pireno (BaP) como el principal constituyente carcinógeno del alquitrán de carbón, desde entonces este HAP ha sido uno de los más extensamente estudiados en mamíferos y en poblaciones humanas (Park et al., 2006).

Brookes y Lawley (1964), encontraron asociación de las interacciones de los HAPs con el ADN y su potencial carcinogénico y tumorogénico cuando se aplican repetidamente en piel de ratón, pero la evidencia de que la activación metabólica está involucrada en la formación de intermediarios metabólicos que interactúan con el ADN, fue demostrada hasta 1968 por Grover y Sims quienes aislaron los aductos ADN-HAP, lo cual les permitió proponer la hipótesis de que los HAPs son convertidos a epóxidos antes de unirse al genoma.

En 1973 Borgen et al. incubaron el B(a)P con ADN en presencia de fracciones microsómicas de hígado de rata, detectaron al metabolito, B(a)P-7,8-dihidrodiol, que interacciona con el ADN. Posteriormente, Sims y Grover (1974) mostraron que el B(a)P es metabolizado a diol epóxidos y sintetizaron el 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido de B(a)P (BPDE), como último metabolito carcinogénico responsable de la unión con el ADN.

Miller y Miller (1981), confirmaron que muchos carcinógenos, incluyendo a los HAPs, no son tóxicos por sí mismos, sino que requieren del metabolismo celular para ser convertidos por oxidación a metabolitos electrofílicos reactivos por las enzimas citocromo P-450 (CYP450) antes de interactuar con macromoléculas celulares como el ADN.

El descubrimiento del aducto 8-OHdG como resultado del estrés oxidante celular fue realizado por Kasai et al. (1984), que desarrollaron un método de HPLC/fluorescencia, que funcionara como trampa para mutágenos y carcinógenos que reaccionan con las bases del ADN y sugirieron que los radicales libres participan en la oxidación del C-8 de la guanina. Floyd et al. (1986), detectaron el aducto 8-OHdG por HPLC con un detector electroquímico (HPLC/EC), método ampliamente usado por varios grupos de investigadores para identificar analíticamente el daño al ADN en hígado y riñón de rata después de tratamientos con sustancias carcinogénicas y promotoras de tumores (Fiala et al., 1989; Umemura et al., 1990; Tagaki et al., 1991; Cattley y Glover, 1993).

2. ANTECEDENTES

2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los HAPs son una clase diversa de compuestos orgánicos constituidos por cuatro a seis anillos de benceno unidos entre sí, generalmente son lipofílicos, propiedad que se incrementa al aumentar su complejidad estructural, generalmente se presentan como mezclas. Se producen por procesos de combustión incompleta y sus emisiones al ambiente ocurren desde siglos pasados por el empleo de combustibles de uso industrial, en la calefacción y el transporte, entre otros (Bostrom et al., 2002).

Existen más de 100 clases diferentes de HAPs que se encuentran en forma natural en el ambiente, que pueden ser elaborados individualmente para efectos de investigación, pero las mezclas encontradas en los productos de combustión no pueden ser sintetizados como sustancias químicas puras.

Los HAPs son contaminantes ubicuos y sus consecuencias en el ambiente son nocivas, ya que tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o cancerígenas, por lo que representan un riesgo para los seres vivos y la salud humana.

2.2 Fuentes de emisión de HAPs

Los HAPs se forman de manera natural como resultado de la combustión incompleta del carbón, del petróleo, de los incendios forestales, de las erupciones volcánicas, y de las fuentes antropogénicas como el tráfico intenso de vehículos, de los procesos industriales, de las incineradoras y de la calefacción de casas habitación. Otros HAPs se encuentran en el humo del tabaco y son ampliamente distribuidos en el aire, suelos, aguas, sedimentos y alimentos (Peluso et al., 1998; Phillips, 1999; Martí-Cid et

al., 2008). En general, los seres vivos están constantemente en contacto con HAPs y a exposiciones elevadas se asocian con el riesgo a enfermedades incluyendo al cáncer (Mastrangelo et al., 1996). Estudios epidemiológicos han evidenciado mayor incidencia de cáncer pulmonar por exposición a HAPs en poblaciones urbanas que en rurales y en fumadores que en no fumadores (Kriek et al., 1998; Phillips, 1999).

Las principales fuentes de exposición ocupacional a los HAPs las constituyen la industria de aluminio, de coque, de fundición de hierro y de acero, el procesamiento del petróleo, la fabricación de asfalto, la pavimentación de carreteras, los procesos de vulcanización de la goma de caucho, la producción de energía a partir del petróleo, del carbón o cualquier otro combustible de origen orgánico (US EPA 1995).

Los trabajadores de los hornos de coque están muy expuestos al alquitrán de carbón que es rico en HAPs, particularmente de B(a)P que está asociado con la incidencia de cáncer de pulmón. La exposición ocupacional o ambiental a los HAPs puede ser evaluada con la detección de aductos de ADN en células humanas, su medición es considerada como el mejor biomarcador molecular de exposición a genotoxinas ambientales el cual se relaciona con el riesgo a desarrollar cáncer (Pavanello et al., 1999, 2005).

La calefacción doméstica con petróleo o con leña son también fuentes importantes de HAPs. La ingestión de alimentos a la parrilla o fritos aporta grandes cantidades de HAPs e incrementan el riesgo de iniciar enfermedades cardiovasculares. Muchos agentes químicos mutagénicos inducen la formación de aductos de ADN, como las aflatoxinas, N-nitrosaminas y aminas heterocíclicas (Strickland y Groopman, 1995; Goldman y Shields, 2003).

Estudios con animales de laboratorio reportan que la exposición a una dieta rica en HAPs puede inducir tumores en el aparato digestivo. En los seres humanos también hay evidencias de la relación entre una dieta que genere HAPs y el aumento de cáncer de colon y de hígado (Goldman y Shields, 2003).

2.3 HAPs en el aire urbano de la Ciudad de México

En el área metropolitana de la Ciudad de México se han identificado concentraciones elevadas de HAPs, (Marr et al., 2004; Molina y Molina, 2004; Velasco et al., 2004; Thornhill et al., 2008) y algunos son considerados como carcinógenos humanos y de otros se sospecha. Los HAPs están asociados principalmente con las partículas finas de aire formando mezclas orgánicas complejas (Miguel et al., 1998; Eiguren-Fernandez et al., 2004). La exposición a mezclas orgánicas complejas se ha relacionado con bajo peso de los recién nacidos (Choi et al., 2006; Tang et al., 2006), con problemas respiratorios en infantes (Jedrychowski et al., 2005) y con la muerte prematura causada por enfermedades cardiovasculares y respiratorias (Samet et al., 2000; Cohen, 2002; Pekkanen et al., 2002; Pope et al., 2002; Colburn y Johnson, 2003; Dominici et al., 2003).

Se ha determinado la presencia de HAPs asociados a las partículas suspendidas totales en el suroeste de la Ciudad de México, identificándose diez HAPs, entre los de mayor concentración en promedio anual son: benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)pireno y fenantreno (Amador-Muñoz et al., 2001, 2008; Calderón-Segura et al., 2004; Villalobos-Pietrini et al., 2006) (Figura 1). Gutiérrez-Castillo et al. (2006), identificaron y cuantificaron trece HAPs en la MOE (materia orgánica extraíble) del aire de la Ciudad de México tales

como el acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno* benzo(b)fluoranteno*, benzo(k)fluoranteno* benzo(ghi)perileno* benzo(a)pireno* criseno, dibenzo(a,h)antraceno* fenantreno fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno* y pireno, de los cuales siete se consideran como carcinógenos (*) y constituyen del 53.3 al 73.3 % de la concentración total de HAPs.

En el aire de la Ciudad de México se han identificado diversos HAPs entre los más abundantes se encuentran los siguientes:

| | | | | | |
|---|-------------------------------|-------------|---|----------------------------|-------------|
|  | benzo(b)fluoranteno | 1.19 |  | fluoranteno | 0.66 |
|  | benzo(ghi)perileno | 3.91 |  | pireno | 0.82 |
|  | dibenzo(a,h)antraceno | 1.27 |  | benzo(a)pireno | 2.01 |
|  | fenantreno | 1.14 |  | benzo(k)fluoranteno | 0.27 |
| | indeno(1,2,3-cd)pireno | 1.0 |  | criseno | 0.73 |

Promedio anual de HAPs en ng/cm³ adsorbidos a las partículas PM₁₀ en la zona suroeste de la Ciudad de México

Amador-Muñoz et al. 2001
Calderón Segura et al. 2004

Figura 1. Promedio anual de HAPs en la atmósfera de la Ciudad de México.

2.4 Benzo(a)pireno

El benzo(a)pireno es un HAP derivado del alquitrán de hulla y producto de la combustión incompleta del petróleo, se ha identificado en el aire, en agua potable, en

aguas residuales, sedimentos y en los alimentos cocinados al carbón. El B(a)P se absorbe rápidamente por vías oral, respiratoria y dérmica. También es conocido como 1,4-benzo(a)pireno (B(a)P), su fórmula química condensada es C₂₀H₁₂ y peso molecular de 252.3. Es prácticamente insoluble en agua pero soluble en benceno, tolueno, xileno y poco soluble en alcohol y metanol (Budavari et al., 1989). La vida media del B(a)P es de 1 a 6 días en la atmósfera, de 1 a 8 horas en el agua, de 5 a 10 años en los sedimentos y de 14 a 16 meses en el suelo (US EPA, 1984).

El B(a)P es metabolizado por el complejo de enzimas CYP450 para constituir 7,8-dihidrodiol que al oxidarse se transforma en 7,8-diol-9,10-epóxido considerado como el último metabolito carcinogéno del benzo(a)pireno. Durante el metabolismo oxidante también se forman fenoles y quinonas que son conjugados por el complejo enzimático glutatión-S-transferasa para ser eliminados por vías urinarias, heces o sudor (IARC, 1983).

2.5 Dibenzo(a,h)antraceno

El dibenzo(a,h)antraceno es un HAP con cinco anillos aromáticos (Budavari et al., 1989; ATSDR, 1993). También se conoce como 1,2,5,6-dibenzo(a,h)antraceno, 1,2:4,6-dibenzo(a,h)antraceno, 1,2:5,6-dibenzo(a,h)antraceno, DB(a,h)A, o DBA, su fórmula química condensada es C₂₂H₁₄, peso molecular de 278,33 y punto de fusión de 266c. Es insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y éter, solubles en éter de petróleo, xileno, benceno, tolueno, aceites y otros disolventes orgánicos (Budavari et al., 1989). Es un componente del alquitrán de hulla y del hollín (IARC, 1985), se ha detectado en el escape de los motores de gasolina, en las emisiones de hornos, en el humo del cigarro, en las carnes asadas al carbón (IARC, 1983; ATSDR, 1993). Después

de la absorción se distribuye en varios tejidos con mayor acumulación en el hígado y en los riñones (Daniel et al., 1967). Se encuentra en la atmósfera, en el suelo, en la superficie del agua de sedimentos y en suelos cerca de sitios de los desechos peligrosos, fue el primer HAP sintético que mostró tener propiedades carcinogénicas (IARC, 1983).

2.6 Benzo(b)fluoranteno

El benzo(b)fluoranteno, es un sólido cristalino con una fórmula química condensada de $C_{20}H_{12}$ y peso molecular de 252.32 (Lide, 1991), con cuatro o cinco anillos aromáticos, es prácticamente insoluble en agua y ligeramente soluble en benceno y acetona. Se encuentra en combustibles como el petróleo, se ha detectado en el humo del cigarro, en el aire urbano, en el escape del motor de gasolina, en las emisiones de la quema de carbón, en los alimentos asados, ahumados fritos o en aceites y margarinas (IARC, 1983), también en los suelos, aguas subterráneas y en sitios de desechos peligrosos (ATSDR, 1990). También es conocido como benzo (e) acefenantrileno, 3,4-benzoacefenantrileno (e), 2,3 benzofluoranteno, 3,4 benzofluoranteno o benzo(e)fluoranteno (IARC, 1983).

2.7 Benzo(ghi)perileno

El benzo(ghi)perileno, también conocido como 1,12-benzoperileno, es un HAP con seis anillos aromáticos. Proviene del petróleo crudo y de los productos de combustión incompleta del alquitrán y del carbón (US EPA, 1987). Su fórmula química condensada es $C_{22}H_{12}$ y peso molecular de 276,3 (IARC, 1983), es prácticamente insoluble en agua pero es soluble en 1,4-dioxano, diclorometano, benceno y acetona. Se

ha identificado en el humo del cigarro, carnes a las brasas y en los aceites comestibles (IARC, 1983), se deposita en suelos, aguas subterráneas y superficiales de sedimentos, en sitios de desechos peligrosos y en el aire (ATSDR, 1990).

2.8 Biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad

La presencia de un xenobiótico en el ambiente representa un riesgo para los organismos vivos, para cuantificar su exposición e impacto se usan biomarcadores.

Los biomarcadores están relacionados con el tiempo de exposición y el tipo de xenobiótico, en algunas ocasiones se pueden detectar con técnicas sensibles y semanas después de la exposición, sin embargo, en otros casos el periodo de su detección depende más de su vida media.

Los biomarcadores son cambios medibles en un sistema o matriz biológica, que pueden ser bioquímicos, fisiológicos o morfológicos y se interpretan como el reflejo de la exposición a un agente tóxico (Grandjen et al., 1994). Los biomarcadores más usados son los que se pueden obtener de forma menos invasora, entre sus características ideales se encuentran las siguientes: que sean específicos para el xenobiótico, que se usen métodos de detección sensibles y confiables en matrices o tejidos biológicos de fácil obtención como orina, sangre, pelo o aire expirado y que la técnica sea de bajo costo (Grandjean et al., 1994; Gil y Pla, 2001).

Los biomarcadores son utilizados como indicadores del estado de salud o de riesgo a enfermedades y se clasifican en tres tipos, biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad (WHO, 1993; Albertini et al., 1996; Schulte, 2005).

Biomarcadores de exposición. Puede ser un compuesto químico exógeno, sus metabolitos o el producto de la interacción con una biomolécula, esta clase de

biomarcadores se pueden medir en sangre, orina, cabello, uñas o en ADN, ARN, lípidos y proteínas. Se distinguen dos tipos basados en las pruebas de detección: a) Los marcadores de dosis interna (selectivos), indican que el agente tóxico ha entrado al organismo, miden directamente la concentración del xenobiótico o sus metabolitos en fluidos biológicos mediante análisis químicos, se utiliza principalmente para cuantificar la concentración del agente (s) tóxico(s) acumulado (s) en el tejido, en el órgano o en el organismo completo como por ejemplo los niveles de plomo en la sangre. Los metabolitos de los HAPs son biomarcadores de exposición de dosis interna tal como los niveles de 1-hidroxipireno (1-HP) en orina y en suero, que estima la exposición individual a HAPs (Bernard y Lawerys, 1986; Van Cauteren et al., 1996; Sorensen et al., 2003) y b) Los biomarcadores de dosis biológicamente efectiva (no selectivos) indican que el agente tóxico ya ha producido daño en el organismo. Son moléculas sencillas o complejas que forma el agente tóxico o sus metabolitos con los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos, reflejan acciones mutagénicas y/o carcinogénicas. Son útiles cuando la vida media del xenobiótico es muy corta y resulta difícil medir su concentración.

Los HAPs inducen la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROs) que producen estrés oxidante. Casi todos los biomarcadores de daño oxidante al ADN están en la categoría de biomarcadores de dosis biológicamente efectiva, el mejor ejemplo es el aducto 8-OHdG, principal producto de la reacción de los radicales hidroxilo con la guanina (Bernard y Lawerys, 1986; Van Cauteren et al., 1996; Sorensen et al., 2003).

Biomarcadores de efecto o respuesta. Son indicadores de cambios bioquímicos en el organismo como resultado de la exposición a agentes tóxicos, no identifican al

xenobiótico que provoca el daño, sino que miden la respuesta tóxica en el organismo. Deben ser detectados antes de que el daño sea irreversible. Son los biomarcadores más estudiados e incluyen a las alteraciones de actividades enzimáticas, aductos de lípidos y proteínas, incremento de proteínas y anticuerpos específicos (autoanticuerpos) (Repetto, 2009). Se pueden considerar dos tipos: a) Los marcadores de efecto temprano, que representan alteraciones genéticas como mutaciones, intercambios de cromátidas hermanas, entre otras y b) Los marcadores de enfermedades, son manifestaciones preclínicas o de un estado inicial de la enfermedad.

No siempre es fácil distinguir entre un biomarcador de exposición con el de efecto, tal vez el ejemplo más típico es la formación de aductos de ADN (unión covalente de carcinógenos químicos con el ADN). Se considera un biomarcador de exposición al producto de una reacción del xenobiótico con el ADN que a su vez indica la respuesta celular. La formación de aductos de ADN generalmente se correlaciona con el proceso carcinogénico por lo que es un excelente biomarcador para entender la epidemiología molecular del cáncer. Entre los agentes tóxicos inductores de aductos de ADN humano se encuentran los HAPs, las aminas aromáticas, las aminas heterocíclicas, las micotoxinas y los agentes alquilantes. Sin embargo, Moller (2006) y Györfy et al. (2008), clasifican como biomarcadores de exposición a los aductos de proteínas y de ADN e incluyen lesiones del ADN detectadas por medio del ensayo cometa ya que provee información de la dosis biológicamente efectiva, mientras que clasifican a las aberraciones cromosómicas y micronúcleos como biomarcadores de efecto biológico temprano, debido a que detectan un estado de la carcinogénesis posterior al mostrado por los biomarcadores de exposición. Sin embargo, Valverde et al. (1999) y Tice et al.

(2000) consideran al ensayo cometa como un biomarcador de efecto, así como a los intercambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y micronúcleos.

Biomarcadores de susceptibilidad. Son indicadores de la susceptibilidad individual hacia un agente tóxico. Se conocen dos tipos: a) Los biomarcadores de polimorfismos enzimáticos del metabolismo de xenobióticos, los cuales miden la actividad del complejo enzimático CYP450, involucrado en las reacciones de óxido-reducción de la fase I del metabolismo de xenobióticos (activación), para formar metabolitos primarios reactivos. El polimorfismo genético de las enzimas CYP450 determina las diferencias en la susceptibilidad de los individuos para desarrollar enfermedades y b) Los biomarcadores de polimorfismos enzimáticos de las reacciones de conjugación miden la actividad de las enzimas de conjugación de la fase II del metabolismo (inactivación) tales como el complejo glutatión-S-transferasa, acetiltransferasa y sulfotransferasa implicadas en la desintoxicación de metabolitos reactivos. La predisposición al cáncer se ha relacionado con el polimorfismo genético de estas enzimas (Van Cauteren et al., 1996).

2.9 Genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* de HAPs

La exposición ambiental es un campo de investigación ampliamente estudiado desde hace varias décadas debido al aumento constante de contaminantes, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos por el riesgo que representan para la salud humana. Los aductos de ADN mediante ³²P-postmarcaje/HPLC, HPLC/fluorescencia y ³²P-postmarcaje/TLC, son el principal biomarcador usado en

poblaciones humanas, se analizan generalmente en leucocitos y linfocitos periféricos humanos de personas que habitan en ciudades muy contaminadas.

Hemminki et al. (1990) reportaron de 2 a 3 veces más el nivel de aductos de ADN en leucocitos de personas expuestas de 0.015 a 0.057 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ B(a)P en el aire proveniente de los hornos de coque en Polonia, que personas que habitan a las afueras de la ciudad. Los resultados no mostraron relación lineal entre los aductos de ADN y los niveles del HAP en el ambiente, por lo que concluyen que hay otras fuentes como la dieta que puede contribuir al daño genotóxico.

Perera et al. (1992) realizaron estudios en la misma área geográfica y en grupos similares, sus resultados muestran que la exposición al B(a)P de 0.006 a 0.057 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ambiental se asocia con el incremento significativo en los aductos de ADN, en los intercambios de cromátidas hermanas y en aberraciones cromosómicas en muestras de sangre completa.

Santella et al. (1993) usaron el inmunoensayo de ELISA para detectar aductos HAPs-ADN en leucocitos de sangre periférica e identificaron el metabolito 1-HP en orina de individuos de una fundidora de hierro encontrando correlaciones positivas entre ambos biomarcadores y variación interindividual.

En linfocitos periféricos humanos expuestos a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM de B(a)P por 4 h se observó aumento significativo de los aductos de ADN por ^{32}P -postmarcaje en comparación con el valor testigo (Roggeband et al., 1994).

Binkova et al. (1995) y posteriormente Lewtas et al. (1997), reportaron una correlación significativa entre la exposición a los HAPs en un rango de 0.01 a 0.02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y de 0.002 a 0.004 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ B(a)P por 24 h con el nivel de aductos de ADN (de 4 a

6.5 aductos/ 10^8 nucleótidos) en leucocitos de mujeres no fumadoras expuestas al aire muy contaminado por la combustión de carbón urbano en la República Checa.

Nielsen et al. (1996a) monitorearon a conductores de autobuses no fumadores urbanos y suburbanos, fumadores y no fumadores de áreas rurales para evaluar aductos de ADN en linfocitos periféricos y establecieron para los conductores del área urbana correlaciones positivas con el nivel de aductos de ADN (40 aductos/ 10^8 nucleótidos) y la concentración de los contaminantes comparado con los valores del grupo suburbano y de los testigos (2.4 aductos/ 10^8 nucleótidos) y no encontraron influencia significativa con los hábitos de fumar y la dieta.

Nielsen et al. (1996b) detectaron niveles significativos de aductos de ADN en linfocitos periféricos, niveles de aductos de hidroxietilvalina en hemoglobina y de 1-HP en orina de trabajadores de un estacionamiento de autobuses expuestos a la contaminación por diesel, comparado con los testigos.

Shu-Xin et al. (1997), publicaron niveles significativos de aductos de ADN en leucocitos de trabajadores de una mina de carbón con exposición adicional a contaminantes del diesel.

En células de pulmón, hígado y corazón de ratas Lewis con administración intraperitoneal de 10 mg/kg por 1, 2, 4 y 11 días, se observaron niveles más elevados de aductos de ADN en hígado, que en corazón y pulmón (Godschalk et al., 1997).

Hemminki et al. (1997), determinaron aumento significativo en los niveles de aductos de ADN en leucocitos y del 1-HP en orina de trabajadores expuestos de 5 a 200 ng/m³ B(a)P, con una relación de concentración-efecto.

En personas ocupacionalmente expuestas de la industria del aluminio y en las fundidoras de hierro, detectaron niveles significativos de aductos de ADN en linfocitos

periféricos y del metabolito 1-HP en orina comparado con los testigos (Schoket et al., 1999).

Poirier (1999), señaló aumento significativo del nivel aductos de ADN en sangre completa de soldados de la armada de Estados Unidos de América en Kuwait expuestos a $0.00023 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de B(a)P. Los mismos soldados en Alemania expuestos a $0.0015\text{-}0.007 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de B(a)P no mostraron diferencias significativas en la inducción de aductos de ADN, lo que sugirió que la dieta en Kuwait juega un papel importante como fuente de HAPs.

En células HL-60 de leucemia promielocítica humana expuestas a 2, 6, 10 y 30 μM a DB(a,l)P, BaP, B(b)F, DB(a,h)A y fluoranteno por 4 h, no hubo incremento significativo en los niveles de aductos de ADN (Melendez et al., 2000).

La detección de aductos de ADN y de HAPs se han determinado por ^{32}P -postmarcaje/HPLC, en hepatocitos de rata Wistar expuestos a 2.5, 7.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}/6$ h de la materia orgánica extraíble del invierno y del verano en las zonas industrial y rural en la República Checa, los resultados evidenciaron mayor concentración de HAPs y de aductos en el invierno que en el verano en la zona industrial que en la rural (Topinka et al., 2000). Los mismos resultados fueron obtenidos por Binková et al. (2007), en ADN de timo de ternera expuestos *in vitro* a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}/24$ h de la MOE en Praga.

Perera et al. (2005), detectaron niveles elevados de aductos de ADN en linfocitos periféricos de mujeres embarazadas y de cordón umbilical en las cercanías del World Trade Center (WTC) en Manhattan, Nueva York.

En personas caucásicas también se han determinado niveles significativos de aductos de ADN de linfocitos periféricos, que dependen de factores como el hábito de fumar, la dieta y la exposición intramuros (Pavanello et al., 2006).

En hepatocitos de ratón CD2F1 con administración peritoneal 50, 100 y 200 mg/kg de B(a)P por 1, 3, 7, 14 y 28 días indujeron aumento significativo de aductos de ADN con una respuesta de dosis-efecto (Sing et al., 2006).

En hepatocitos de rata expuestos a concentraciones de 3, 10 y 30 μM de DB(a,l)P, B(a)P, B(b)F, DB(a,h)A y fluoranteno por 24 h, identificaron niveles significativos de aductos de ADN mediante ^{32}P -postmarcaje, la inducción fue mayor con el DB(a,l)P > B(a)P > DB(a,h)A > fluoranteno (Staal et al., 2007), la misma acción genotóxica fue evidenciada en las células MCF-7 de cáncer de mama expuestas a HAPs por 4 y 24 h, el DB(a,l)P produjo mayores niveles del aducto que B(a)P > DB(a,h)A.

Otro importante biomarcador empleado para evaluar el daño al ADN en biomonitoreo ambiental es el ensayo cometa alcalino en diferentes líneas celulares humanas. En células HepG2 de hepatoma humano expuestas a BaP 0.1, 1, 4 y 10 μM por 24 h, mostraron incremento significativo en el momento de la cauda del cometa y en el estrés oxidante (Park et al., 2006).

Wilhelm et al. (2007) observaron incremento en el momento de la cauda en linfocitos periféricos de niños que viven cerca de una planta de hornos de coque en Alemania, con altas concentraciones de HAPs ambientales. En linfocitos de niños expuestos al humo de cigarro (fumadores pasivos), encontraron mayor momento de la cauda y del porcentaje de ADN de la cauda mostrando una asociación entre el daño al ADN y la exposición al humo de cigarro (Zalata et al., 2007).

2.10 Evaluación del riesgo carcinogénico de los HAPs

Las partículas suspendidas en la atmósfera comprenden una mezcla de compuestos, entre los que se encuentran los HAPs. Se ha evaluado el daño a la salud

asociado con la exposición ambiental a HAPs por diferentes agencias de protección a la salud y al ambiente como: International Agency for Research on Cancer (IARC), Environmental Protection Agency (EPA), National Toxicology Program (NTP) y Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Éstas consideran como carcinógenos humanos a los contaminantes ambientales: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-c,d)pireno (Castaño-Vinyals et al., 2004). La Internacional Agency for Research on Cancer (IARC, 1983), ha evaluado el riesgo genotóxico de los HAPs en los seres humanos clasificándolos según su potencial carcinogénico como se muestra las Figuras 2 y 3.

| | Genotoxicidad |
|-----------------|---|
| Grupo1 | Carcinogénico en humanos |
| Grupo 2A | Probable carcinogénico humano |
| Grupo 2B | Posible carcinogénico humano |
| Grupo 3 | No clasificable como carcinogénico humano |
| Grupo 4 | Probablemente no carcinogénico humano |

IARC 1983

Figura 2. Clasificación del riesgo genotóxico de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

| HAP | Genotoxicidad IARC |
|--------------------------------|---------------------------|
| benzo(ghi)perileno | 3 |
| benzo(a)pireno | 2A |
| dibenzo(a,h)antraceno | 2A |
| benzo(b)fluoranteno | 2B |
| fenantreno | 3 |
| indeno(1,2,3-c,d)pireno | 2B |
| pireno | 3 |
| criseno | 3 |
| fluoranteno | 3 |
| benzo(k)fluoranteno | 2B |

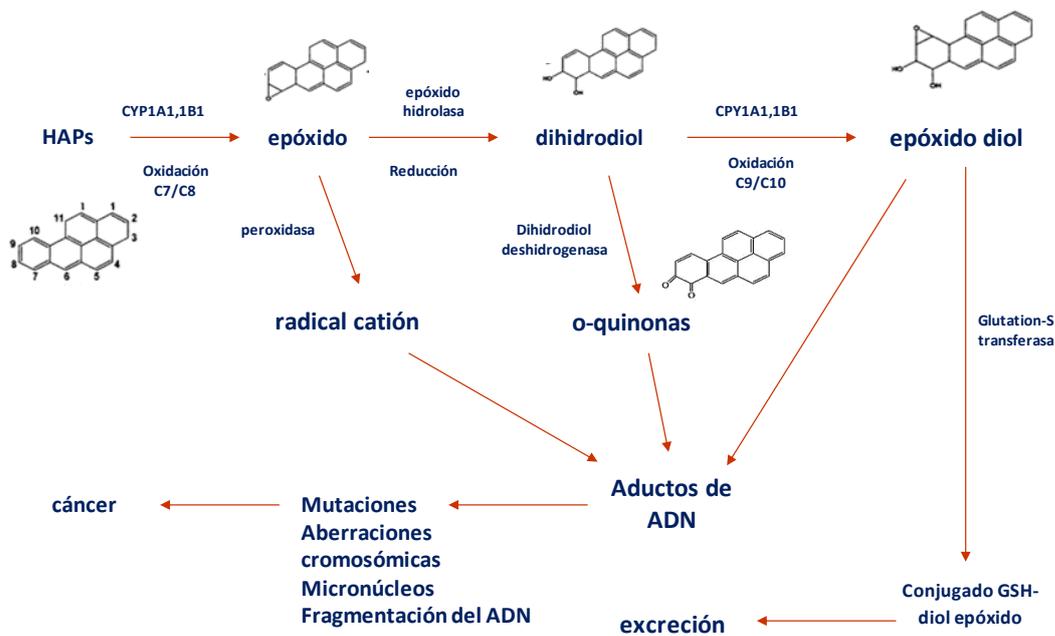
Figura 3. Clasificación del riesgo genotóxico de los principales HAPs presentes en la atmósfera.

2.11 Metabolismo de HAPs

Los HAPs son compuestos lipofílicos químicamente inertes, por lo que requieren ser activados metabólicamente para formar intermediarios electrofílicos. En general, la biotransformación de los HAPs involucra enzimas que se localizan en el retículo endoplásmico liso y en el citosol en tres fases metabólicas: la Fase I, con reacciones de

óxido-reducción catalizadas por el sistema de enzimas CYP450 convierte a los xenobióticos en metabolitos polares. La Fase II, incluye reacciones de conjugación de los metabolitos primarios con moléculas endógenas como glutatión catalizadas por las enzimas sulfotransferasa, epóxido hidrolasa, glutatión-S-transferasa y UDP-glicotransferasa a metabolitos conjugados y finalmente, en la Fase III los conjugados pueden ser eliminados por excreción vía orina, heces y sudor (Miller y Ramos, 2001). Las CYP1A1 y CYP1B1 son enzimas con actividad de monooxigenasas y en conjunto con la epóxido hidrolasas (Miller y Ramos, 2001) (Figura 4), convierten a los HAPs lipofílicos vía oxidación-reducción a metabolitos electrofílicos reactivos, los diol epóxidos-HAP, que pueden unirse covalentemente al ADN formando aductos. Los epóxidos diol reaccionan principalmente con la guanina del ADN, formando los aductos 8-OHdG. Los epóxidos diol son muy inestables y cuando no reaccionan rápidamente son hidrolizados a tetroles, metabolitos no mutagénicos, utilizados como indicadores de la formación de los epóxidos diol (Galván et al., 2005; Harrigan et al., 2006; Park et al., 2006) (Figura 4).

Vía de activación metabólica:



Galván et al. 2005
 Harrigan et al. 2006
 Park et al. 2006

Figura 4. Vía de activación metabólica de los HAPs, basada en el modelo del B(a)P.

Una característica importante de muchos HAPs es su capacidad para activar el receptor citosólico aril hidrocarbano (AhR), el cual después de dimerizarse con un traslocador aril hidrocarbano nuclear (ARNT), entra al núcleo y controla la expresión de los genes del metabolismo de los xenobióticos, incluyendo CYP1A1, CYP1B1 y las enzimas metabólicas de fase II, para la desintoxicación (Whitlock, 1999).

Es bien conocido que el B(a)P es metabolizado por las enzimas CYP450 para formar epóxidos diol que interactúan con el ADN produciendo aductos, sin embargo, recientemente se han descrito otras rutas metabólicas. El B(a)P puede ser metabolizado por las CYP450 con actividad de peroxidasa, vía oxidación de un electrón, generando radicales catión-B(a)P, precursores del fenol 6-OH-B(a)P. La auto-oxidación de este derivado resulta en B(a)P quinonas (BPQs) después del metabolismo del B(a)P, más del

50% como productos metabólicos. Las B(a)P quinonas pueden ser 6,12-, 1,6-, y 3,6-B(a)P quinonas, que bajo ciclos redox pueden crear B(a)P dioles y producir especies reactivas de oxígeno (EROs) como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) muy reactivos. En particular los radicales hidroxilo reaccionan preferentemente con la guanina formando el producto, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) causando estrés oxidante al ADN. Además de los aductos HAPs-ADN, las EROs producidas durante la conversión metabólica del B(a)P pueden inducir genotoxicidad que puede conducir a la carcinogénesis (Burdick et al., 2003; Briedé et al., 2004). Las EROs y los metabolitos de HAPs causan daño oxidante al ADN y aductos, que pueden producir la fragmentación del ADN y mutaciones (Park et al., 2006).

2.12 Aductos de ADN como biomarcadores

Los biomarcadores de carcinogénesis reflejan los eventos biológicos que ocurren entre la exposición a carcinógenos y el desarrollo de cáncer. Las modificaciones de las bases del ADN pueden ser tan pequeñas como la oxidación o tan grandes como la unión covalente al ADN (Sharma y Farmer, 2004). Los carcinógenos genotóxicos tienen la capacidad de formar aductos de ADN, que son un evento inicial del desarrollo de cáncer, algunos pueden interactuar directamente con el ADN, pero otros requieren activación metabólica para formar la última especie electrofílica reactiva que se une covalentemente a los sitios nucleofílicos del ADN y formar aductos (Hemminki, 1983; Dipple, 1995).

La presencia de aductos de ADN no siempre resulta en mutaciones, como cualquier lesión pueden ser eficientemente reparados antes de la división celular, en

esos casos los aductos de ADN pueden no ser promutágenos. Sin embargo, cuando no son reparadas las alteraciones en la secuencia de ADN influyen sobre la replicación, así mismo, cuando los aductos se reparan erróneamente ocurren alteraciones en la secuencia, conduciendo a carcinogénesis por un proceso que resulta de la acumulación de múltiples mutaciones (Sing y Farmer, 2006). Los eventos genéticos durante la carcinogénesis tradicionalmente se han dividido en tres fases, iniciación, promoción y progresión, de las cuales la primera es la que se ha asociado con la unión del carcinógeno al ADN y la producción de daño (Sharma y Farmer, 2004). Generalmente la medición de aductos del ADN es considerada como el mejor indicador de genotoxicidad, incluye a todas las bases del ADN modificadas por el compuesto y por cada uno de sus metabolitos, mostrando que son excelentes biomarcadores de genotoxicidad (Phillips et al., 2000).

La población humana está constantemente expuesta a carcinógenos en la vida diaria (Worgan et al., 2004). Aunque la exposición ocupacional a los agentes genotóxicos y carcinógenos se ha podido controlar debido a la práctica y regulación de medidas de seguridad en el trabajo; no ocurre lo mismo con los contaminantes del ambiente y de la dieta, factores que van aumentando el riesgo a la salud humana (Thier y Bolt, 2001; Goldman y Shields, 2003). En las ciudades industrializadas hay niveles cada vez mas elevados de contaminantes ambientales siendo los HAPs considerados como genotóxicos carcinogénicos (Castaño-Vinyals et al., 2004; Karlsson et al., 2004; Vineis y Husgafvel-Pursiainen, 2005). La detección de aductos de ADN en tejidos humanos es una excelente herramienta para estudios epidemiológicos moleculares del cáncer, ya que se han usado como biomarcadores de exposición a carcinógenos.

Los HAPs y sus metabolitos están asociados al aumento en la incidencia de diversos tipos de cáncer, dadas las diversas fuentes de estos compuestos y el hecho de que algunos grupos poblacionales que residen o trabajan en ambientes con mayor riesgo, es necesario el monitoreo biológico de exposición que se puede realizar mediante la determinación de la concentración de los aductos en tejidos y fluidos biológicos. Los aductos HAPs-ADN son un buen marcador de exposición y las técnicas empleadas para su detección y cuantificación han llegado a ser muy confiables en los últimos años.

En la actualidad se usan diferentes técnicas muy sensibles entre las que se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución con ³²P post-marcaje (HPLC/³²P), con detección electroquímica (HPLC/EC), espectrometría de masas con cromatografía de gases (GC-MS), espectrometría de masas MALDI, espectrometría de fluorescencia e inmunoensayos (ELISA) (Gupta et al., 1982, 1985, 1998; Talaska y Roh, 1992; Randerath y Randerath, 1994; Kriek et al., 1998; Phillips et al., 2000; Sharma y Farmer, 2004; Phillips, 2005; Pilger y Rudiger, 2006).

2.13 Estrés oxidante

En condiciones normales, durante el metabolismo aeróbico la transferencia de electrones en las células genera niveles bajos de EROs que juegan un papel integral en la modulación de algunas funciones fisiológicas, sin embargo, si se producen en cantidades excesivas pueden ser dañinos. El estrés oxidante natural resulta del desequilibrio entre la generación de EROs y la capacidad antioxidante de la célula, una sobreproducción de EROs puede guiar al desbalance entre oxidantes y antioxidantes, cuando el nivel es mayor aumenta el estrés oxidante produciendo alteraciones de

proteínas, lípidos de membrana, ARN y ADN y si el daño no es reparado posiblemente cause mutaciones, rompimientos de una o dos cadenas de ADN y aberraciones cromosómicas, entre otros.

Todas las formas de vida aeróbica están sujetas constantemente a la acción de oxígeno molecular y EROs producidas durante su metabolismo. El daño oxidante al ADN es un proceso inevitable por la formación de EROs, sin embargo, el nivel de daño puede incrementarse bajo condiciones de estrés oxidante debido a la exposición a una variedad de fuentes físicas o químicas, entre las que destacan los producidos o inducidos por radiaciones ionizantes, luz UV, plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, ozono, bióxido de nitrógeno, diversos disolventes orgánicos, el humo del cigarrillo y la dieta, lo cual puede conducir a procesos patológicos como las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, aterosclerosis, neurológicas y desarrollo de cáncer, entre otras (Paredi et al., 2002; Zaremba y Olinski, 2010).

2.14 Aducto 8-OHdG

Los organismos vivos están continuamente expuestos a EROs generados como resultado normal de reacciones bioquímicas que propician un estado oxidante, la integridad del genoma se mantiene por medio de dos mecanismos: la reparación por escisión de bases (BER) cuando los aductos generados por el daño a las bases no son muy grandes (Evans et al., 2004; Shen et al., 2007) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER) que se caracteriza por la eliminación de grandes aductos que contienen de 24 a 32 nucleótidos de longitud (Patel et al., 2007), los cuales después de ser removidos son excretados en la orina (Huang et al., 1992).

Sin embargo, además de la producción intrínseca de EROs, el organismo también está expuesto a varios factores externos relacionados con el estilo de vida (dieta y hábito de fumar), exposición ocupacional y contaminación ambiental (Loft et al., 1992, 1999; Harri et al., 2005) que causan estrés oxidante.

Entre las principales EROs que se unen a las bases de ADN generando productos de oxidación se encuentra el radical OH^\cdot , su interacción con el C8 de 2´desoxiguanosina genera oxipurinas y después por eliminación de un electrón se forma el aducto 8-hidroxi-2´desoxiguanosina (8-OHdG) (Kasai, 1997; Valko et al., 2004). Aunque el radical OH^\cdot también interactúa con otras bases del ADN como la adenina, citosina y timina, la lesión 8-OHdG es la más abundante porque se forma fácilmente debido a que la guanina tiene el menor potencial de ionización y mayor afinidad electrónica, se considera promutagénico porque disminuye la especificidad de apareamiento de bases, surgiendo mutaciones que involucran transversiones GC-TA (Haghdooost et al., 2006; Cadet et al., 2008).

La formación constante de niveles elevados de aductos 8-OHdG conduce a inestabilidad genómica que propicia el desarrollo de enfermedades neurodegeneradoras, cardiovasculares, diabetes, cáncer de pulmón, de hígado y de seno, entre otros (Kuo et al., 2007; Shen et al., 2007). El nivel de aductos 8-OHdG es un indicador de estrés oxidante y se considera un excelente biomarcador de cáncer en los seres humanos (Shigenaga y Ames, 1991; Kasai, 1997; Shen et al., 2007) (Figura 5).

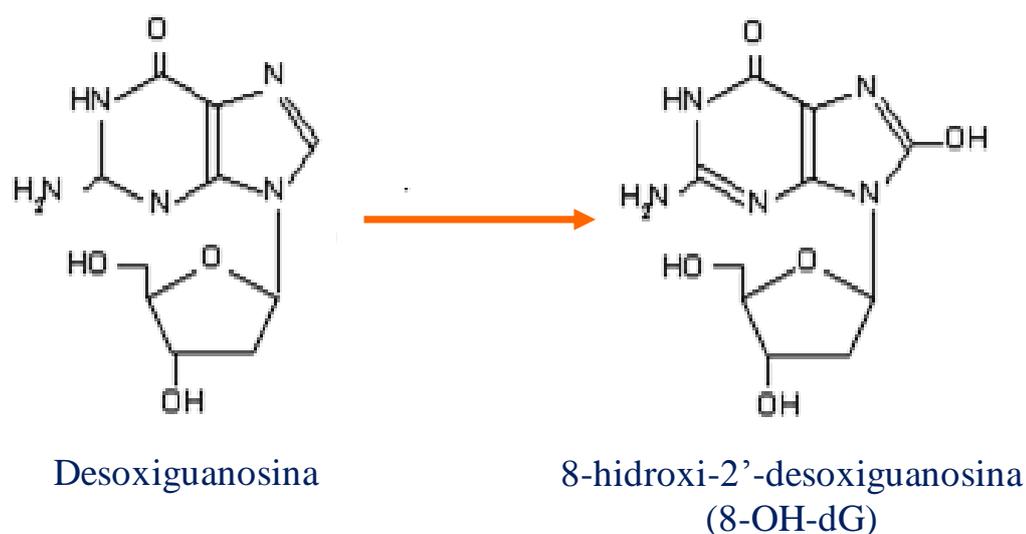


Figura 5. Formación de 8-OHdG por oxidación de la guanina.

El descubrimiento del aducto 8-OHdG fue por Kasai y Nishimura (1984a) en alimentos cocinados, ellos mostraron que los carcinógenos y mutágenos interactúan con las bases de ácidos nucleicos, particularmente con la guanina y que las EROs están involucradas en la oxidación de C8 de la guanina (Kasai et al., 1984). Al siguiente año se confirmó la formación de 8-OHdG por la generación de EROs debidas a exposición a fibras de asbestos y H_2O_2 (Kasai y Nishimura, 1984b).

Floyd et al. (1986), reportaron un método analítico sensible para detectar 8-OHdG en DNA celular por medio de HPLC con detección electroquímica (HPLC-EC), este método se usa ampliamente para estudios de daño oxidante al ADN *in vitro* en tejidos animales después de la administración de agentes carcinogénicos y promotores de tumores. El primer informe del análisis de 8-OHdG como el principal producto de daño oxidante *in vivo* en el ser humano lo realizaron Shigenaga et al. (1989), quienes

determinaron los niveles de 8-OHdG en orina, asegurando que el ADN oxidado está continuamente reparado y que las bases oxidadas son excretadas en la orina, entonces purificaron y caracterizaron el aducto 8-OHdG por medio de HPLC-EC. Desde entonces se ha reportado el análisis de 8-OHdG por diferentes métodos analíticos, como cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), HPLC-espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), HPLC-ionización electrospray y por el uso de anticuerpos como el ensayo de ELISA.

2.15 Aducto 8-OHdG como biomarcador de estrés oxidante

El aducto 8-OHdG ha sido ampliamente usado como biomarcador de estrés oxidante por su relación con las etapas de iniciación y promoción de la carcinogénesis. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* confirman que el aducto 8-OHdG es un excelente biomarcador para evaluar el riesgo de algunas enfermedades degeneradoras incluyendo el cáncer debido a que estima el daño al ADN después de la exposición a sustancias carcinogénicas, contaminación ambiental y factores del estilo de vida.

Numerosas investigaciones han mostrado el daño oxidante midiendo los niveles de 8-OHdG y con el desarrollo de cáncer (Shigenaga y Ames, 1991), en ratones expuestos a partículas del humo de diesel se mostró correlación positiva entre los niveles de 8-OHdG y cáncer de pulmón (Nagashima et al., 1995; Ichinose et al., 1997; Tokiwa et al., 1999; Tsurudome et al., 1999), en ratas expuestas a B(a)P mostraron mayor nivel de aductos 8-OHdG en células hepáticas que en células renales (Kim y Lee, 1997). En sangre completa, fibroblastos y ADN de timo de ternera irradiados con radiación gama y en células epidérmicas de ratón expuestas a radiación ultravioleta se

determinó incremento significativo en los niveles de 8-OHdG (Hattori et al., 1997; Podmore et al., 2000, Sangsuwan y Haghdoost, 2008).

Estudios en personas sanas han determinando los niveles basales del aducto 8-OHdG en orina relacionados con el estilo de vida (Kasai et al., 2001; Patel et al., 2007).

La evaluación del daño oxidante por exposición ocupacional es de gran importancia debido a que se relaciona directamente con el desarrollo de cáncer, entre los trabajadores expuestos a HAPs que muestran elevados niveles del aducto 8-OHdG en leucocitos y en orina, se encuentran los expuestos a la combustión de diesel y plantas productoras de materiales contra fuego (Harri et al., 2005; Marczyński et al., 2005), fabricas de asbestos (Hanaoka et al., 1993; Takahashi et al., 1997; Marczyński et al., 2000), en la industria del coque, del vidrio y del estireno (Tagesson et al., 1996; Marczyński et al., 1997; Zhang et al., 2003), en minas de carbón y sílice (Schins et al., 1995), en calderas (Kim et al., 2004) y trabajadores de gasolineras (Nilsson et al., 1996).

Las partículas en el aire de zonas urbanas se han asociado con el incremento del cáncer pulmonar y con los niveles de 8-OHdG en orina y en epitelio nasal de personas expuestas a contaminantes ambientales en niños, mujeres trabajadoras de estaciones de peaje, policías y conductores de autobuses (Calderón-Garcidueñas et al., 1999; Loft et al., 1999; Sorensen et al., 2003; Lai et al., 2005; Singh et al., 2007; Taioli et al., 2007).

También se ha evaluado el daño oxidante al ADN mediante los niveles del aducto 8-OHdG para relacionarlo con el riesgo de desarrollar tumores en tejidos y en orina o linfocitos de pacientes con cáncer de seno (Malins et al., 1993; Musarrat et al., 1996; Kuo et al., 2007), cáncer pulmonar (Asami et al., 1997; Inoue et al., 1998;

Tokiwa et al., 1999; Loft et al., 2006; Shen et al., 2007), cáncer renal (Okamoto et al., 1994; Miyake et al., 2004) y cáncer de útero (Yamamoto et al., 1996), lo cual muestra que el aducto 8-OHdG es un excelente biomarcador de daño oxidante, para determinar etapas tempranas el desarrollo de cáncer y muy útil en los estudios epidemiológicos (Poirier, 2004).

2. 16 Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis unicelular es actualmente muy usado para evaluar carcinógenos ambientales, este ensayo ha mostrado ser un método rápido, sencillo, de fácil aplicación y muy sensible para detectar niveles de daño al ADN como rompimientos de una o doble cadena de ADN, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos proteína-ADN y eventos de reparación por escisión incompleta en células individuales, tiene gran reproducibilidad en tejidos y órganos. Además es considerado una excelente herramienta para evaluar daño genotóxico, mutagénico y carcinogénico por estrés oxidante en células humanas *in vivo* e *in vitro*, en biomonitoreo ambiental, exposición a radiaciones, ecotoxicología, epidemiología molecular y monitoreo de poblaciones humanas. Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, una ventaja del ensayo cometa es el relativamente corto periodo de tiempo que necesita para completar un experimento y la sensibilidad para detectar niveles bajos de daño al ADN en muestras muy pequeñas donde el análisis de datos es a nivel de células individuales (Ashby et al., 1995; Fairbain et al., 1995; Lee et al., 1996; Anderson, 1998, Wagner et al., 1998; Tice et al., 2000; Collins, 2002; Speit y Hartmann, 2002; Lee et al., 2003).

El ensayo cometa fue originalmente desarrollado por Östling y Johansen (1984) para cuantificar rompimientos en la cadena de ADN en células individuales expuestas a

radiación ionizante. En los primeros intentos para detectar el daño emplearon un sistema en el cual las células dañadas embebidas en un gel de agarosa mostraron un halo de ADN fragmentado alrededor del núcleo. Después el ensayo se mejoró, realizando la lisis en una solución detergente neutra y aplicando un campo eléctrico débil para atraer hacia el ánodo los fragmentos de ADN localizados en el núcleo. Como la corriente eléctrica pasa a través del gel, la doble cadena de ADN rota se desenrolla y migra formando una cauda detrás de la cabeza nuclear. El ADN se tiñó con bromuro de etidio y las células se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia, resultando una imagen parecida a un cometa. Midieron la cauda y determinaron la diferencia entre células irradiadas y no irradiadas, el valor de la longitud se incrementó con la dosis de radiación y aumentó por lo tanto el daño al ADN, las condiciones neutras limitaron la utilidad del ensayo ya que fue usado solamente para cuantificar células dañadas y no dañadas, aunque en estudios posteriores se empleó también para establecer la eficiencia de la radiación y tratamientos de quimioterapia en células con cáncer (Tice et al., 2000; Collins, 2002; Bowden et al., 2003).

En un intento por superar las limitaciones cuantitativas, Singh et al. (1988), basados en el ensayo de electroforesis neutra introdujeron la versión alcalina del ensayo cometa a pH 13 para detectar lesiones por rompimientos de una cadena de ADN y sitios lábiles al álcali en células individuales. Ellos midieron la longitud de la cauda del cometa a partir del primer borde del núcleo pero observaron que células con la misma longitud de migración tenían diferente intensidad en la cauda (Ashby et al., 1995; Tice et al., 2000; Collins, 2002; Olive, 2002; Speit y Hartmann, 2002; Bowden et al., 2003; Lee et al., 2003; Faust et al., 2004). Esta versión alcalina fue aceptada por un panel de expertos en el International Workshop on Genotoxicity Test Procedures como la versión

óptima, para evaluar sustancias genotóxicas, carcinogénicas, antineoplásicas y apoptóticas. En los últimos años la versión alcalina del ensayo cometa ha sido una excelente herramienta en el área de Toxicología Genética, ya que permite la valoración de daño genético *in vitro* e *in vivo* en gran variedad de células (Tice et al., 2000; Lee et al., 2003).

Posteriormente, Olive et al. (1990), tomaron en cuenta el diámetro de la cabeza y la longitud de la cauda (midiendo la longitud de la cauda desde el centro de la cabeza). Estos autores desarrollaron un método de lisis alcalina seguida por electroforesis ya sea en condiciones neutras para detectar rompimiento de doble cadena o alcalinas (pH 12.1) para una cadena de ADN, sin embargo, debido a que la mayoría de agentes genotóxicos inducen mucho más rompimientos de una cadena y sitios lábiles al álcali, la versión alcalina del ensayo cometa es la más sensible para detectar el daño al ADN. Como encontraron caudas cortas con cantidades altas de fragmentos y caudas largas con pocos fragmentos de ADN, además de la longitud también tomaron en cuenta la intensidad de la cauda e introdujeron un parámetro compuesto, al cual llamaron “momento de la cauda”. El momento de la cauda se definió como la distancia entre el centro de la masa de la cauda y el centro de la masa de la cabeza, multiplicado por el porcentaje de ADN en la cauda (Tice et al., 2000; Collins, 2002; Speit y Hartmann, 2002; Bowden et al., 2003).

Por su parte, Tice et al. (1990) utilizando la electroforesis unicelular alcalina separaron al cometa en sus componentes cabeza y cauda, midieron el diámetro de la célula perpendicular a la dirección de electroforesis para definir la cabeza del cometa y calcularon el momento de la cauda multiplicando la fracción de ADN en la cauda por la mitad de la longitud de la cauda (Tice et al., 1990; Ashby et al., 1995).

Debido a que las tres metodologías anteriores tomaban en cuenta la cabeza o la mitad de ella junto con la longitud de la cauda, las células sin daño eran registradas como cometas con la longitud de la cauda igual al diámetro o al radio del núcleo respectivamente, lo cual conduce a que células intactas tengan un momento de la cauda positivo, es así como Ashby et al. (1995) proponen medir la longitud de la cauda a partir del límite posterior del núcleo y el momento de la cauda como el producto de la longitud de la cauda por el porcentaje de ADN en la misma.

2.17 Ensayo cometa como biomarcador de daño genotóxico

El ensayo cometa se ha usado en gran cantidad de estudios de monitoreo humano en personas ambiental u ocupacionalmente expuestas a diferentes xenobióticos como los HAPs y plaguicidas para evaluar el daño que causan al ADN ya que la fragmentación se considera un evento inicial en el proceso de carcinogénesis (Griffiths et al., 2002).

Los estudios con el ensayo cometa en la población ambientalmente expuesta a ozono y material particulado, se han realizado principalmente en leucocitos, linfocitos, epitelio nasal y epitelio oral de personas que están constantemente expuestas a los contaminantes del aire como son trabajadores de gasolineras, conductores de autobuses o de taxis, vendedores en las calles, policías, así como jóvenes y niños estudiantes (Calderón-Garcidueñas, 1997; Valverde et al., 1997; Glück y Gebbers, 2000; Avogbe et al., 2005; Wilhelm et al., 2007).

Investigaciones en poblaciones ocupacionalmente expuestas a agentes genotóxicos, muestran aumento en la longitud y en el momento de la cauda en leucocitos y linfocitos de trabajadores expuestos a HAPs en hornos de coque,

producción de electrodos de grafito, incineradoras, personal de aeropuertos y pavimentación de carreteras (Sul et al., 2003; Leng et al., 2004; Cavallo et al., 2006; Qiu et al., 2007). Debido a que pacientes con cáncer de ovario, de seno y de colon han mostrado elevada frecuencia de células con cometa así como migración extensiva de la cauda, se considera que el ensayo cometa es una herramienta adicional para el diagnóstico de sospecha de cáncer (Olive et al., 1993; Baltaci et al., 2002; McGlynn et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

En la Ciudad de México se han incrementado cada vez más las emisiones de HAPs al ambiente por el aumento del tráfico vehicular y de las industrias constituyendo un grave problema de contaminación, por lo que la población humana está constantemente expuesta a estos compuestos que se ha demostrado que son carcinogénicos y mutagénicos. A pesar del riesgo que representan los HAPs para la salud humana, en México se han realizado pocos estudios sobre el daño que causa al genoma la mezcla orgánica obtenida del aire urbano, las cuales contienen diferentes concentraciones y tipos de HAPs tales como B(b)F, DB(a,h)A y B(ghi)P, B(a)P, sin embargo, no se ha analizado su acción genotóxica y citotóxica individual. Con tales antecedentes en el presente trabajo se evaluarán los efectos genotóxico y citotóxico del B(b)F, DB(a,h)A y B(ghi)P y B(a)P mediante el ensayo cometa alcalino y la viabilidad celular con la tinción de exclusión azul tripano, respectivamente y por primera vez el estrés oxidante del ADN con la detección de los niveles del aducto 8-OHdG por el método de ELISA en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones de los cuatro HAPs con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica (fracción enzimática de hígado de rata).

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar los niveles del aducto 8-OHdG y la fragmentación del ADN en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a hidrocarburos aromáticos policíclicos con y sin activación metabólica animal.

Objetivos particulares:

- 4.1 Analizar el daño al ADN mediante el ensayo cometa alcalino en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a cinco concentraciones de benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno con y sin activación metabólica animal (mezcla enzimática S9).
- 4.2 Estandarizar la técnica de ELISA para detectar los niveles del aducto 8-OHdG en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a cinco concentraciones de benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno con y sin activación metabólica animal (mezcla enzimática S9).
- 4.3 Evaluar la citotoxicidad mediante la tinción de exclusión con azul tripano en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a cinco concentraciones de benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno con y sin activación metabólica animal (mezcla enzimática S9).
- 4.4. Comparar la acción genotóxica y citotóxica *in vitro* del benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(ghi)perileno en linfocitos periféricos humanos con y sin activación metabólica animal (mezcla enzimática S9).

5. HIPÓTESIS

Si los HAPs han mostrado inducir efectos genotóxico y citotóxico en células humanas, entonces estos mismos efectos se producirán en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno y benzo(a)pireno evidenciado por el incremento significativo en el daño sobre ADN y en los niveles del aducto 8-OHdG.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana

Se tomaron 20 ml de sangre heparinizada de un donador sano y cada muestra se transfirió en dos tubos estériles, se centrifugó a 2,500 rpm por 20 min a 37 °C, se diluyó 1:1 con solución de Hank's (37 °C) y se separaron los linfocitos por gradientes con Ficoll-Paque centrifugando a 1,500 rpm por 10 min a 37 °C, la capa de linfocitos en la interfase de ficoll se colectó y se hicieron dos lavados con medio RPMI 1640 centrifugando a 1,500 rpm por 10 min. Finalmente los linfocitos se mantuvieron en medio RPMI 1640 (37 °C) suplementado con penicilina/estreptomicina 1%. Se tomaron 10 µl del botón celular y se cuantificó el número de linfocitos/ml con una cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular, el resto del botón celular se usó para los tratamientos con los HAPs.

6.2 Viabilidad celular

La viabilidad de los linfocitos humanos en todos los grupos experimentales antes y después de los tratamientos se evaluó mediante el método de exclusión de azul tripano (Altman et al., 1993). El azul tripano penetra en las células muertas a través de la membrana celular dañada, tiñendo al núcleo. Se tomaron 10 µl de cada muestra más 10 µl de azul tripano (0.4 %) y después de 3 min, se cuantificó en 100 células consecutivas la cantidad de células muertas por duplicado.

6.3 Tratamientos de linfocitos periféricos humanos con HAPs *in vitro* sin activación metabólica animal

1 X 10⁶ linfocitos con viabilidad \geq 96 % se coincubaron con DB(a,h)A (20, 40, 80, 160 y 320 μ M), B(ghi)P (20, 40, 80, 160 y 240 μ M) y B(b)F (20, 30, 40, 60, y 80 μ M) en medio RPMI 1640 a un volumen final de 1 ml a 37 °C por 24 h. El testigo negativo fue de 1 X 10⁶ células más DMSO (0.5 %) en medio RPMI 1640 y el testigo positivo fue de 1 X 10⁶ células más B(a)P (80 μ M) en medio RPMI 1640 en las mismas condiciones. Después de los tratamientos, el botón celular se lavó dos veces con medio RPMI 1640 y se dividió para realizar el ensayo cometa alcalino y la detección de los niveles del aducto 8-OHdG por inmunoensayo de ELISA.

6.4 Tratamientos de linfocitos periféricos humanos con HAPs *in vitro* con activación metabólica animal

1 X 10⁶ linfocitos con viabilidad \geq 96 % se coincubaron con DB(a,h)A (20, 40, 80, 160 y 320 μ M), B(ghi)P (20, 40, 80, 160 y 240 μ M) y B(b)F (20, 30, 40, 60, y 80 μ M) en medio RPMI 1640 más 100 μ l de la mezcla enzimática S9 de hígado de rata (1:0, S9 + 1M G6P, 0.4 M MgCl₂, 1.65 M KCl, 0.1 M NADP, 0.2 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.5) para un volumen final de 1 ml a 37 °C por 24 h. El testigo negativo fue de 1 X 10⁶ células más DMSO (0.5 %) en medio RPMI 1640 más 100 μ l de la mezcla enzimática S9. El testigo positivo fue de 1 X 10⁶ células más B(a)P (80 μ M) en medio RPMI 1640 más 100 μ l de la mezcla enzimática S9 en las mismas condiciones. Después de los tratamientos, el botón celular se lavó dos veces con medio RPMI 1640 y se dividió para evaluar la viabilidad celular, para realizar el ensayo

cometa alcalino y la detección de los niveles del aducto 8-OHdG por inmunoensayo de ELISA.

6.5 Ensayo cometa alcalino

Se realizó el ensayo cometa alcalino de acuerdo con los métodos de Singh et al. (1988), Speit y Hartmann (2002) y Tice et al. (2000). Los linfocitos (2500 células) de cada lote experimental se mezclaron con 90 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LPMA 0.5%) a 37 °C, se colocaron sobre un portaobjetos esmerilado con una monocapa de agarosa de punto de fusión normal (NMA 1%) y se colocó un cubreobjetos, se hicieron dos laminillas para cada concentración de HAPs y para cada uno de los testigos. Las laminillas se mantuvieron a 4 °C por 5 min para la solidificación de la agarosa y después se sumergieron en una solución de lisis final (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, Tritón 1% X-100 y DMSO 10 %, pH 10) a 4 °C por 1 h. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (Owl A5, Lab System Inc) con amortiguador de electroforesis alcalino frío (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 13) durante 20 min para desenrollar las hebras del ADN, la electroforesis se realizó a 25 V y 300 mA por 20 min en oscuridad. Posteriormente los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante (0.4 M Tris, pH 7.5) por 5 min, se fijaron con metanol absoluto frío por 5 min y se secaron al aire a temperatura ambiente. A cada laminilla se agregaron 50 µL de bromuro de etidio (20 mg/ml) para teñir el ADN. Las laminillas se examinaron usando un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss modelo Axiostar Plus H-BO-100, equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Para visualizar el efecto genotóxico se evaluaron dos parámetros: la frecuencia de cometas (núcleos con daño al ADN) y la longitud de la cauda (fragmentación del

ADN) en 100 núcleos consecutivos de cada lote experimental y cada testigo por duplicado (Figura 6).

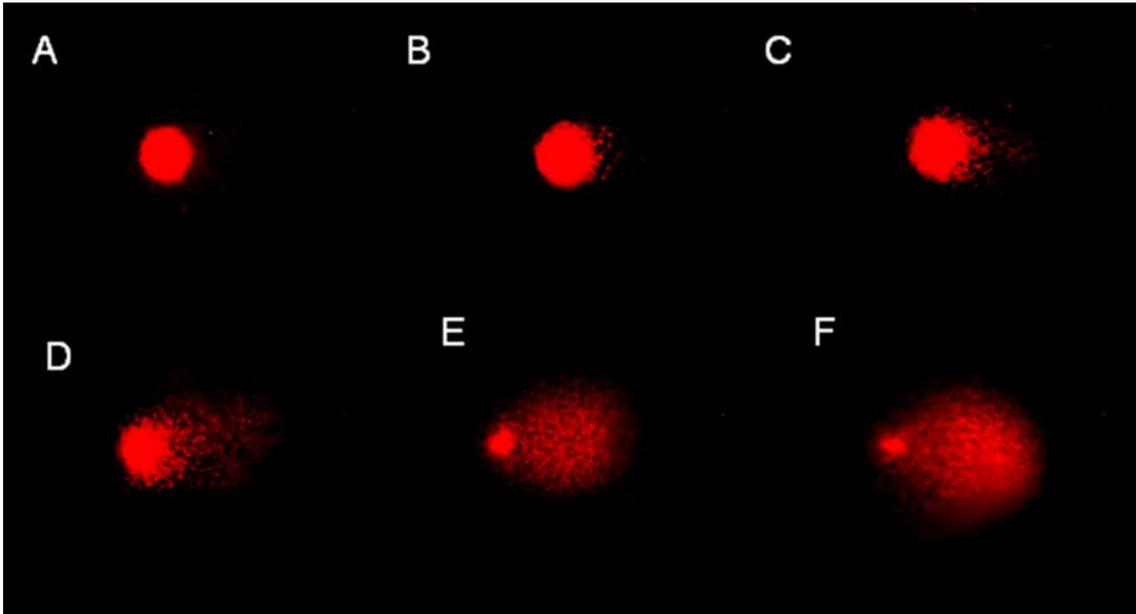


Figura 6. Imágenes de núcleos de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones de DB(a,h)A, B(ghi)P y B(b)F por 24 h (40X) A) Núcleo sin daño al ADN (sin cometa); B-F) Núcleos con daño al ADN (con cometa)

6.6 Extracción de ADN

Se resuspendió el botón celular (1×10^6 linfocitos) en 300 μ l de amortiguador de lisis frío (0.1 M EDTA, 0.15 M NaCl pH 8) más proteinasa K (Sigma) a concentración final de 0.1 mg/ml y SDS(0.5 %). Se incubó a 37 °C durante 12 h con agitación constante. Después se agregó un volumen de fenol precalentado a 50 °C, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 8 000 xg durante 10 min a 4 °C. Se recolectó la fase acuosa y se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) para extraer el ADN, se mezcló en vórtex y centrifugó a 8000 xg durante 10 min a 4 °C. Nuevamente se recogió la fase acuosa y se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) en las condiciones de centrifugado anteriores, se extrajo el ADN con éter etílico y se centrifugó a 8000 xg por 3 min a 4 °C. Para precipitar el ADN se separó la fase acuosa y se adicionó 30 μ l de 3 M AcNa (acetato de sodio) y 750 μ l de etanol absoluto frío. Se mezcló suavemente, se dejó precipitar a -20 °C por 2 h y después se centrifugó a 10 000 xg por 20 min. Se lavó el botón con etanol 80 %, se secó y se resuspendió en 100 μ l de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8). Posteriormente se digirió el ARN mediante la adición de ARNasa A (Sigma) hasta una concentración final de 20 μ g/ml y se incubó a 37 °C durante 30 min. Se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugó a 8 000 xg por 5 min a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó 10 μ l de 3M AcNa y 250 μ l de etanol absoluto frío, se dejó 10 min en hielo y después se centrifugó a 10 000 xg por 20 min a 4 °C. Se lavó con etanol al 80 % y resuspendió en 50 μ l de amortiguador TE. Finalmente la determinación de la concentración de ADN se realizó espectrofotométricamente (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer) a 280 nm y se almacenó a -70 °C (Yin et al., 1995; Glen, 1996).

6.7 Diálisis de enzimas

Las enzimas nucleasa micrococcal (MN) y fosfodiesterasa (SPD) se dializaron para evitar impurezas que interfirieran con la digestión. Se hidrató la membrana del casete de diálisis (Slide-A-Lyzer 10K) en el amortiguador de diálisis (agua mili-Q) por 1-2 minutos. Después se introdujo lentamente cada enzima por separado a través de uno de los puertos del casete evitando la formación de burbujas. Se mantuvo dializando en 3 L del amortiguador durante 24 h a 4 °C con agitación constante y se cambió el amortiguador una vez, finalmente se extrajeron las enzimas y se usaron inmediatamente para la digestión del ADN.

6.8 Digestión del ADN

100 µg de ADN de linfocitos periféricos humanos de cada tratamiento se secaron en un evaporador Speed Vac (Concentrator 5301 Eppendorf), se agregó la mezcla enzimática nucleasa micrococcal/fosfodiesterasa (MN/SPD) a una concentración final de MN 30 mU/µl y SPD 10 mU/µl en amortiguador de digestión (100 mM succinato de sodio pH 6, 50 mM cloruro de calcio), se agitó por vórtex y se centrifugó durante pocos segundos a 8 000 xg para asegurar la mezcla completa, se incubó a 37 °C toda la noche. Después se agregó la enzima NP1 (Sigma) a concentración de 1.25 mg/ml, en amortiguador de acetato de sodio (250 mM acetato de sodio pH 5) más cloruro de zinc (2 mM cloruro de zinc) y se incubó a 37 °C por 1 h. Finalmente se detuvo la reacción adicionando tris base (0.5 M tris base), se centrifugó a 8 000 xg por 5 min y se usó el sobrenadante que es donde se encuentra el material genético de los linfocitos (Yin et al., 1995; Helbock et al., 1999).

6.9 Detección de los niveles del aducto 8-OHdG por medio del inmunoensayo de ELISA

Los niveles del aducto 8-OHdG se midieron en 100 µg de ADN de linfocitos periféricos humanos expuestos a cada concentración de HAPs-S9, HAPs+S9 y los testigos (DMSO-S9 y DMSO+S9) con el Kit 8-OHdG EIA (Cayman Chemical) para el inmunoensayo de ELISA siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes, los resultados se expresaron en ng/ml de ADN.

Se agregaron 50 µl del amortiguador EIA a los pocillos indicados, 50 µl de 8-hydroxy-2-deoxy Guanosina AChE Tracer y 50 µl del anticuerpo monoclonal 8-hydroxy-2-deoxy Guanosina a cada pocillo excepto al blanco. La placa se cubrió con una película plástica y se incubó por 18 h a 4 °C en un agitador orbital (Rocker 25 Labnet). Se hicieron 5 lavados con el amortiguador de lavado, se agregaron 20 µl del reactivo Ellman a cada pocillo y nuevamente se colocó en el agitador orbital por 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

La placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISA (ELx800 BioTec), usando el software Gen 5 ELISA y los datos obtenidos se procesaron en una hoja de cálculo (provista por Cayman Chemical), la concentración del aducto 8-OHdG se obtuvo con una curva estándar para 8-OHdG (10.3-3000 pg/ml) expresada en ng/µg de ADN.

6.10 Análisis estadístico

Los resultados de la frecuencia de cometas, la longitud de la cauda, los niveles del aducto 8-OHdG y la viabilidad celular se reportaron como promedio ± error estándar de tres experimentos independientes con y sin S9 (activación metabólica

animal) para cada concentración de HAPs y los testigos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba estadística de Newman-Keuls para determinar diferencias significativas entre los grupos tratados con sus respectivos testigos a $p < 0.001$. La relación entre la frecuencia de cometas, la longitud de la cauda y los niveles del aducto 8-OHdG con las concentraciones de HAPs-S9 o HAPs+S9 se determinó usando un análisis de regresión lineal.

7. RESULTADOS

7.1 Genotoxicidad de HAPs en linfocitos periféricos humanos *in vitro* sin activación metabólica animal (HAPs-S9)

Los resultados de los tratamientos de linfocitos periféricos humanos *in vitro* expuestos por 24 h a HAPs-S9 mostraron que todos los HAPs causaron incremento significativo en los promedios de la frecuencia de cometas y en la longitud de la cauda al compararlos con el testigo negativo (0.5 % DMSO-S9). Con DB(a,h)A, a concentraciones de 40, 80, 160 y 320 μM el promedio en la frecuencia de cometas fue de 7.0 ± 0.8 a 19.3 ± 1.4 y la longitud de la cauda de 7.37 ± 1.9 a 22.12 ± 3.4 μm . Sin embargo, con 20 μM de DB(a,h)A, la frecuencia de cometas fue de 4.5 ± 0.5 y la longitud de la cauda de 3.5 ± 1.2 μm , no mostró diferencias significativas con el testigo negativo (frecuencia de cometas 4.5 ± 0.5 y longitud de la cauda 3.38 ± 1.2 μm) (Tabla I, Figuras 7 y 8) ($p < 0.001$). Con B(ghi)P a 20, 40, 80, 160 y 240 μM el promedio de la frecuencia de cometas fue de 8.5 ± 0.5 a 23.7 ± 6.5 y la longitud de la cauda de 8.99 ± 2.1 a 30.18 ± 3.6 μm . Con B(b)F a concentraciones de 20, 30, 40, 60 y 80 μm los promedios de frecuencia de cometas y longitud de la cauda fueron de 10.4 ± 1.7 a 24.5 ± 0.9 y 10.19 ± 2.2 a 31.02 ± 3.9 μm , respectivamente (Tabla I, Figuras 7 y 8). El tratamiento con B(a)P 80 μM produjo aumento en el promedio de la frecuencia de cometas (27.8 ± 10.0) y de la longitud de la cauda (20.63 ± 2.6 μm) comparado con el testigo negativo ($p < 0.0001$) (Tabla I, Figuras 7 y 8).

7.2 Genotoxicidad de HAPs en linfocitos periféricos humanos *in vitro* con activación metabólica animal (HAPs+S9)

Los tratamientos *in vitro* con HAPs+S9 en linfocitos periféricos humanos incubados por 24 h indujeron mayor daño al ADN que los tratamientos directos (HAPs-S9) y con relación al testigo (5 % DMSO+S9). El DB(a,h)A en concentraciones de 40, 80, 160 y 320 μM aumentaron el promedio de la frecuencia de cometas de 12.5 ± 0.6 a 84.3 ± 1.2 μm y en la longitud de la cauda de 12.95 ± 2.6 a 89.33 ± 3.3 μm ; sin embargo, DB(a,h)A a 20 μM (frecuencia de cometas 6.3 ± 1.0 ; longitud de la cauda 6.23 ± 1.8 μm) no causó diferencias significativas comparando con el testigo (frecuencia de cometas 5.0 ± 1.0 ; longitud de la cauda 6.42 ± 1.8 μm) ($p < 0.001$). Las concentraciones de 20, 40, 80, 160 y 240 μM de B(ghi)P indujeron incremento en el promedio de la frecuencia de cometas de 27.8 ± 4.4 a 98.7 ± 0.6 y en la longitud de la cauda de 20.72 ± 2.5 a 136.5 ± 2.1 μm . Las concentraciones de 20, 30, 40, 60 y 80 μM de B(b)F produjeron aumento en el promedio de frecuencia de cometas de 37.8 ± 8.2 a 100 ± 0.0 y la longitud de la cauda de 37.05 ± 3.6 a 113.87 ± 1.8 μm (Tabla I, Figuras 7 y 8). A concentraciones elevadas de HAPs causaron severo daño al ADN, con el 80 y 100 % de cometas con gran longitud de la cauda comparado con el testigo (Gráficas 1 y 2). El testigo positivo (BaP 80 μM) produjo el 100 % de cometas con grandes caudas (117.19 ± 2.4 μm) con respecto al BaP-S9 y al testigo (0.5 % DMSO+S9) (5.0 ± 1.0 ; 6.42 ± 1.8 μm). Comparando el efecto genotóxico de los HAPs-S9, se observó que B(b)F fue más genotóxico que DB(a,h)A y B(ghi)P. El B(b)F y el B(a)P a 80 μM causaron aumento similar en ambos parámetros genotóxicos comparado con el testigo (Tabla I, Figuras 7 y 8).

El análisis de regresión lineal del promedio de la frecuencia de cometas y la longitud de la cauda de todos los HAPs-S9 y HAPs+S9 mostraron correlaciones positivas ($r=0.9$), indicando una relación concentración-efecto (Figura 9).

7.3 Niveles de 8-OHdG en ADN de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a HAPs sin activación metabólica animal (HAPs-S9)

La Figura 10, muestra aumento significativo en los niveles de 8-OHdG en el ADN de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a HAPs-S9 comparado con el testigo (DMSO-S9) ($p<0.01$). El DB(a,h)A a concentraciones de 80, 160 y 320 μM produjo incremento de 0.67 ± 0.02 a 0.87 ± 0.05 ng/ μg de ADN; B(ghi)P a 40, 80, 160 y 240 μM indujo niveles de 8-OHdG entre 0.67 ± 0.03 a 0.98 ± 0.03 ng/ μg de ADN y B(b)F a 20, 30, 40, 60 y 80 μM aumentaron los niveles de 8-OHdG (0.69 ± 0.03 a 1.13 ± 0.07 ng/ μg de ADN) con relación al testigo (0.5 % DMSO-S9) (0.55 ± 0.02 ng/ μg de ADN) ($p<0.01$). Sin embargo, el DB(a,h)A a 20 y 40 μM y B(ghi)P a 20 μM no mostraron diferencias significativas en los niveles de 8-OHdG comparado con el testigo (Tabla II).

7.4 Niveles de 8-OHdG en ADN de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a HAPs con activación metabólica animal (HAPs+S9)

Los tratamientos con HAPs+S9 produjeron incremento significativo en los promedios del nivel de 8-OHdG comparado con los HAPs-S9 y con el testigo (0.5 % DMSO+S9) ($p<0.001$) (Figura 10). A concentraciones de 80, 160 y 320 μM de DB(a,h)A provocaron aumento significativo en el rango de 0.99 ± 0.04 a 1.78 ± 0.10 ng/ μg de ADN con relación al testigo (0.54 ± 0.05 ng/ μg de ADN). A concentraciones

de 40, 80, 160 y 240 μM de B(ghi)P, se elevó el nivel del aducto 8-OHdG de 1.13 ± 0.0 a 2.23 ± 0.4 ng/ μg de ADN comparado con el testigo. Con 20, 30, 40, 60 y 80 μM de B(b)F el nivel de 8-OHdG aumentó, de 1.24 ± 0.04 a 3.14 ± 0.14 ng/ μg de ADN, con relación al testigo. El DB(a,h)A y el B(ghi)P a bajas concentraciones no mostraron diferencias significativas en el promedio de los niveles de 8-OHdG comparado con el testigo (0.5 % DMSO+S9) ($p < 0.01$) (Figura 10). El B(a)P a 80 μM (testigo positivo), causó aumento en el promedio del nivel de 8-OHdG (1.23 ± 0.05 a 3.28 ± 0.06 ng/ μg de ADN) con relación a B(a)P-S9 y el testigo (0.5 % DMSO+S9) (Figura 10).

El análisis de regresión lineal de los promedios de los niveles del aducto 8-OHdG inducidos por HAPs-S9 y HAPs+S9 mostraron correlaciones positivas $r=0.9$, produciendo una respuesta de concentración-efecto (Figura 11).

7.5 Citotoxicidad de HAPs sin y con activación metabólica animal *in vitro*

La viabilidad de los linfocitos expuestos a todos los tratamientos HAPs-S9 y HAPs+S9 *in vitro* por 24 h no se modificó comparando con los testigos (0.5 % DMSO-S9 y +S9) (Figura 12).

8. DISCUSIÓN

El aire de la Ciudad de México contiene altos niveles de HAPs debido principalmente al incremento en las emisiones del tráfico vehicular. Diversos estudios genotóxicos se han enfocado a la exposición ambiental y ocupacional pero hay ausencia de conocimiento relacionado con el efecto genotóxico de los HAPs individuales. Calderón-Garcidueñas et al. (1999) reportaron daño significativo en el ADN de epitelio nasal en niños de la Ciudad de México expuestos a contaminantes ambientales usando el ensayo cometa alcalino y la detección de 8-OHdG con inmunohistoquímica. Valverde et al. (1997) y Fortoul et al. (2004) mostraron incremento significativo en la fragmentación del ADN en epitelio nasal y leucocitos periféricos de jóvenes estudiantes de la misma ciudad, ambos estudios relacionan el daño al ADN con altas concentraciones de O₃ y partículas PM_{2.5} que se encuentran en la atmósfera. Gutiérrez-Castillo et al. (2006) observaron que la MOE induce daño al ADN en células A549 de epitelio alveolar. En una investigación previa, se evidenció que los HAPs extraídos de la MOE del aire de la Ciudad de México (partículas PM₁₀ y PM_{2.5}) producen incremento significativo en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y alteración en la cinética de proliferación celular de linfocitos periféricos humanos en cultivo (Calderón-Segura et al., 2004), así como acción mutagénica con el ensayo de Ames (Villalobos Pietrini et al., 2006).

En el presente estudio se evaluó la fragmentación del ADN y la citotoxicidad de los HAPs DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F y B(a)P, identificados y asociados en la MOE del aire de la Ciudad de México en los linfocitos periféricos humanos *in vitro* con y sin activación metabólica animal, usando el ensayo cometa alcalino y la tinción de

exclusión de azul tripano, respectivamente. Además, la detección del daño oxidante al ADN con los niveles del aducto 8-OHdG por inmunoensayo de ELISA.

Los HAPs-S9 incubados con los linfocitos periféricos humanos produjeron incremento significativo en el promedio de la frecuencia de cometas, en la longitud de la cauda de los cometas y en los niveles de 8-OHdG con relación al testigo negativo (0.5 % DMSO-S9). Los resultados indican que estos compuestos son agentes genotóxicos menos bioactivos por los linfocitos humanos *in vitro*, los cuales producen bajas concentraciones de intermediarios metabólicos y EROs que interactúan con el ADN causando su fragmentación y la oxidación de la guanina. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde muestran que los linfocitos de sangre periférica humana contienen una concentración baja de enzimas CYP450 1A1 y 1B1 comparada con los hepatocitos, capaces de metabolizar a los HAPs a intermediarios genotóxicos (Burchiel y Luster, 2001; Lin et al., 2003; Furukawa et al., 2004; Van Duursen et al., 2005). Sin embargo, en presencia de la mezcla S9, todos los HAPs produjeron mayor daño al ADN en linfocitos humanos *in vitro*, evidenciado por el gran incremento en el porcentaje de cometas, en la longitud de la cauda del cometa y en los niveles del aducto 8-OHdG comparado con los HAP-S9 y el testigo (0.5 % MMSO+S9), con una relación de concentración-efecto.

La activación metabólica de los HAPs es ampliamente conocida, son metabolizados por el sistema de enzimas CYP450 (CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1) para producir intermediarios electrofílicos tales como los epóxidos diol. El B(a)P es transformado enzimáticamente en óxidos de areno (9-OH-BaP, 7-OH-BaP, 6-OH-BaP, 3-OH-BaP y 1-OH-BaP). Estos óxidos de areno, se transforman en fenoles por la enzima epóxido hidrolasa y generan BaP-9-diol, BaP-4,5-diol y BaP-7,8-diol (BPDE)

los cuales son muy carcinogénicos y producen fragmentación del ADN, aductos con el N² de la desoxiguanosina y con la guanina (Briedé et al., 2004; Xue y Warshawsky, 2005; Shimada y Guengerich, 2006). Adicionalmente, durante las reacciones de oxidación electrónica, el B(a)P produce quinonas como BaP 6,12-6 y 3,6-B(a)P dionas que a través del ciclo redox con sus respectivos epóxidos diol inducen la producción de EROs, especialmente los radicales hidroxilo (OH[•]) tienen la capacidad de oxidar a la guanina formando el aducto 8-OHdG (Briedé et al., 2004; Xue y Warshawsky, 2005; Ruan et al., 2007).

Los metabolitos del B(b)F que se han identificado *in vitro* e *in vivo*, son el trans-9,10-dihidro-5,9,10, trihidroxibenzo(b)fluoranteno (5-OH-B(b)F-9,10-diol), el trans-9,10-dihidro-6,9,10, trihidroxibenzo(b)fluoranteno (6-OH-B(b)F-9,10-diol) y el trans-9,10-dihidro-anti-11,12-epoxi-5-hidroxi-9,10,11,12-tetrahidro-B(b)F-desoxiguanosina este último como el principal aducto ADN-B(b)F en piel de ratón (Geddie et al., 1987; Weyand et al., 1993; Baer-Dubowska, 1999), en pulmón y en hepatocitos de rata (Ross et al., 1992; Mass et al., 1996; Topinka et al., 1998).

Para el DB(a,h)A, el metabolito 3,4,10,11-bis-dihidrodiol-1,2-epóxido es el principal iniciador de tumores (Buening et al., 1979; Binková y Sram, 2004; Švihálková-Šindlerová et al., 2007) y formador de aductos de ADN en la piel de ratón (Lecoq et al., 1992; Carmichael et al., 1993; Baer-Dubowska, 1999; Kleiner et al., 2004).

Los principales metabolitos del B(ghi)P son el 3,4-epoxi-3,4-dihidro-B(ghi)P (3,4-oxido) y 3,4,11,12-bisepoxi-3,4,11,12-tetrahidro-B(ghi)P (3,4,11,12-bis oxido), el primer metabolito está involucrado en la actividad mutagénica y en la inducción de aductos de ADN en timo de ternera (Platt y Grupe, 2005; Platt et al., 2008).

Los resultados de los tratamientos con HAPs+S9 muestran que la mezcla enzimática S9 (sistema de activación metabólica exógena) aumentó la concentración de metabolitos reactivos capaces de unirse covalentemente al ADN induciendo su fragmentación, como se reveló por el incremento significativo en el promedio de la frecuencia de cometas y en la longitud de la cauda. Similarmente, el aumento en la producción de EROs ocasionó mayores niveles del aducto 8-OHdG en los tratamientos HAPs+S9 que en HAPs-S9 y el testigo (0.5 % DMSO+S9). La fragmentación del ADN detectada por el ensayo cometa y el nivel de aductos 8-OHdG mostraron una relación de concentración-efecto. Comparando el daño al ADN de los HAPs+S9, se observa que el B(b)F causó mayor incremento en el nivel del aducto 8-OHdG y en la fragmentación del ADN que B(ghi)P, DB(a,h)A y el testigo (0.5 % DMSO+S9). El B(b)F y el B(a)P aumentaron similarmente el nivel del aducto 8-OHdG y la fragmentación del ADN comparado con el testigo. Quizás durante el metabolismo *in vitro* del B(b)F y B(a)P se produjo la misma concentración de intermediarios electrofílicos y de EROs, pero mayor concentración que con el DB(a,h)A y B(ghi)P. Las diferencias metabólicas de la mezcla enzimática S9 para cada HAP, revela la acción genotóxica de los HAPs individuales en linfocitos periféricos humanos *in vitro*, así como la inducción diferencial del daño oxidante al ADN, que depende de la estructura química y de la concentración para producir diferencialmente intermediarios metabólicos (epóxidos diol) y EROs (radicales libres), capaces de fragmentar el genoma y de oxidar a la guanina para producir rompimientos en la cadena y los aductos 8-OHdG, respectivamente.

Diversas investigaciones han mostrado que el ensayo de ELISA tiene especificidad limitada debido a que el anticuerpo puede reaccionar cruzadamente con

otros aductos del ADN (Yin et al., 1995; Cooke et al., 2006; Evans et al., 2008), sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los valores reportados para los niveles de 8-OHdG en ADN *in vitro* (Yin et al., 1995; Breton et al., 2003; Chiou et al., 2003). Además, en el presente estudio los valores basales e inducidos de 8-OHdG detectados en el ADN de los linfocitos periféricos humanos mediante ELISA de tres ensayos independientes mostraron que esta metodología es sensible y reproducible para analizar el daño oxidante en el ADN de las células humanas expuestas *in vitro* a contaminantes ambientales como los HAPs, asegurando que hay gran afinidad y especificidad de unión del anticuerpo 8-OHdG del kit utilizado (Cayman Chemical) con la base oxidada.

Los resultados de este estudio muestran que la acción genotóxica de los HAPs individuales en linfocitos periféricos humanos depende de la concentración de los compuestos químicos y de la tasa metabólica de la mezcla S9 *in vitro* para producir diferencialmente intermediarios genotóxicos y EROs que dañan el ADN de las células humanas. Estos resultados están de acuerdo con diversos estudios genotóxicos con B(a)P *in vivo* e *in vitro*, los cuales evidencian que induce fragmentación del ADN en células pulmonares humanas (Park et al., 2009), en cultivos de hepatocitos humanos HepG2 (Tarantini et al., 2009), en células endoteliales de vena de cordón umbilical (Annas et al., 2000) y en linfocitos de personas ocupacionalmente expuestas a este HAP (Cebulska-Wasilewska et al., 2005). También se ha demostrado que el BaP produce aductos de ADN en linfocitos periféricos humanos *in vitro* (Wiencke et al., 1990; Zanesi et al., 1994) e *in vivo* (Grzybowska et al., 1993), en células A549 de carcinoma de epitelio pulmonar por ³²P-postmarcaje (Dreij et al., 2005), en cultivos de hepatocitos humanos HepG2 por HPLC/MS-MS (Tarantini et al., 2009), en ADN de timo de

ternera y en células pulmonares por radioinmunoensayo (Cheng et al., 2007) y por HPLC-ES-MS/MS (Beland et al., 2005). También se ha detectado la inducción del aducto ADN-B(a)P *in vivo* por medio de ELISA (Harris et al., 1985; Takaishi et al., 2009) y con ³²P-postmarcaje-HPLC en epidermis de ratón (Marston et al., 2001); en células epiteliales WB-F344 de hígado de rata (Topinka et al., 2008) y en fibroblastos de pulmón humano (Binková y Srám, 2004). Además, se ha demostrado que el DB(a,h)A, B(b)F y B(ghi)P inducen rompimientos de la cadena de ADN en fibroblastos V79 de pulmón de criceto dorado por medio del ensayo cometa alcalino (Platt et al., 2008b) y aductos de ADN en timo de ternera (Platt et al., 2008a), en hígado (Staal et al., 2007), en cultivo de hepatocitos de rata y en células V79NH y NCI-H322 (Topinka et al., 1998), en fibroblastos de pulmón embrionario humano (HEL) y en piel de ratón con ³²P-postmarcaje-HPLC (Weyand et al., 1993; Singh et al., 2010).

Los resultados apoyan que posiblemente las altas concentraciones de HAPs identificados y asociados con el aire de la Ciudad de México están relacionadas con el aumento en la incidencia de enfermedades en la población. En el presente estudio se evaluó la genotoxicidad *in vitro* del DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F y B(a)P en linfocitos periféricos humanos a concentraciones más altas (20-320 µM) que las detectadas ambientalmente, por lo tanto, no es posible compararlas con las concentraciones de los HAPs detectadas en el aire urbano de la Ciudad de México (B(b)F a 2.07 ng/cm³, DB(a,h)A a 0.59 ng/cm³, B(ghi)P a 1.46 ng/cm³, B(a)P a 0.74 ng/cm³, indeno (1,2,3-cd)pireno a 1.00 ng/cm³, fenantreno a 1.66 ng/cm³), además estos HAPs están combinados con el material particulado del aire urbano formando mezclas complejas (Calderón-Segura et al., 2004; Gutiérrez-Castillo et al., 2006; Villalobos-Pietrini et al., 2006; Amador-Muñoz et al., 2001, 2008; Thornhill et al., 2008), quizás la exposición

constante al material particulado podría producir la acumulación de lesiones en el ADN que si no son reparadas puede iniciarse un proceso de carcinogénesis y eventualmente el desarrollo de tumores (Burdick et al., 2003; Briedé et al., 2004; Marczyński et al., 2009).

Las implicaciones y consecuencias adversas para la salud dependen de varios factores como la susceptibilidad individual, la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, los niveles antioxidantes endógenos y el estilo de vida (fumar, consumo de alcohol, tipo de dieta, entre otros) (Wiseman et al., 1995; Hsiao et al., 2000). Finalmente, esta investigación con el uso de dos biomarcadores muestra que son herramientas útiles y adecuadas para conocer el riesgo a desarrollar enfermedades en estados iniciales incluyendo el cáncer.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados se concluye lo siguiente:

- 1) El B(a,h)A, el B(ghi)P y el B(b)F sin la mezcla enzimática S9 producen daño al ADN de los linfocitos periféricos humanos *in vitro*, evidenciado por el aumento en la frecuencia de cometas y la longitud de la cauda comparado con el testigo negativo (DMSO-S9), pero su acción genotóxica se incrementa significativamente con la activación metabólica (mezcla enzimática S9).
- 2) El B(a,h)A, el B(ghi)P y el B(b)F sin la S9 causan daño oxidante al ADN de los linfocitos periféricos humanos *in vitro*, mostrado por el incremento en los niveles del aducto 8-OH-dG comparado con el testigo negativo (DMSO-S9), pero en presencia del metabolismo animal el estrés oxidante se incrementa significativamente comparado con el testigo (DMSO+S9).
- 3) El ensayo de ELISA, por primera vez estandarizado y aplicado en nuestro país, evidencia que es un método rápido y adecuado para evaluar daño oxidante en el ADN en las células humanas expuestas *in vitro* a HAPs mediante la detección de los niveles del aducto 8-OHdG, que muestra ser un buen biomarcador molecular de estrés oxidante inducido por contaminantes ambientales.
- 4) Los dos biomarcadores genotóxicos evaluados en este estudio muestran una relación de concentración-efecto.
- 5) Al comparar la actividad genotóxica de los tres HAPs, con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica animal, se observó que el B(b)F produce mayor daño al ADN en linfocitos periféricos humanos *in vitro* que el B(ghi)P y el B(a,h)A. El B(b)F y el B(a)P presentan similar actividad genotóxica en los linfocitos periféricos humanos *in vitro*.

-
-
- 6) El B(a)P, es un testigo positivo adecuado para detectar daño al ADN de los linfocitos periféricos humanos *in vitro*.
 - 7) Los resultados del presente estudio confirman que el ensayo cometa alcalino es una prueba con gran sensibilidad y reproducibilidad para evaluar agentes genotóxicos ambientales.
 - 8) Se demuestra el efecto genotóxico de los tres HAPs más abundantes y asociados en la mezcla respirable de la Ciudad de México y apoya que representan riesgo potencial para la salud humana, animal y vegetal.

10. TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Daño al ADN en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* por 24 h a diferentes concentraciones de DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F y B(a)P (testigo positivo) ^a

| Concentración (μ M) | % Frecuencia de cometas | | Longitud de la cauda (μ m) | |
|--|-------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------|
| | $\bar{X} \pm EE$ | | $\bar{X} \pm EE$ | |
| | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 |
| Testigo Negativo (0.5 % DMSO) | 4.5 \pm 0.5 | 5.0 \pm 1.0 | 3.38 \pm 1.2 | 6.42 \pm 1.8 |
| Testigo Positivo (Benzo(a)pireno 80 μ M) | 27.8 \pm 10.0* | 100 \pm 0.0* | 20.63 \pm 2.6** | 117.19 \pm 2.4** |
| Dibenzo(a,h)antraceno | | | | |
| 20 | 4.5 \pm 0.5 | 6.3 \pm 1.0 | 3.50 \pm 1.2 | 6.23 \pm 1.8 |
| 40 | 7.0 \pm 0.8* | 12.5 \pm 0.6* | 7.37 \pm 1.9** | 12.95 \pm 2.6** |
| 80 | 8.7 \pm 0.6* | 22.3 \pm 2.0* | 8.34 \pm 2.0** | 22.54 \pm 3.2** |
| 160 | 15.4 \pm 1.4* | 45.6 \pm 4.2* | 18.55 \pm 3.2** | 57.83 \pm 4.6** |
| 320 | 19.3 \pm 1.4* | 84.3 \pm 1.2* | 22.12 \pm 3.4** | 89.33 \pm 3.3** |
| Benzo(ghi)perileno | | | | |
| 20 | 8.5 \pm 0.5* | 27.8 \pm 4.4* | 8.99 \pm 2.1** | 20.72 \pm 2.5** |
| 40 | 10.6 \pm 2.3* | 39.0 \pm 9.7* | 10.68 \pm 2.3** | 37.10 \pm 3.8** |
| 80 | 17.5 \pm 0.8* | 53.7 \pm 1.5* | 15.54 \pm 2.6** | 55.48 \pm 4.2** |
| 160 | 17.5 \pm 2.1* | 77.5 \pm 7.5* | 23.32 \pm 3.8** | 103.20 \pm 4.2** |
| 240 | 23.7 \pm 6.5* | 98.7 \pm 0.6* | 30.18 \pm 3.6** | 136.50 \pm 2.1** |
| Benzo(b)fluoranteno | | | | |
| 20 | 10.4 \pm 1.7* | 37.8 \pm 8.2* | 10.19 \pm 2.2** | 37.05 \pm 3.6** |
| 30 | 8.8 \pm 2.7* | 41.6 \pm 3.6* | 10.28 \pm 2.4** | 53.57 \pm 4.6** |
| 40 | 8.3 \pm 3.4* | 46.5 \pm 1.7* | 17.73 \pm 1.9** | 63.08 \pm 4.3** |
| 60 | 16.9 \pm 1.7* | 70.3 \pm 0.5* | 19.86 \pm 3.2** | 92.71 \pm 4.4** |
| 80 | 24.5 \pm 0.9* | 100 \pm 0.0* | 31.02 \pm 3.9** | 113.87 \pm 1.8** |

^a Promedio de 3 experimentos n =300 células

* Diferencias significativas para F= 10.47 p<0.0001 prueba estadística de Newman-Keuls

** Diferencias significativas para F= 99.97 p<0.0001 prueba estadística de Newman-Keuls

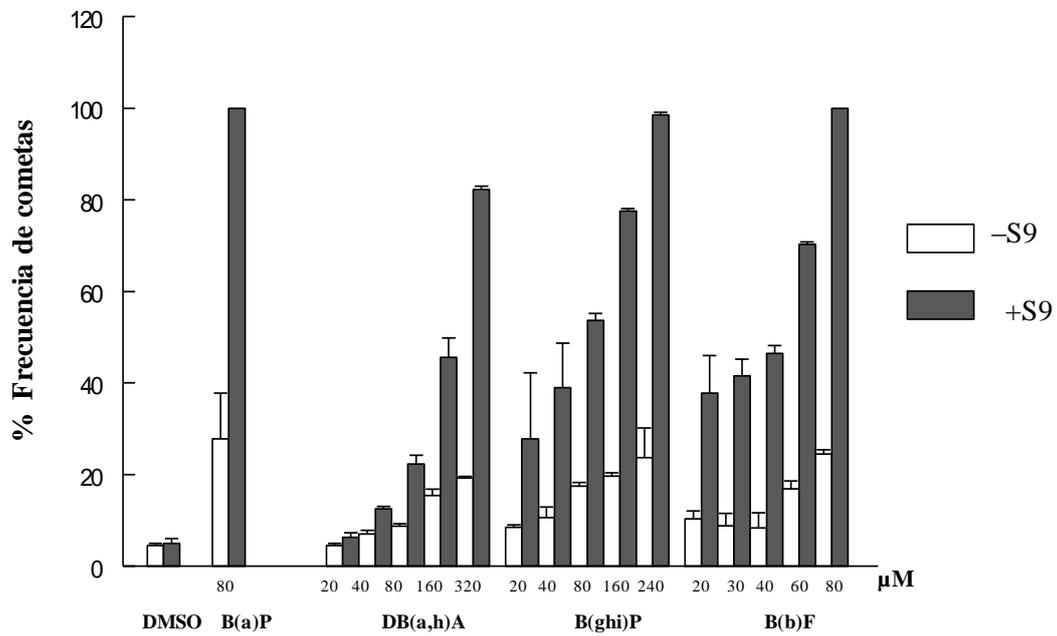


Figura 7. Promedios de la frecuencia de cometas (daño al ADN) de los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F y B(a)P (testigo positivo), por 24h con y sin activación metabólica animal

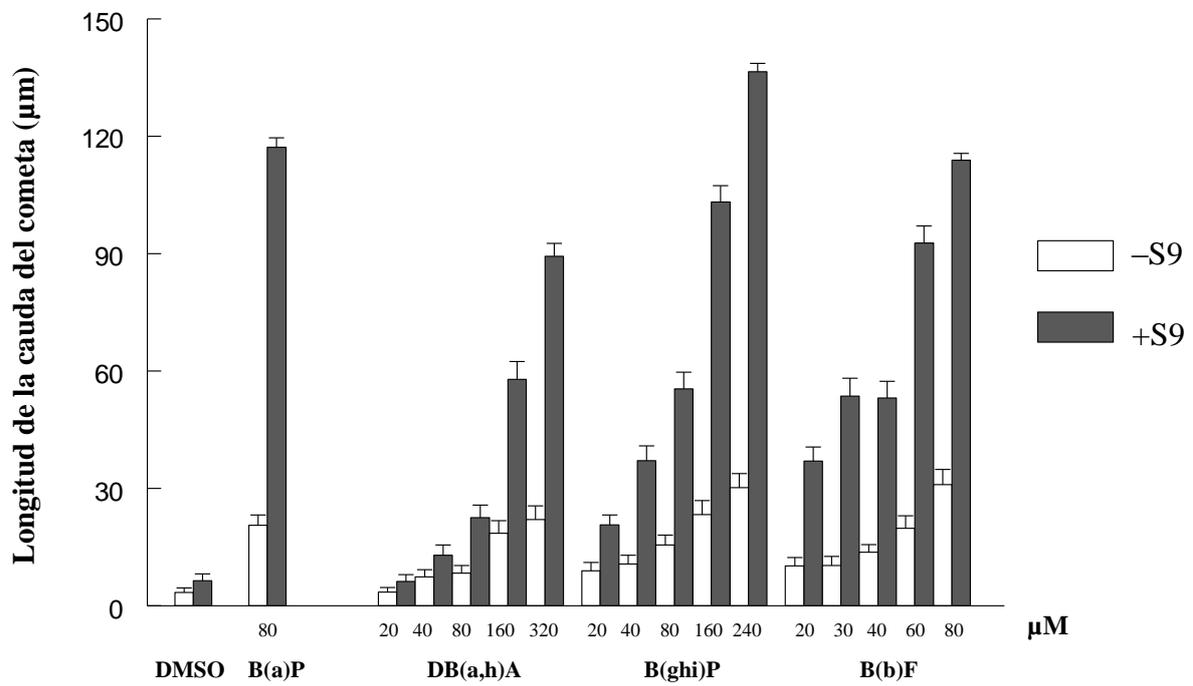


Figura 8. Promedios de la longitud de la cauda del cometa de los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F y B(a)P (testigo positivo), por 24h con y sin activación metabólica animal

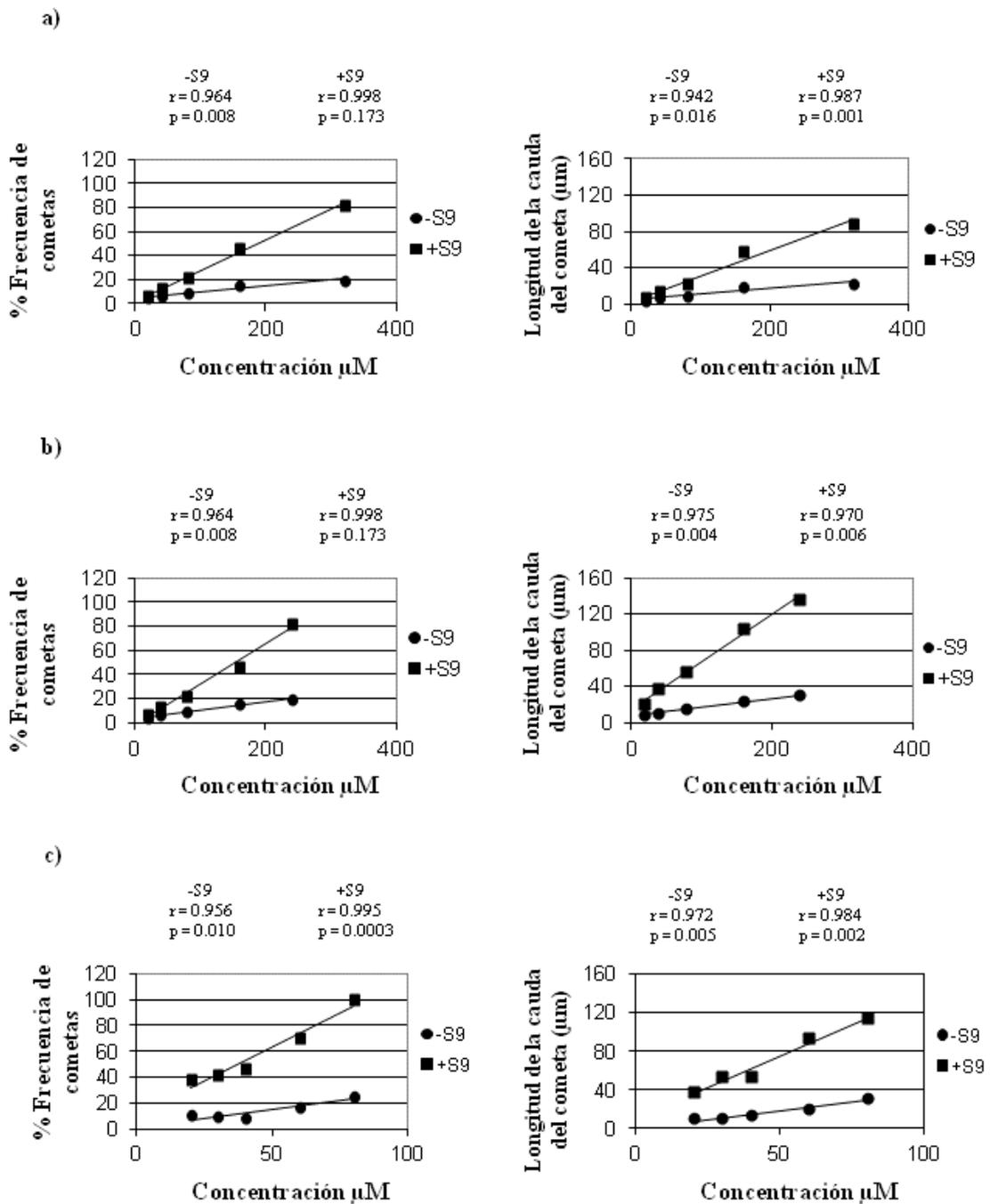


Figura 9. Análisis de regresión lineal de los promedios de la frecuencia de cometas (daño al ADN) y longitud de la cauda del cometa en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a tres HAPs, a) DB(a,h)A, b) B(ghi)P y c) B(b)F por 24 h con y sin activación metabólica animal

Tabla II. Niveles del aducto 8-OH-dG en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* por 24 h a diferentes concentraciones de DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F

| 100 µg de ADN | Niveles del aducto 8-OH-dG (ng/µg de ADN) $\bar{X} \pm EE$ | |
|--|--|---------------|
| | - S9 | + S9 |
| Testigo Negativo (0.05 % DMSO) | 1.10 ± 0.02 | 1.09 ± 0.05 |
| Testigo Positivo (Benzo(a)pireno 80 µM) | 2.47 ± 0.05 | 6.57 ± 0.06* |
| Dibenzo(a,h)antraceno | | |
| 20 | 1.16 ± 0.02 | 1.26 ± 0.01 |
| 40 | 1.21 ± 0.02 | 1.43 ± 0.01 |
| 80 | 1.34 ± 0.02* | 1.99 ± 0.04** |
| 160 | 1.55 ± 0.04* | 3.09 ± 0.10** |
| 320 | 1.75 ± 0.05* | 3.57 ± 0.10** |
| Benzo(ghi)perileno | | |
| 20 | 1.20 ± 0.01 | 1.32 ± 0.03 |
| 40 | 1.34 ± 0.03* | 2.27 ± 0.05** |
| 80 | 1.52 ± 0.03* | 2.62 ± 0.06** |
| 160 | 1.72 ± 0.03* | 3.35 ± 0.04** |
| 240 | 1.97 ± 0.03* | 4.47 ± 0.40** |
| Benzo(b)fluoranteno | | |
| 20 | 1.39 ± 0.03* | 2.48 ± 0.04** |
| 30 | 1.53 ± 0.02* | 3.11 ± 0.04** |
| 40 | 1.70 ± 0.04* | 4.75 ± 0.12** |
| 60 | 1.94 ± 0.04* | 5.39 ± 0.08** |
| 80 | 2.27 ± 0.07* | 6.28 ± 0.14** |

^a Promedio de 3 experimentos

* Diferencias significativas para $F= 117.10$ $p<0.001$ prueba estadística de Newman-Keuls

** Diferencias significativas para $F= 111.68$ $p<0.001$ prueba estadística de Newman-Keuls

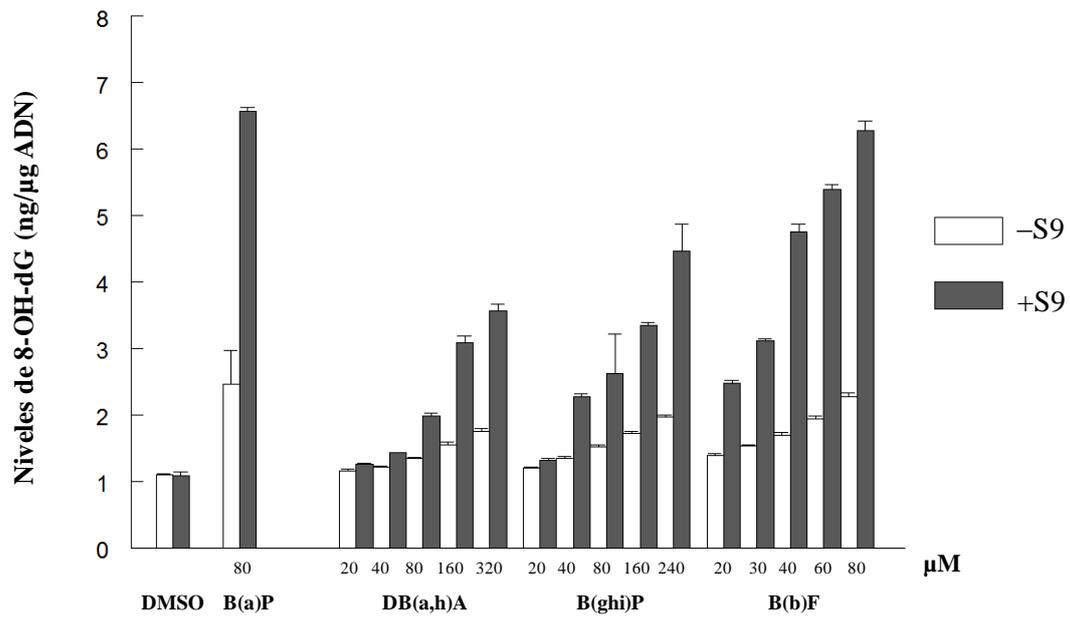


Figura 10. Promedios de los niveles del aducto 8-OH-dG en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F y B(a)P (testigo positivo), por 24 h con y sin activación metabólica animal

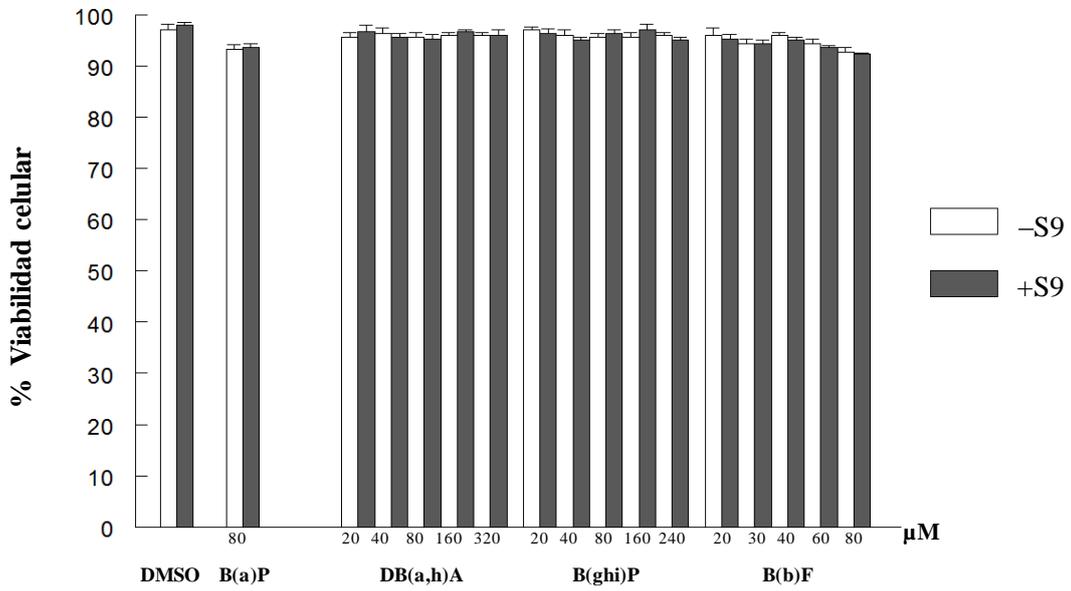


Figura 12. Promedio de viabilidad de los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a DB(a,h)A, B(ghi)P y B(b)F por 24 h con y sin activación metabólica animal

11. REFERENCIAS

- Albertini, R.J., Nicklas, J.A., O'Neill, J.P. 1996. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* 104: 503-510.
- Altman, S.A., Randers, L., Rao, G. 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol. Prog.* 9: 671-674.
- Amador-Muñoz, O., Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini, R., Munive-Colín, Z., Ortíz-Marttelo, R., Díaz-González, G., Bravo-Cabrera, J.L., Gómez-Arroyo, S. 2001. Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17: 193-204.
- Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Aragón-Piña, A., Tran-Tin, C., Morrison, P., Marriott-Philip, J. 2008. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons based on comprehensive two-dimensional gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1201: 161-168.
- Anderson, D. 1998. Comet assay responses of carcinogen exposure. *Mutagenesis* 13: 539-555.
- Annas, A., Brittebo, E., Hellman, B. 2000. Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat. Res.* 471: 145-155.
- Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H., Kasai, H. 1997. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 18: 1763-1766.
- Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A. Browne, M.A. 1995. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10: 85-90.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene,

benzo(g,i,h)perylene, benzo(k)fluoranthene, chrysene, dibenzo(a,h)anthracene, fluoranthene, fluorene, indeno(1,2,3-c,d)pyrene, phenanthrene, pyrene.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1993. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Department of health and human services, Public Health Service.
- Avogbe, P.H., Ayi-Fanou, L., Autrup, H., Loft, S., Fayomi, B., Sanni, A., Vinzents, P., Moller, P. 2005. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 26: 613-20.
- Baird, W. M., Hooven, L. A., Mahadevan, B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mut.* 45: 106-114.
- Baer-Dubowska, W. 1999. Alternative pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons activation: the formation of polar DNA adducts. *Acta Biochim. Pol.* 46: 263-274.
- Baltaci, V., Kayikcioglu, F., Alpas, I., Zeyneloglu, H. Haberal, A. 2002. Sister chromatid exchange rate and alkaline comet assay scores in patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 84: 62-66.
- Beland, F.A., Churchwell, M.I. Von Tungel, L.S., Chen, S., Fu, P.P., Culp, S.J., Schoket, B., Györfy, E., Minárovits, J., Poirier, M.C., Bowman, E.D., Weston, A., Doerge, D.R. 2005. High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo(a)pyrene-DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 1306-1315.
- Bernard, A. y Lauwerys, R. 1986. Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J. Occup. Med.* 28: 559-562.
- Bialkowski, K., Kowara, R., Windorbska, W., Olinski, R. 1996. 8-oxo-2'-deoxyguanosine level in lymphocytes DNA of cancer patients undergoing radiotherapy. *Cancer Lett.* 99: 93-97.
- Binková, B., Lewtas, J., Misková, I., Leníček, J., Srám, R. 1995. DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogenesis* 16: 1037-1046.
- Binková, B. y Srám, R.J. 2004. The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat. Res.* 547: 109-121.

-
-
- Binková, B., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Milcova, A., Tulupova, E., Farmer, P.B., Sram, R.J. 2007. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat. Res.* 620: 49-61.
- Borgen, A., Darvey, H., Castagnoli, N., Crocker, T.T., Rasmussen, R.E., Wang, I.Y. 1973. Metabolic conversion of benzo(a)pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolite to deoxyribonucleic acid. *J. Med. Chem.* 16: 502-506.
- Bostrom, C., Gerde, P., Hanberg, A., Jerntrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Tornqvist, M., Victorin, K., Westernholm, R. 2002. Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 110: 451-489.
- Bowden, R., Buckwalter, M., McBride, J., Johnson, D., Murray, B., O'Neill, K. 2003. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. *Mutat. Res.* 537: 1-9.
- Breton, J., Sichel, F., Bianchini, F., Prevost, V. 2003. Measurement of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by a commercially available ELISA test: comparison with HPLC/electrochemical detection in calf thymus DNA and determination in human serum. *Anal. Lett.* 36: 123-134.
- Briedé, J.J., Godschalk, R.W., Emans, M.T.G., De Kok, T.M.C., Van Aagen, E., Van Maanen, J.M.S., Van Schooten, F., Kleinjans, J.C.S. 2004. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo(a)pyrene metabolism. *Free Radical Res.* 38: 995-1002.
- Brookes, P. y Lawley, P. D. 1964. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 202: 781-784.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. 1989. *The Merck Index*. Merck & Co., Rahway, NJ, p. 172.
- Buening, M.K., Levin, W., Wood, A.W., Chang, R.L., Yagi, H., Kane, J.M., Jenina, D.M., Conney, A.H. 1979. Tumorigenicity of the dihydrodiols of dibenzo(a,h)anthracene on mouse skin and in newborn mice. *Cancer Res.* 39: 1310-1314.
-
-

-
-
- Burchiel, S.W., y Luster, M. 2001. Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clin. Immunol.* 98: 2-10.
- Burdick, A.D., Davis, J.W., Liu, K.J., Hudson, L.G., Shi, H., Monske, M.L., Burchiel, S.W. 2003. Benzo(a)pyrene quinines increase cell proliferation, generate reactive oxygen species and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63: 7825-7833.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L. 2008. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc. Chem. Res.* 41: 1075-1083.
- Calderón-Garcidueñas, L., Osnaya, N., Rodríguez, A.A., Villareal, C.A. 1997. DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution. *Environ. Mol. Mutagen.* 30: 11-20.
- Calderón-Garcidueñas, L., Wen, W.L., Jing, Z.Y., Rodríguez, A.A., Osnaya, N., Villareal, C.A., Santella, R.M. 1999. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* 107: 469-474.
- Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Butterworth, F.M., Amador-Muñoz, O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytogenetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat. Res.* 558: 7-17.
- Carmichael, P.L., Platt, K.L., She, M.N., Lecog, S., Oesch, F., Phillips, D.H., Grover, P.L. 1993. Evidence for the involvement of a bis-diol-epoxide in the metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene to DNA-binding species in mouse skin. *Cancer Res.* 53: 944-948.
- Castaño-Vinyals, G., D'Errico, A., Malats, N., Kogevinas, M. 2004. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup. Environ. Med.* 61: 4-12.
- Cattley, R.C. y Glover, S.E. 1993. Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization. *Carcinogenesis* 14: 2495-2499.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Bavazzano, P., Cassinelli, C., Frattini, A., Perniconi, B., Di Francesco, A., Ciervo, A., Rondinone, B., Iavicoli, S. 2006. Sister chromatid
-
-

-
-
- exchange and oxidative DNA damage in paving workers exposed to PAHs. *Ann. Occup. Hyg.* 50: 211-218.
- Cebulska- Wwasilewska, A., Wiechec, A., Panek, A., Binková, B., Sram, R.J., Farmer, P.B. 2005. Influence of environmental exposure to PAHs on the susceptibility of lymphocytes to DNA-damage induction and on their repair capacity. *Mutat. Res.* 588: 73-81.
- Cheng, Y.W., Tsai, H.J., Wu, J.Y., Hsu, Y.F., Chen, C.Y., Hao, N.J., Lee, H. 2007. A possible role for dihydrodiol dehydrogenase in the formation of benzo[a]pyrene-DNA adducts in lung cancer cell and tumor tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 14-21.
- Chiou, C.C., Chang, P.Y., Chan, E.C., Wu, T.L., Tsao, K.C., Wu, T.W.J. 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin. Chim. Acta* 334: 87-94.
- Choi, H., Jedrychowski, W., Spengler, J., Camann, D.E., Whyatt, R.M., Rauh, V. 2006. International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. *Environ. Health Perspect.* 114: 1744-1750.
- Cohen, A.J. 2000. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ. Health Perspect.* 108: 743-750.
- Colburn, K.A. y Johnson, P.R.S. 2003. Air pollution concerns not changed by S-PLUS Flaw. *Science* 299: 665-666.
- Collins, A. 2002. The comet assay, principles, applications and limitations. In: *Methods in molecular biology. In situ detection of DNA damage: Methods and protocols.* Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 203: 163-177.
- Cooke, M.S., Singh, R., Hall, G.K., Mistry, V., Duarte, T.L., Farmer, P., Evans, M.D. 2006. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine. *Free Rad. Biol. Med.* 41: 1829-1836.
- Daniel, P.M., Pratt, O.E., Prichard, M.L. 1967. Metabolism of labeled carcinogenic hydrocarbons in rats. *Nature* 215: 1142-1146.
- Dipple, A. 1995. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16: 437-441.
-
-

-
-
- Dreij, K., Seidel, A., Jernström, B. 2005. Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo(a,l)pyrene and benzo(a)pyrene in human cells. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 655-664.
- Eiguren-Fernandez, A., Miguel, A.H., Froines, J.R., Thurairatnam, S., Avol, E.L. 2004. Seasonal and spatial variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vapor-phase and PM_{2.5} in Southern California urban and rural communities. *Aerosol Sci. Technol.* 38: 447-455.
- Evans, M., Dizdaroglu, M., Cooke, M. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567: 1-61.
- Evans, M.D., Singh, R., Mistry, V., Sandhu, K., Farmer, P., Cooke M.S. 2008. Analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-purine-2'-deoxyribonucleosides by LC-MS/MS and improved ELISA. *Free Rad. Res.* 42: 831-840.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. O'Neill, K.L. 1995. The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.
- Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R., Mann, M., Mersch-Sundermann, V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 566: 209-229.
- Fiala, E.S., Conaway, C., Mathis, J.F. 1989. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49: 5518-5522.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Wong, P.K., Altmiller, D.H., Rickard, R.C. 1986. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine. Sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic. Res. Commun.* 1: 163-172.
- Fortoul, T.I., Valverde, M., López, M.C., Avila-Costa, M.R., Avila-Casado, M.C., Mussali, G.P., González, V.A., Rojas, E., Ostrosky, S.P. 2004. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environ. Res.* 94: 243-248.
- Furukawa, M., Nishimura, M., Ogino, D., Chiba, R., Ikai, I., Ueda, N., Naito, S., Kuribayashi, S., Moustafa, M.A., Uchida, T., Sawada, H., Kamataki, T., Funae, Y., Fukumoto, M. 2004. Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci.* 95: 520-529.
- Galván, N., Teske, D.E., Zhou, G., Moorthy, B., MacWilliams, P.S., Czuprynski, C.J., Jefcoate, C.R. 2005. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in liver and lung by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene do not affect distribution of
-
-

-
-
- polycyclic hydrocarbons to target tissue: role of AhR and CYP1B1 in bone marrow cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202: 244-257.
- Geddie, J.E., Amin, S., Huie, K., Hecht, S.S. 1987. Formation and tumorigenicity of benzo[b]fluoranthene metabolites in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 8: 1579-1584.
- Gil, F. y Pla, A. 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21: 245-255.
- Glen, A.C.A. 1996. Measurement of DNA and RNA in human peripheral blood lymphocytes. *Chem. Clin.* 13: 299-313.
- Glück, U. y Gebbers, J.O. 2000. The comet assay of nasal epithelia: measurements of DNAdamage for the assessment of genotoxic air pollution. *Laryngoscope* 110: 123-125.
- Godschalk, R.W.L, Vermeer, T.M., Kriek, E., Floot, B., Schilderman, P.A., Moonen, E.J.C., Kleinjans, J.C.S., Van Schooten, F.J. 1997. Comparison of ³²P-postlabeling and HPLC-FD analysis of DNA adducts in rats acutely exposed to benzo(a)pyrene. *Chem. Biol. Interact.* 104:41-54.
- Goldman, R. y Shields, P. 2003. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status. *J. Nutr.* 133: 965-973.
- Grandjean, P., Brown, S.S., Reavey, P., Young, D.S. 1994. Biomarkers of chemical exposure: State of the art. *Clin. Chem.* 40: 1360-1362.
- Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H., Astley, S.B. 2002. Biomarkers. *Mol. Aspects Med.* 23: 101-208.
- Grover, P.L. y Sims, P. 1968. Enzyme-catalyzed reactions of polycyclic hydrocarbons with deoxyribonucleic acid and protein in vitro. *Biochem. J.* 110: 159-160.
- Grzybowska, E., Hemminki, K., Szeliga, J., Chorazy, M. 1993. Seasonal variation of aromatic DNA adducts in human lymphocytes and granulocytes. *Carcinogenesis* 14: 2523-2526.
- Gupta, R.C., Reddy, M.V., Randerath K. 1982. ³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 3: 1081-1092.
- Gupta, R.C. 1985. Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.* 45: 5656-5662.
-
-

-
-
- Gupta, R.C., Earley, K., Sharma, S. 1998. Use of human peripheral blood lymphocytes to measure DNA binding capacity of chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3513-3517.
- Gutiérrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrián-García, M.E., Vizcaya-Ruíz, A., Sordo-Cedeño, M., Ostrosky-Wegman, P. 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 199-211.
- Györfy, E., Anna, L., Kovács, K., Rudnai, P., Shoket, B. 2008. Correlation between biomarkers of exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. *Mutagenesis* 23: 1-18.
- Haghdoost, S., Sjölander, L., Czene, S., Harms-Ringdahl. 2006. The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 620-626.
- Hanaoka, T., Tsugane, S., Yamano, Y., Takahashi, T., Kasai, H., Natori, Y., Watanabe, S. 1993. Quantitative analysis of 8-hydroxyguanine in peripheral blood cells: an application for asbestosis patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65: 215-217.
- Harri, M., Svoboda, P., Mori, T., Mutanen, P., Kasai, H., Savela, K. 2005. Análisis of 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine among workers exposed to diesel particulate exhaust: comparison with urinary metabolites and PAH air monitoring. *Free Radic. Res.* 39: 963-972.
- Harrigan, J.A., McGarrigle, B.P., Sutter, T.R., Olson, J.R. 2006. Tissue specific induction of cytochrome P 450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro* 20: 426-438.
- Harris, C.C., Vahakangas, K., Newmant, M.J., Trivers, G.E., Shamsuddin, A., Sinopoli, N., Mann, D., Wright, W.E. 1985. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6672-6676.
- Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Uchida, K., Nikaido, O., Osawa, T., Hiai, H., Imamura, S., Toyokuni, S. 1997. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J. Invest. Dermatol.* 107: 733-737.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Ames, B.N. 1999. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* 300: 156-166.
-
-

-
- Hemminki, K. 1983. Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. *Arch. Toxicol.* 52: 249-285.
- Hemminki, K., Grzybowska, E., Chorazy, M., Twardowska-Sauchka, K., Sroczynski, J.W., Putman, K.L., Randerath, K., Phillips, D.H., Hewer, A. 1990. Aromatic DNA adducts in white blood cells of coke workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 62: 467-470.
- Hemminki, K., Dickey, C., Karlsson, S., Bell, D., Hsu, Y., Tsai, W.Y. 1997. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis* 18: 345-350.
- Hsiao, W.L., Mo, Z.Y., Fang, M., Shi, X.M., and Wang, F. 2000. Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the comet assays. *Mutat. Res.* 471: 45-55.
- Huang, J., Svoboda, D., Reardon, J., Sancar, A. 1992. Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 3664-3668.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals for humans. Polynuclear aromatic compounds. Part 1, Chemical, environmental and experimental data, Lyon, France.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1985. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear aromatic compounds, Part 4, Bitumens, coal-tars and derived products, shale-oils and soots. Evaluation of carcinogenic risk of the chemical to man, World Health Organization. Lyon, France.
- Ichinose, T., Yajima, T., Nagashima, M., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Sagai, M. 1997. Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 18: 185-192.
- Inoue, M., Osaki, T., Noguchi, M., Hirohashi, S., Yasumoto, K., Kasai, H. 1998. Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 691-695.
- Jedrychowski, W., Galas, A., Pac, A., Flak, E., Camman, D., Rauh, V., Perera, F. 2005. Prenatal ambient air exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the
-

-
-
- occurrence of respiratory symptoms over the first year of life. *Eur. J. Epidemiol.* 20: 775-782.
- Karlsson, H.L., Nygren, J., Möller, L. 2004. Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat. Res.* 565: 1-10.
- Kasai, H. y Nishimura, S. 1984a. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. *J. Cancer Res.* 75: 565-566.
- Kasai, H. y Nishimura, S. 1984b. DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *J. Cancer Res.* 75: 841-844.
- Kasai, H., Hayami, H., Yamaizumi, Z., Saito, H., Nishimura, S. 1984. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res.* 12: 2127-2136.
- Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* 387: 147-163.
- Kasai, H., Iwamoto-Tanaka, N., Miyamoto, T., Kawanami, K., Kawanami, S., Kido, R., Ikeda, M. 2001. Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 9-15.
- Kennaway, E.L. 1930. Further experiments on cancer-producing substances. *Biochem. J.* 24: 497-504.
- Kim, K.B. y Lee, B.M. 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.* 113: 205-212.
- Kim, J.Y., Mukherjee, S., Ngo, L., Christiani, D.C. 2004. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. *Environ. Health Perspect.* 112: 666-671.
- Kleiner, H.E., Vulimiri, S.V., Hatten, W.B., Reed, M.J., Nebert, D.W., Jefcoate, C.R., DiGiovanni, J., 2004. Role of cytochrome P450 family members in the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mouse epidermis. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1667-1674.
-
-

-
-
- Kriek, E., Rojas, M., Alexandrov, K., Bartsch, H. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutat. Res.* 400: 215-231.
- Kuo, H., Chou, S., Hu, T., Wu, F. 2007. Urinary 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat. Res.* 631: 62-68.
- Lai, C.H., Liou, S.H., Lin, H.C., Shih, T.S., Tsai, P.J., Chen, J.S., Yang, T., Jaakkola, J.J., Strickland, P.T. 2005. Exposure to traffic exhausts and oxidative DNA damage. *Occup. Environ. Med.* 62:216-222.
- Lecoq, S., Pfau, W., Grover, P.L., Phillips, D.H. 1992. HPLC separation of ³²P-postlabelled DNA adducts formed from dibenz[a,h]anthracene in skin. *Chem. Biol. Interactions* 85: 173-185.
- Lee, J.G., Madden, M.C., Reed, W., Adler, K., 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, M., Kwon, J., Chung, M. 2003. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutat. Res.* 541: 9-19.
- Leng, S., Cheng, J., Pan, Z., Huang, C., Niu, Y., Dai, Y., Li, B., He, F., Zheng, Y. 2004. Associations between XRCC1 and ERCC2 polymorphisms and DNA damage in peripheral blood lymphocyte among coke oven workers. *Biomarkers* 9: 395-406.
- Lewtas, J., Walsh, D., Williams, R., Dobiás, L. 1997. Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses. *Mutat. Res.* 378: 51-63.
- Lide, D.R. 1991. CRC handbook of chemistry and physics, 1991-1992. Boca Raton, FL, 3-96.
- Lin, P., Hu, S.W., and Chang, T.H. 2003. Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes. *Toxicol. Sci.* 71: 20-26.
- Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K., Poulsen, H. 1992. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in
-
-

-
- humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13: 2241-2247.
- Loft, S., Poulsen, H., Vistisen, K., Knudson, L. 1999. Increased urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative damage, in urban bus drivers. *Mutat. Res.* 441: 11-19.
- Loft, S., Sovoboda, P., Kasai, H., Tjonneland, A., Vogel, U., Moller, P., Overvad, K., Raaschou, N.O. 2006. Prospective study of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 27: 1245-1250.
- Malins, D.C., Holmes, E.H., Polissar, N.L., Gunesman, S.J. 1993. The etiology of breast cancer. *Cancer* 71: 3036-3043.
- Marczynski, B., Rozynek, P., Helliehausen, H.J., Korn, M., Baur, X. 1997. Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene. *Arch. Toxicol.* 71: 496-500.
- Marczynski, B., Kraus, T., Rosynek, P., Raithel, H.J., Baur, X. 2000. Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in DNA of workers highly exposed to asbestos and their clinical data, occupational and non-occupational confounding factors, and cancer. *Mutat. Res.* 468: 203-212.
- Marczynski, B., Preuss, R., Mensing, T., Angerer, J., Seidel, A., El Mourabit, A., Wilhelm, M., Brüning, T. 2005. Genotoxic risk assessment in white blood cells of occupationally exposed workers before and after alteration of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) profile in the production material: comparison with PAH air and urinary metabolite levels. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78: 97-108.
- Marczynski, B., Pesch, B., Wilhelm, M., Rossbach, B., Preuss, R., Hahn, J., Rabstein, S., Raulf, H.M., Seidel, A., Rihs, H.P., Adams, A., Scherenberg, M., Erkes, A., Engelhardt, B., Straif, K., Udo, K. H., Angerer, J., Brunning, T. 2009. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: a nationwide study in Germany. *Arch. Toxicol.* 83: 947-957.
- Marr, L.C., Grogan, L.A., Wohnschimmel, H., Molina, L.T., Molina, M.J. 2004. Vehicle traffic as a source of particulate polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the Mexico City Metropolitan Area. *Environ. Sci. Technol.* 38: 2584-2592.
- Marston, C.P., Pereira, C., Ferguson, J., Fischer, K., Hedstrom, O., Dashwood, W., Baird, W.M. 2001. Effect of a complex environmental mixture from coal tar
-

-
-
- containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 22: 1077-1086.
- Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V., Domingo, J.L. 2008. Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food Chem. Toxicol.* 46: 3163-3171.
- Mass, M.J., Abu-Shakra, A., Roop, B.C., Nelson, G., Galati, A.J., Stoner, G.D., Nesnow, S., Ross, J.A. 1996. Benzo[b]fluoranthene: tumorigenicity in strain A/J mouse lungs, DNA adducts and mutations in the Ki-ras oncogene. *Carcinogenesis* 17: 1701-1704.
- Mastrangelo, G., Fadda, E., Marzia, V. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* 104: 1166-1170.
- McGlynn, A.P., Wasson, G.R., O'Reilly, S. 2003. Detection of replicative integrity in small colonic biopsies using the BrdUrd comet assay. *Br. J. Cancer* 88: 895-901.
- Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M. 2000. Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 10-17.
- Miguel, A.H., Kirchstetter, T.W., Harley, R.A. 1998. On-Road Emissions of Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Black Carbon from Gasoline and Diesel Vehicles. *Environ. Sci. Technol.* 3: 450-455.
- Miller, E.C., y Miller, J.A. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer Res.* 47: 2327-2345.
- Miller, K. P. y Ramos, K. S. 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo(a)pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.* 33: 1-35.
- Miyake, H., Hara, I., Kamidono, S., Eto, H. 2004. Prognostic significance of oxidative DNA damage by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urology* 64: 1057-1061.
- Molina, M.J., Molina, L.T. 2004. Megacities and atmospheric pollution. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 54: 644-680.
- Moller, P. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98: 336-345.
-
-

-
-
- Musarrat, J., Arezina-Wilson, J., Wani, A.A. 1996. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *European J. Cancer* 32: 1209-1214.
- Nagashima, N., Tsuda, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Hirohashi, S., Yokota, J., Kasai, H. 1995. 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Lett.* 90: 157-162.
- Nielsen, P.S., de Pater, N., Okkels, H., Autrup, H. 1996a. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers-effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. *Carcinogenesis* 17:1021-1027.
- Nielsen, P.S., Andreassen, A., Farmer, P.B., Ovrebo, S., Autrup, H. 1996b. Biomonitoring of diesel exhaust-exposed workers. DNA and hemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol. Lett.* 86: 27-37.
- Nilsson, R., Nordlinder, R.C., Tagesson, C., Walles, S., Jarvholm, B.C. 1996. Genotoxic effects in workers exposed to low levels of benzene from gasoline. *Am. J. Indus. Med.* 30: 317-324.
- Okamoto, K., Toyokuni, S., Uchida, K., Ogawa, O., Takenawa, J., Kakehi, Y., Kinoshita, H., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H., Yoshida, O. 1994. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 58: 825-829.
- Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122: 86-94.
- Olive, P.L., Durand, R.E., Le Riche, J., Olivotto, I.A. Jackson, S.M. 1993. Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res.* 53: 733-736.
- Olive, P. 2002. The comet assay, an overview of techniques. In: *Methods in molecular biology. In situ detection of DNA damage: Methods and protocols.* Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 203: 163-177.
- Östling, O. y Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298.
- Paredi, P., Sergei, A., Kharitonov, B., Barnes, P.J. 2002. Analysis of expired air for oxidation products. *Am. J. Resp. Crit. Care Medic.* 166:31-37.
-
-

-
-
- Park, S., Lee, S., Ye, S., Yoon, S., Chung, M., Choi, J. 2006. Benzo(a)pirene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol. Lett.* 167: 27-33.
- Park, J.H., Mangal, D., Frey, A.J., Harvey, R.G., Blair, I.A., Penning T.M. 2009. Aryl-hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J. Biol. Chem.* 284: 29725-29734.
- Patel, P., Bevan, R., Mistry, N., Lunec, J. 2007. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine in human urine. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 552-558.
- Pavanello, S., Favretto D., Brugnone, F., Mastrangelo, G., Dal-Pra, G., Clonfero, E. 1999. HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans. *Carcinogenesis* 20: 431-435.
- Pavanello, S., Pulliero, A., Siwinska, E., Mielzynska, D., Clonfero, E. 2005. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti- B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis* 26: 169-175.
- Pavanello, S., Pulliero, A., Saia, B.O., Clonfero, E. 2006. Determinants of anti-benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct formation in lymphomonocytes of the general population. *Mutat. Res.* 10: 54-63.
- Peluso, M., Merlo, F., Munnia, A., Valerio, F., Perrotta, A., Puntoni, R. 1998. P-postlabeling detection of aromatic adducts in the white blood cell DNA of nonsmoking police officers. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 7: 3-11.
- Perera, F., Brenner, D., Jeffrey, A., Mayer, J., Tang, D., Warburton, D., Young, T.I., Wazneh, L., Latriano, L., Motykiewicz, G. 1992. DNA adducts and related biomarkers in populations exposed to environmental carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 98: 133-137.
- Perera, F., Tang, D., Whyatt, R., Lederman, S.A., Jedrychowski, W. 2005. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from northern Manhattan, The World
-
-

-
- Trade Center area, Poland and China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 709-714.
- Phillips, D.H., Hemminki, K., Alhonen, A., Hewer, A., Grover, P.L. 1988. Monitoring occupational exposure to carcinogens: detection by ^{32}P -postlabelling of aromatic DNA adducts in white blood cells from iron foundry workers. *Mutat. Res.* 204: 531-541.
- Phillips, D. H. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443: 139-147.
- Phillips, D.H., Farmer, P.B., Beland, F.A., Nath, R.G., Poirier, M.C., Reddy, M.V., Turteltaub, K.W. 2000. Methods of DNA adducts determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 222-233.
- Phillips, D.H. 2005. DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutat. Res.* 577: 284-292.
- Pilger, A. y Rudiger, H. 2006. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80: 1-15.
- Platt, K.L. y Grupe, S. 2005. Microsomal biotransformation of benzo[ghi]perylene, a mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon without "classic" bay region. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 700-710.
- Platt, K.L., Grupe, S., Fickler, M. 2008a. The 3,4-oxide is responsible for the DNA binding of benzo[ghi]perylene, a polycyclic aromatic hydrocarbon without a "classic" bay-region. *Chem. Biol. Interact.* 176: 179-87.
- Platt, K.L., Aderhold, S., Kulpe, K., Fickler, M. 2008b. Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions. *Mutat. Res.* 650: 96-103.
- Podmore, I.D., Cooper, D, Evans, M.D, Wood, M., Lunec, J. 2000. Simultaneous measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine by HPLC-MS/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 764-70.
- Poirier, M. 1999. Biomarkers of susceptibility and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in urine and blood cell DNA from US army soldiers exposed to oil well fires in Kuwait in 1991. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 17: 197-208.
- Poirier, M.C. 2004. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat. Rev. Cancer* 4: 630-637.
-

-
-
- Qiu, L., Leng, S., Wang, Z., Dai, Y., Zheng, Y., Wang, Z. 2007. Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16: 1193-1199.
- Randerath, K. y Randerath, E. 1994. ³²P-postlabelling methods for DNA adducts detection: overview and critical evaluation. *Drug Metab. Rev.* 26: 67-85.
- Reddy, M.V., Hemminki, K., Randerath, K. 1991. Postlabeling analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers. *J. Toxicol. Environ. Health* 34: 177-185.
- Repetto, M. 1997. Diagnóstico de la intoxicación. En: *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos, Madrid. 327-333.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A.P., Rutten, A.A., Baan, R.A. 1993. Comparative ³²P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes. *Carcinogenesis* 14: 1945-1950.
- Ross, J.A., Nelson, G.B., Holden, K.L., Kligerman, A.D., Erexon, G.L., Briant, M.F., Earley, K., Beach, A.C., Gupta, R.C., Nesnow, S. 1992. DNA adducts and induction of sister chromatid exchanges in the rat following benzo[b]fluoranthene administration. *Carcinogenesis* 13: 1731-1734.
- Ruan, Q., Gelhaus, S.L., Penning, T.M., Harvey, R.G., Blair, I.A. 2007. Aldo-Keto Reductase- and Cytochrome P450-Dependent Formation of Benzo[a]pyrene-Derived DNA Adducts in Human Bronchoalveolar Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 424-431.
- Sangsuwan, T. y Haghdoost, S. 2008. The nucleotide pool, a target for low-dose γ -ray-induced oxidative stress. *Radiat. Res.* 170: 776-783.
- Santella, R.M., Hemminki, K., Tang, D.L., Paik, M., Oilman, R., Vodickova, L., Dickey, C., Whyati, R., Perera, F.P. 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells and urinary 1- hydroxypyrene in foundry workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2: 59-62.
- Savela, K., Leppälä, S., Hemminki, K. 1989. ³²P-postlabelling of DNA adducts in white blood cells of foundry workers. *Arch. Toxicol.* 13:101-103.
-
-

-
-
- Schins, R.P., Schilderman, P.A., Borm, P.J. 1995. Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67: 153-157.
- Schoket, B., Poirier, M.C., Mayer, G., Török, G., Kolozsi-Ringelmann, A., Bognar, G., Bigbee, W. L., Vincze, I. 1999. Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat. Res.* 445: 193-203.
- Schulte, P.A. 2005. The use of biomarkers in surveillance, medical screening, and intervention. *Mutat. Res.* 592: 155-163.
- Sharma, R.A. y Farmer, P.B. 2004. Biological relevance of adduct to the chemoprevention of cancer. *Clin. Cancer Res.* 10: 4901-4912.
- Shen, J., Deininger, P., Hunt, J., Zhao, H. 2007. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 109: 574-580.
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., Ames, B.N. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86: 9697-9701.
- Shigenaga, M.K. y Ames, B.N. 1991. Assay for 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 10: 211-216.
- Shimada, T. y Guengerich F.P. 2006. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2- and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 288-294.
- Shu-Xin, Qu., Leigh, J., Koelmeyer, H., Stacey, N.H. 1997. DNA adducts in coal miners: association with exposures to diesel engine emissions. *Biomarkers* 2: 95-102.
- Shugart, L.R. 1996. Biomarkers of DNA damage. In: *Ecotoxicity and Human Health*. Lewis Publisher, USA. 123-141.
- Sims, P. y Grover, P.L. 1974. Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 20: 165-274.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E. 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.
- Singh, R. y Farmer, P.B. 2006. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 27: 178-196.
-
-

-
-
- Singh, R., Sram, R.J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T.A., Georgieva, T., Garte, S., Taioli, E., Farmer, P.B. 2007. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat. Res.* 620: 83-92.
- Singh, R., Gaskell, M., Le Pla, R.C., Kaur, B., Azaim-Araghi, A., Roach, J., Koukouves, G., Souliotis, V.L., Kyrtopoulos, S.A., Farmer, P.B. 2006. Detection and quantitation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in mouse liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with ³²P-Postlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 868-878.
- Singh, R., Teichert, F., Seidel, A., Roach, J., Cordell, R., Cheng, M.K., Frank, H., Steward, W.P., Manson, M.M., Farmer, P.B. 2010. Development of a targeted adductomic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 24: 2329-2340.
- Sorensen, M., Autrup, H., Moller, P., Hertel, O., Solvang, J.S., Vinzents, P., Knudsen, L.E., Loft, S. 2003. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.* 544: 255-271.
- Speit, G. y Hartmann, A. 2002. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: *Methods in molecular biology. DNA repair protocols: Eukariotic systems.* Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 113: 203-212.
- Staal, Y.C.M., Van Herwijnen, M.H., Van Schooten, F.J., Van Delft, J.H. 2007. Modulation of gene expression and DNA adduct formation in precision-cut liver slices exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon of different carcinogenic. *Mutagenesis* 22: 55-62.
- Strickland, P.T. y Groopman, J.D. 1995. Biomarkers for assessing environmental exposure to carcinogens in the diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 710-720.
- Sul, D., Oh, E., Im, H., Yang, M., Kim, C.W., Lee, E. 2003. DNA damage in T- and B-lymphocytes and granulocytes in emission inspection and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 538: 109-119.
- Šviháľková-Šindlerová, L., Machala, M., Penciková, K., Marvanová, S., Neca, J., Topinka, J., Sevastyanova, O., Kozubík, A., Vondracek, J. 2007.
-
-

-
-
- Dibenzanthracenes and benzochrysenes elicit both genotoxic and nongenotoxic events in rat liver 'stem-like' cells. *Toxicol.* 232: 147-159.
- Tagesson, C., Källberg, M., Wingren, G. 1996. Urinary malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine as potential markers of oxidative stress in industrial art glass workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 69: 5-13.
- Taioli, E., Sram, R.J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T.A., Garte, S., Farmer, P.B. 2007. Biomarkers of exposure to carcinogenic PAHs and their relationship with environmental factors. *Mutat. Res.* 620: 16–21.
- Takagi, K., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y. 1991. Short-term exposure to peroxisome proliferators, perflurooctanoic acid and perfluorodecanoic acid, causes significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats. *Cancer Lett.* 57: 55-60.
- Takahashi, K., Pan, G., Kasai, H., Hanaoka, T., Feng, Y., Liu, N., Zhang, S., Xu, Z., Tsuda, T., Yamato, H., Higashi, T., Okubo, T. 1997. Relationship between asbestos exposures and 8-hydroxydeoxyguanosine levels in leukocytes DNA of workers at a Chinese asbestos-material plant. *Int. J. Occup. Environ. Health* 3: 111-119.
- Takaishi, M., Sawada, M., Shimada A., Suzuki, J.S., Satoh M., Nagase, H. 2009. Protective role of mellathionein in benzo(a)pyrene-induced DNA damage. *Toxicol. Sci.* 34: 449-458.
- Talaska, G. y Roh, J.H. 1992. ³²P-postlabelling and mass spectrometric methods for analysis of bulky, polyaromatic carcinogen-DNA adducts in humans. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 580: 293-323.
- Tang, D., Li, T.Y., Liu, J.J., Chen, Y.H., Qu, L., Perera, F.P. 2006. PAH–DNA adducts in cord blood and fetal and child development in a Chinese cohort. *Environ. Health Perspect.* 114: 1297–1300.
- Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J.L., Douki, T. 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo(a)pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat. Res.* 671: 67-75.
- Thier, R. y Bolt, H.M. 2001. European aspects of standard setting in occupational hygiene and medicine. *Rev. Environ. Health* 16: 81-83.
- Thornhill, D.A., Foy, B., Herndon, S.C., Onasch, T.B., Wood, E.C., Zavala, M., Molina, L.T., Gaffney, J.S., Marley, N.A., Marr, L.C. 2008. Spatial and temporal
-
-

-
-
- variability of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico City. *Atmos. Chem. Phys.* 8: 3093-3105.
- Tice, R., Andrews, P., Singh, N. 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci.* 53: 291-301.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.
- Topinka, J., Schwarz, L.R., Kiefer, F., Wiebel, F.J., Gajdos, O., Vidová, P., Dobiás, L., Fried, M., Srám R.J., Wolff, T. 1998. DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract. *Mutat. Res.* 419: 91-105.
- Topinka, J., Schwarz, L.R., Wiebel, F.J., Cerná, M., Wolff, T. 2000. Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat. Res.* 21: 83-93.
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondrácer, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Kremár, P., Pencíková K., Machala, M. 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 638: 122-132.
- Tokiwa, H., Sera, N., Nakanishi, Y., Sagai, M. 1999. 8-Hydroxyguanosine formed in human lung tissues and the association with diesel exhaust particles. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 1251-1258.
- Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamato, H., Tanaka, I., Sagai, M., Hirano, H., Nagata, N., Itoh, H., Kasai, H. 1999. Changes in level of 8-hydroxyguanosine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 20: 1573-1576.
- Umemura, T., Sai, K., Takagi, K., Hasegawa, R., Kurokawa, Y. 1990. Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Cancer Lett.* 54: 95-100.
-
-

-
-
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1984. Health effects assessment for benzo(a)pyrene.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1987. Health and environmental effects profile for benzo(ghi)perylene.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1993. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Vaghef, H., Wisen, A.C., Hellman, B. 1996. Demonstration of benzo(a) pyrene-induced DNA damage in mice by alkaline single cell gel electrophoresis: evidence for strand breaks in liver but not in lymphocytes and bone marrow. *Pharmacol. Toxicol.* 78: 37-43.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266: 37-56.
- Valverde, M., López, M.C., López, I., Sánchez, I., Fortoul, T.I., Ostrosky, WP., 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.
- Valverde, M., Ostrosky, WP., Rojas, E., Fortoul, T.I., Meneses, F., Ramírez, M., Díaz-Barriga, F., Cebrian, M. 1999. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Publica Mex.* 41: 109-113.
- Van Cauteren, H., de Kok, M.C.M., Van Schooten, F. J. 1996. Cancer risk evaluation. In: *Toxicology. Principles and applications.* CRC, New York, 384-413.
- Van Duursen, M.B., Sanderson, J.T., Van den Berg, M. 2005. Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. *Toxicol. Sci.* 85: 703-712.
- Velasco, E., Siegmann, P., Siegmann, H.C. 2004. Exploratory study of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in different environments of Mexico City. *Atmos. Environ.* 38: 4957-4968.
- Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colín, Z., Gómez-Arroyo, S., Bravo-Cabrera, J.L., Frías-Villegas, A.
-
-

-
-
2006. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10 \mu\text{m}$ in southwest México city. *Atmos. Environ.* 40: 5845-5857.
- Vineis, P. y Husgafvel-Pursiainen, K. 2005. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 26: 1846-1855.
- Wagner, E., Rayburn, A., Anderson, D., Plena, M. 1998. Analysis of mutagens with single cell gel electrophoresis, flow cytometry, and forward mutation assays in an isolated clone of chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mut.* 32: 360-368.
- Weyand, E.H., Cai, Z.W., Wu, Y., Rice, J.E., He, Z.M., LaVoie, E.J. 1993. Detection of the major DNA adducts of benzo[b]fluoranthene in mouse skin: role of phenolic dihydrodiols. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 568-577.
- Whitlock, J.P. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 103-125.
- WHO (World Health Organization). 1993. Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. *IPCS Environmental health criteria*; 155. Geneva.
- Wiencke, J.K., McDowell, M.L., Bodell, W.J. 1990. Molecular dosimetry of DNA adducts and sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with benzo[a]pyrene. *Mol. Cell. Biochem.* 11: 1497-1502.
- Wilhelm, M., Eberwein, G., Hölzer, J., Gladtko, D., Angerer, J., Marczyński, B., Behrendt, H., Ring, J., Sugiri, D., Ranft, U. 2007. Influence of industrial sources on children's health-hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210: 591-599.
- Wiseman, H., Kaur, H., and Halliwell, B. 1995. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* 93: 113-120.
- Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H., Loeb, L.A. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 14: 473-486.
- Xue, W. y Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Apply. Pharmacol.* 206: 73-93.
- Yamamoto, T., Hosokawa, K., Tamura, T., Kanno, H., Urabe, M., Honjo, H. 1996. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels in women with or without gynecologic cancer. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 22: 359-363.

-
-
- Yin, B., Whyatt, RM., Perera, FP., Randall, MC., Cooper, TB., Santella, M. 1995. Determination of hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 1023-1032.
- Zalata, A., Yahia, S., El-Bakary, A., Elsheikha, H.M. 2007. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutat. Res.* 629: 140-147.
- Zanesi, N., Ferraro, P., Pavanello, S., Furlan D., Celotti, L. 1994. Cytotoxic and mutagenic effects of anti- and syn-benzo[a]pyrene diol epoxide in human lymphocytes. *Toxicol. In Vitro* 8: 1269-1275.
- Zaremba, T. y Olinski, R. 2010. Oxidative DNA damage-analysis and clinical significance. *Postepy. Biochem.* 56:124-138.
- Zhang, J., Ichiba, M., Hanaoka, T., Pan, G., Yamano, Y., Hara, K., Takahasi, K., Tomokuni, K. 2003. Leukocyte 8-hydroxydeoxyguanosine and aromatic DNA adduct in coke-oven workers with polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76: 499-504.

12. ANEXO

12.1 Artículo publicado

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation

Rodríguez-Romero María Isabel¹, Gómez-Arroyo Sandra¹, Villalobos-Pietrini Rafael¹, Martínez-Valenzuela Carmen², Cortés-Eslava Josefina¹, Calderón-Ezquerro María del Carmen¹, García-Martínez Rocío¹, Arenas-Huertero Francisco³, and Calderón-Segura María Elena¹

¹Laboratorios de Citogenética y Mutagénesis Ambientales, y Química Atmosférica Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria Coyoacán, México, ²Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Occidente, Boulevard Macario Gaxiola, Carretera Internacional, Los Mochis, Sinaloa, México, and ³Hospital Infantil de México, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Patología, Dr. Márquez 162. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc CP, México, D.F., México

Abstract

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dibenzo(a,h)anthracene, benzo(ghi)perylene, benzo(b)fluoranthene and benzo(a)pyrene have been identified in urban air from Mexico City and some of them are classified as human carcinogens. In the present study, human peripheral blood lymphocytes were exposed *in vitro* to different concentrations of PAHs with (+S9) or without (–S9) metabolic activation. The genotoxic and cytotoxic effects of each PAH were examined with an alkaline comet assay and trypan blue dye exclusion, and oxidative DNA damage was determined via the detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The DNA damage was evaluated with two genotoxicity parameters: the frequency of comets and the comet tail length. Concentrations of 20, 40, 80, 160 and 320 µM DB(a,h)A–S9; 20, 40, 80, 160 and 240 µM B(ghi)P–S9; 20, 30, 40, 60 and 80 µM B(b)F–S9; and 80 µM B(a)P–S9 for 24 h induced a small but significant increase in the means of comet frequency, in the tail length and in the 8-OHdG levels in relation to the control (0.5% DMSO–S9). However, all PAHs+S9 produced a more significant increase in DNA strand breaks and the level of 8-OHdG compared with the control (0.5% DMSO+S9), with a concentration–effect relationship. The viability of lymphocytes exposed to all PAHs–S9 and PAHs+S9 was not modified compared with the control. The results of this study demonstrate that the comet and ELISA are rapid, suitable and sensitive methods to detect *in vitro* PAH-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, human peripheral lymphocytes, oxidative DNA damage, DNA strand breaks, 8-OHdG

Introduction

In the past two decades, high levels of PAHs have been detected in Mexico City air, mainly in the Southeast region. Benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(ghi)perylene, benzo(a)pyrene and phenanthrene have been found in the highest concentrations (Gutiérrez-

Castillo et al., 2006; Dzepina et al., 2007; Amador-Muñoz et al., 2008).

Air pollution is a serious health issue in cities with elevated levels of vehicular traffic. The PAH concentrations that have been recorded in Mexico city are significantly higher (60–690 ng/m³) than in the United States cities,

Address for Correspondence: Calderón-Segura María Elena, Laboratorios de Citogenética y Mutagénesis Ambientales, y Química Atmosférica Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria Coyoacán, 04510 México. Fax: +525-5616-0787. E-mail: mcalderon@atmosfera.unam.mx

(Received 08 June 2011; revised 12 August 2011; accepted 13 August 2011)

2 R.-R. María Isabel et al.

1 such as in New York (17 ng/m³) and California (150 ng/m³)
 2 (Marr et al., 2004; Molina & Molina, 2004; Thornhill
 3 et al., 2008). It is possible that these chemical compounds
 4 are related to a high incidence of respiratory, cardiovas-
 5 cular and nervous diseases and also cancer development
 6 (Cohen, 2000; Pope et al., 2002).

7 PAHs constitute a wide class of aromatic compounds
 8 and are produced by incomplete combustion processes.
 9 They are related to suspended particles, and their emis-
 10 sions that are very abundant because of the increase of
 11 transport combustibles, industrial use, heaters and ciga-
 12 rette smoke (Marr et al., 2004; Zavala et al., 2009). PAHs
 13 are widely distributed in air, soil, water, sediments and
 14 food (Phillips, 1999; Martf-Cid et al., 2008).

15 PAHs are absorbed by inhalation, ingestion and dermal
 16 contact. Once inside an organism, they are metabolized
 17 through the cytochrome P450 enzyme system (CYP1A1
 18 and CYP1B1) to produce diol epoxide electrophilic
 19 intermediates that are highly reactive and can bind cova-
 20 lently to macromolecules, such as proteins and nucleic
 21 acids, producing adducts (Harrigan et al., 2006; Park
 22 et al., 2006), mutations (Villalobos-Pietrini et al., 2006),
 23 micronuclei (Bonassi et al., 2003; Cavallo et al., 2006),
 24 sister chromatid exchange (Chandrasekaran et al., 1996;
 25 Calderón-Segura et al., 2004; Cavallo et al., 2006), chro-
 26 mosomal aberrations (Anwar and Kamal, 1988; Celik &
 27 Akbas, 2005) and DNA strand breaks (Garry et al., 2003).

28 PAH metabolism produces a large quantity of reac-
 29 tive oxygen species (ROS), such as superoxide anion
 30 (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radicals
 31 (OH⁻), which can interact with guanine to induce oxi-
 32 dative DNA damage, the principal product of which is
 33 8-OHdG. 8-OHdG is widely employed as a molecular
 34 biomarker for oxidative stress induced by environ-
 35 mental pollutions and is associated with the develop-
 36 ment of various diseases, tumors and cancer (Burdick
 37 et al., 2003; Marie et al., 2009). There are various ana-
 38 lytical methods to quantify, identify and detect PAH-
 39 induced 8-OHdG adduct levels in DNA, urine, serum,
 40 plasma and saliva including high-performance liquid
 41 chromatography (HPLC), gas chromatography-mass
 42 spectrometry (GC-MS), high-performance liquid chro-
 43 matography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/
 44 MS) and HPLC-electrochemical detection (HPLC-EC)
 45 with an ELISA (Cooke et al., 2006; Evans et al., 2008) and
 46 immunohistochemistry (Poirier, 2004; Phillips, 2005).
 47 The ELISA method is very useful as an on-site screen-
 48 ing analytical method for 8-OHdG (Wu et al., 2004;
 49 Altuntas et al., 2009); it is cost-effective, easy to perform
 50 and requires a small sample volume. ELISA currently
 51 has great advantages when compared with other chro-
 52 matographic methods to detect oxidative DNA damage
 53 in several human tissues (Breton et al., 2003; Haghdoost
 54 et al., 2006); it has high sensitivity and precision and
 55 less variation in the 8-OHdG adduct levels analysis, is
 56 faster, less expensive, and more high-throughput, and
 57 does not need sophisticated equipment and the use of
 58 radioisotopes such as radioactive phosphorus-32 (³²P)

(Shimoi et al., 2002; Chiou et al., 2003; Cooke et al.,
 2006; Evans et al., 2008). Urinary 8-OHdG, in particu-
 lar, has been a measurement most frequently used to
 indicate the extent of oxidative DNA damage because
 it is non-invasive and technically less involved (Cooke
 et al., 2006; Evans et al., 2008). High 8-OHdG levels can
 be determined in DNA leukocytes and lymphocytes
 from people exposed environmentally and occupation-
 ally to PAHs (Grzybowska et al., 1993; Marczynski et al.,
 2002; Marie et al., 2009); in diverse tissues from workers
 in asbestos (Takahashi et al., 1997) and coke industries
 (Zhang et al., 2003), styrene production (Marczynski
 et al., 1997) and charcoal and silica mines (Schins
 et al., 1995); in gas station workers (Nilsson et al., 1996)
 and boiler workers (Kim et al., 2004); in patients with
 diabetes (Endo et al., 2006), Alzheimer's (Gackowski
 et al., 2008), and cancer; in patients exposed to chemo-
 therapies and radiotherapies (Bialkowski et al., 1996;
 Roszkowski et al., 2008); and in laboratory animals
 exposed to PAHs (Hattori et al., 1997; Tsurudome et al.,
 1999). Evaluating 8-OHdG adduct levels is important
 because it is a biomarker at the beginning of the muta-
 genic effects, and if not removed, 8-OHdG in DNA may
 lead to T:A transversions, whereas the incorporation of
 8-Oxo-dGTP opposite A will lead to A:T to C:G transver-
 sions (Poirier, 2004; Loft et al., 2008). Increased levels of
 8-OHdG in urine or DNA have been observed in patients
 with different cancer types such as uterine cervical
 (Romano et al., 2000), lung (Crohns et al., 2009), breast
 (Kuo et al., 2007), kidney (Miyake et al., 2004), bladder
 (Akçay et al., 2003), and colorectal (Kondo et al., 2000).
 Even in uterus myomas, high 8-OHdG concentrations
 are related to the tumor size (Foksinski et al., 2000). The
 above information suggests that elevated 8-OHdG lev-
 els may be a risk factor for many cancer types (Györfly
 et al., 2008).

95 Recently, both *in vivo* and *in vitro* investigations have
 96 shown that organic extractable matter (OEM) associated
 97 with urban air from Mexico City induces toxic effects,
 98 but there is a lack of genotoxic studies on single PAHs.
 99 Considering that these chemical compounds represent
 100 a health risk, the present study aimed to investigate the
 101 cytotoxic and genotoxic actions of DB(a,h)A, B(ghi)P,
 102 B(b)F and B(a)P, which were identified in OEM of Mexico
 103 City, in human peripheral blood lymphocytes exposed *in*
 104 *vitro* to PAHs, with or without animal metabolic activa-
 105 tion (S9 enzymatic mixture from liver rat), through the
 106 alkaline comet assay. The comet assay is a quick, simple
 107 and sensitive test to detect DNA damage (single- and
 108 double-strand breaks, alkali labile sites or DNA-DNA
 109 and DNA-protein cross links) in individual cells, tissues
 110 and organs induced by environmental chemical agents
 111 (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) We also evaluated
 112 oxidative DNA damage with the detection of the 8-OHdG
 113 adduct levels by ELISA. 8-OHdG is the most employed
 114 biomarker to measure oxidative DNA damage and an
 115 excellent molecular biomarker for mutagenic and/or
 116 carcinogenic agents (Poirier, 2004).

UTXM 623330

Toxicology Mechanisms and Methods

Materials and methods

Chemicals

The following chemicals were used: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), phosphate buffered saline, RPMI 1640 medium and penicillin-streptomycin (GIBCO); Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare); benzo(a)pyrene (B(a)P), dibenzo(a,h)anthracene (DB(a,h)A), benzo(ghi)perylene (B(ghi)P) and benzo(b)fluoranthene (B(b)F) (Chiron); S9 enzymatic mix (purchased from the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México); low melting point agarose, normal melting point agarose, proteinase K, RNase A, micrococcal nuclease, spleen phosphodiesterase, Nuclease P1, trypan blue (0.4%), sodium dodecyl sulfate (SDS), glucose-6-phosphate (G6P), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) and ethidium bromide (Sigma-Aldrich); dimethylsulfoxide (DMSO) (J.T. Baker); phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Fluka); and the 8-OHdG EIA kit (Cayman Chemical, USA).

The isolation of lymphocytes from human peripheral blood

Twenty milliliters of heparinized venous blood obtained from a healthy volunteer donor was centrifuged at 2500 rpm for 20 min; the cellular layer was diluted 1:1 with HBSS and placed over a Ficoll-Paque layer and was centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Lymphocytes were subsequently collected and washed twice in RPMI 1640 medium by centrifugation at 1500 rpm for 10 min. The lymphocyte pellet was kept in RPMI 1640 medium (37°C) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and was immediately quantified in a Neubauer chamber for the analysis of cellular viability.

Cell viability test

The human lymphocyte viability in all experimental groups before and after treatment was estimated by the trypan blue exclusion test (Altman et al., 1993). Trypan blue penetrates dead cells through the damaged membrane, staining the nucleus. A mix of 10 µl cell pellet plus 10 µl trypan blue was incubated for 3 min, and we then quantified the number of dead cells among the live ones in 100 consecutive cells in duplicate.

Treatments of the human peripheral blood lymphocytes with PAHs *in vitro* without animal metabolic activation

The human peripheral lymphocyte (1×10^6 cells) viability was $\geq 96\%$, and they were incubated with DB(a,h)A (20, 40, 80, 160, 320 µM), B(ghi)P (20, 40, 80, 160, 240 µM) and B(b)F (20, 30, 40, 60, 80 µM) in RPMI 1640 medium to a final volume of 1 ml at 37°C for 24 h. The control was 1×10^6 human peripheral lymphocytes plus DMSO (0.5%) in RPMI 1640 medium, and a positive control was human peripheral lymphocytes (1×10^6 cells) plus 80 µM B(a)P in RPMI 1640 medium in the same conditions. After the treatments, the cell pellet was washed twice with RPMI

1640 medium, and then it was divided to evaluate the cell viability, to perform the alkaline comet assay and to detect 8-OHdG levels by ELISA.

Treatments of the human peripheral blood lymphocytes with PAHs *in vitro* with animal metabolic activation

Human peripheral blood lymphocytes (1×10^6 cells) with a viability $\geq 95\%$ were incubated with DB(a,h)A (20, 40, 80, 160, 320 µM), B(ghi)P (20, 40, 80, 160, 240 µM) and B(b)F (20, 30, 40, 60, 80 µM) in 1640 RPMI medium plus 100 µl S9 enzymatic mixture from rat liver (1:0, S9 + 1M G6P, 0.4M MgCl₂, 1.65 M KCl, 0.1 M NADP, 0.2M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.5) to a final volume of 1 ml at 37°C for 24 h. The control was human peripheral lymphocytes (1×10^6 cells) plus DMSO (0.5%) in RPMI 1640 medium plus 100 µl S9 enzymatic mixture (Maron and Ames 1983; Calderón-Segura et al., 2004). The positive control was human peripheral lymphocytes (1×10^6 cells) plus 80 µM BaP and 100 µl S9 in RPMI 1640 medium in the same conditions. After the treatments, the cell pellet was washed twice with RPMI 1640 medium, and it was then divided to evaluate the cellular viability, to perform the alkaline comet assay and to detect 8-OHdG levels by ELISA.

Alkaline comet assay

The alkaline comet assay was performed according to Singh et al. (1988) and Tice et al. (2000). The lymphocytes (2500 cells) were mixed with 90 µl low melting point agarose (0.5%) at 37°C, placed on fully frosted slides (Fisher) with a thin layer of normal melting point agarose (1%) and covered with a coverslip. Two slides were made for each PAH concentration and the controls. The slides were kept at 4°C for 5 min for solidification of the agarose, the coverslip was carefully removed, and the slides were then immersed in a coplin staining jar with a freshly prepared cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) at 4°C for 1 h. The slides were placed in a horizontal electrophoresis chamber (Owl A5, Lab System Inc) with freshly prepared cold electrophoresis alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 13) for 20 min to unwind the DNA. Electrophoresis was carried out at 25V and 300 mA for 20 min in darkness to prevent the occurrence of additional DNA damage. Subsequently, the slides were washed three times with freshly prepared neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) for 5 min, fixed with cold absolute methanol for 5 min and air-dried at room temperature. Next, 50 µl ethidium bromide (20 mg/ml) was added to each slide to stain the DNA. The slides were labeled with an unknown code for the viewer and examined with an Axiostar Plus Carl Zeiss fluorescent microscope equipped with an excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm. To visualize the DNA damage, the slides were observed at 40× magnification using a micrometric eyepiece/objective combination

4 R.-R. María Isabel et al.

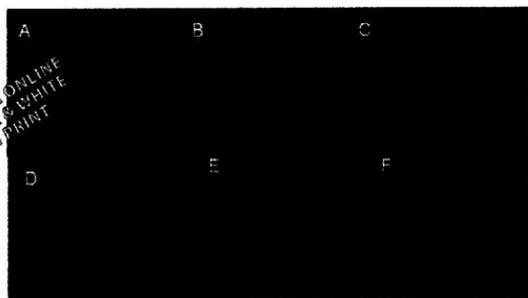


Figure 1. Representative comet images (nuclei with DNA damage) of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to PAHs without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation showing the increase in the tail length (B-F). (See colour version of this figure online at www.informahealthcare.com/txm)

(1 unit = 2.41 μm at 40 \times magnification). The following two parameters were recorded to determine genotoxic effect: a) frequency of comets (nuclei with DNA damage) in 50 randomly selected nuclei on each slide (two slides per each PAH and controls) and b) the comet tail length (DNA fragmentation) in the image was evaluated in μm (from the nuclear region to the end of the tail) in 100 consecutive nuclei (Figure 1).

DNA extraction

Human lymphocytes (1×10^6 cells) from each experimental group were mixed with 300 μl alkaline lysis cold buffer (0.1 M EDTA, 0.15 M NaCl, pH 8) plus proteinase K (0.1 mg/ml) RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and SDS (0.5%) at 37°C for 12 h in constant shaking. Next, the DNA was extracted with a phenol-chloroform-isoamyl alcohol procedure (25:24:1). DNA was precipitated with ice-cold absolute ethanol, and the DNA pellet was washed twice with ice-cold 70% ethanol and dissolved in Milli-Q water. The DNA concentration was determined with a spectrophotometer (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer) at 280 nm; it was then stored at -70°C and used to detect the 8-OHdG levels by ELISA (Yin et al., 1995; Glen, 1996).

DNA digestion

For digestion, 100 μg DNA from the lymphocytes of each experimental group was dried in a SpeedVac evaporator (Concentrator 5301 Eppendorf). The DNA was then mixed with an enzymatic micrococcal nuclease/spleen phosphodiesterase mixture (MN/SPD) to a final concentration of 30 mU/ μl MN and 10 mU/ μl SPD in a digestion buffer (100 mM sodium succinate pH 6, 50 mM calcium chloride) by vortex and incubated at 37°C for 1 h. Next, nuclease P1 (1.25 mg/mL) was added in a sodium acetate buffer (250 mM sodium acetate, pH 5) plus 2 mM zinc chloride and coincubated at 37°C for 1 h. Finally, the reaction was stopped with 0.5 M Tris base, and digested DNA was immediately used to measure the levels of 8-OHdG (Yin et al., 1995; Helbock et al., 1999; Yoshida et al., 2002).

UTXM 623330

Detection of 8-OHdG levels by ELISA

The 8-OHdG adduct levels were measured in 100 μg DNA for each concentration of PAH-S9, PAH+S9, and the controls (DMSO-S9 and DMSO+S9), using the 8-OHdG EIA kit (Cayman Chemical) for ELISA following the procedure suggested by the manufacturers. To begin, 50 μl EIA buffer, 50 μl 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine Tracer AChE and 50 μl 8-OHdG monoclonal antibody were added to each well except the blank. The plate was covered with plastic film and incubated for 18 h at 4°C in an orbital shaker (Rocker 25 Labnet). Next, the wells were washed five times with a wash buffer and then 200 μl Ellman's Reagent was added. The plate was covered with plastic film and incubated for 2 h at room temperature in an orbital shaker (Rocker 25 Labnet), in darkness. The plates were read at a wavelength of 450 nm in an ELISA Lector (Elx800 BioTec) using the Gen 5 ELISA software. The data obtained were processed in a calculus sheet (provided by Cayman Chemical), and the 8-OHdG concentration was obtained with an 8-OHdG standard curve (10.3-3000 pg/ml) and is expressed in ng/ μg DNA (Yin et al., 1995).

Statistical analysis

The results of the comet frequency, the comet tail length, the 8-OHdG adduct levels and cell viability are reported as the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments, with or without S9 (animal metabolic activation *in vitro*) for each concentration of PAH and the controls. The data were analyzed with an analysis of variance and the Newman-Keuls test to determine significant differences between the treated groups (PAH-S9 and PAH+S9) and the respective controls at $p < 0.001$. The relationship in the comet frequency, comet tail length and the level of 8-OHdG with all PAH-S9 or PAH+S9 concentrations were determined using linear regression analysis.

Results

Genotoxicity of PAHs in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* without animal metabolic activation (PAHs-S9)

The results of the treatments of human peripheral lymphocytes *in vitro* exposed for 24 h to PAHs-S9 showed that all PAHs caused a small but significant increase in the means of the frequency of comets and in the comet tail length compared with the control. At concentrations of 40, 80, 160, and 320 μM DB(a,h)A, the comet mean frequency ranged from 7.0 ± 0.8 to 19.3 ± 1.4 and the tail length ranged from 7.37 ± 1.9 to 22.12 ± 3.4 μm ; however, with 20 μM (4.5 ± 0.5 comet frequency; 3.5 ± 1.2 μm tail length), there were no significant differences in both genotoxicity parameters in relation to the control (0.5% DMSO-S9) (4.5 ± 0.5 comet frequency; 3.38 ± 1.2 μm tail length) (Figures 2 and 3) ($p < 0.001$). With 20, 40, 80, 160 and 240 μM B(ghi)P, the mean comet frequency ranged from 8.5 ± 0.5 to 23.7 ± 6.5 and the tail length ranged from 8.99 ± 2.1 to 30.18 ± 3.6 μm . With 20, 30, 40, 60 and 80 μM of

Toxicology Mechanisms and Methods

Evaluation of 8-OhdG adduct levels and DNA strand breaks 5

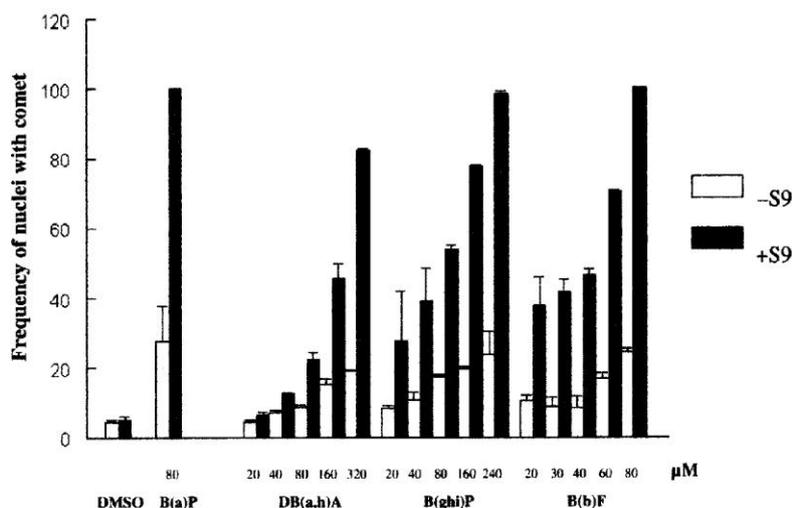


Figure 2. Mean of the comet frequency (nuclei with DNA damage) of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to PAHs without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

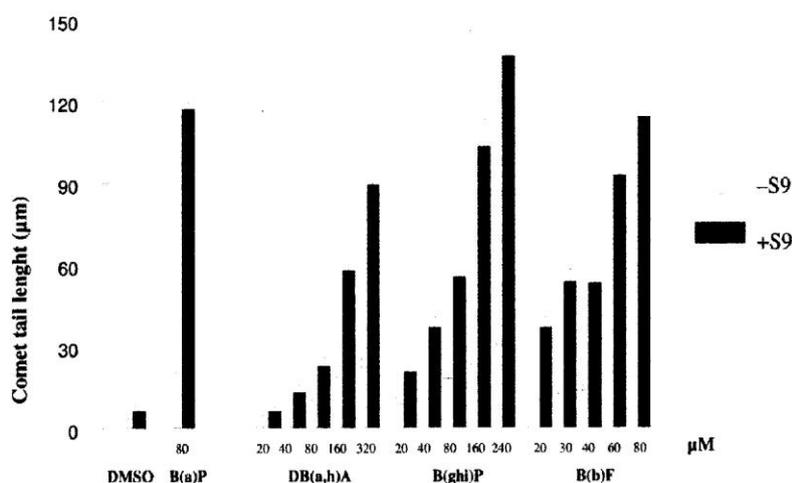


Figure 3. Mean of comet tail length of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to PAHs without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

B(b)F, the mean comet frequency and tail length ranged from 10.4 ± 1.7 to 24.5 ± 0.9 and 10.19 ± 2.2 to 31.02 ± 3.9 μm , respectively (Figures 2 and 3). Treatment with 80 μM B(a)P produced a significant but small increase in means of the frequency of comets (27.8 ± 10.0) and the tail length (20.63 ± 2.6 μm) compared with the control (Figures 2 and 3) ($p < 0.001$).

Genotoxicity of PAHs on human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with animal metabolic activation (PAH+S9)

The *in vitro* PAH+S9 treatments of human lymphocytes for 24 h induced significantly more DNA damage

compared with PAH-S9 treatments ($p < 0.001$) and the control (0.5% DMSO+S9) ($p < 0.001$). At concentrations of 40, 80, 160 and 320 μM DB(a,h)A, the mean frequency of comets was significantly increased from 12.5 ± 0.6 to 84.3 ± 1.2 and the tail length ranged from 12.95 ± 2.6 to 89.33 ± 3.3 μm ; however, 20 μM DB(a,h)A (6.3 ± 1.0 comet frequency; 6.23 ± 1.8 μm tail length) did not cause significant differences compared with the control (0.5% DMSO+S9) (5.0 ± 1.0 comet frequency; 6.42 ± 1.8 μm tail length) ($p < 0.001$). Concentrations of 20, 40, 80, 160 and 240 μM B(ghi)P induced a significant increase in the mean frequency of comets ranging from 27.8 ± 4.4 to 98.7 ± 0.6 and the tail length ranged from

6 R.-R. María Isabel et al.

20.72 ± 2.5 to 136.5 ± 2.1 μm. Concentrations of 20, 30, 40, 60 and 80 μM B(b)F produced a significant increase in the mean comet frequency ranging from 37.8 ± 8.2 to 100 ± 0.0 and the tail length ranged from 37.05 ± 3.6 to 113.87 ± 1.8 μm (Figures 2 and 3). Higher PAH concentrations caused severe DNA damage, as indicated between 80 and 100% of comets with a greater tail length than controls (Figures 1-3). The positive control of 80 μM B(a)P produced 100% of comets with larger tails (117.19 ± 2.4 μm) in relation to the control (0.5% DMSO+S9) (5.0 ± 1.0; 6.42 ± 1.8 μm). Comparing all PAH+S9 genotoxic effects, we observed that B(b)F was more genotoxic than DB(a,h)A and B(ghi)P, and at 80 μM, B(b)F and B(a)P caused a similar increase in both genotoxic parameters compared with the control (Figures 1-3).

The linear regression analysis of the comet frequency and tail length means of all PAHs-S9 and PAHs+S9 showed positive correlations ($r=0.9$), indicating a concentration-effect relationship (Figures 4-6).

Levels of 8-OHdG in the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to pahs without animal metabolic activation (PAHs-S9)

Figure 7 shows a small, significant increase in 8-OHdG levels in the DNA of the human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* to PAHs-S9 compared with the control (DMSO-S9) ($p<0.01$). Concentrations of 80, 160 and 320 μM DB(a, h)A produced a significant increase

ranging from 0.67 ± 0.02 to 0.87 ± 0.05 ng/μg DNA; 40, 80, 160, and 240 μM B(ghi)P-induced 8-OHdG level ranged from 0.67 ± 0.03 to 0.98 ± 0.03 ng/μg DNA; and 20, 30, 40, 60, and 80 μM B(b)F significantly increased 8-OHdG level (0.69 ± 0.03 to 1.13 ± 0.07 ng/μg DNA) in relation to the control (0.5% DMSO-S9) (0.55 ± 0.02 ng/μg DNA) ($p<0.01$). However, 20 and 40 μM DB(a, h)A and 20 μM B(ghi)P did not induce significant differences in the 8-OHdG level compared with the control.

The 8-OHdG levels in the human peripheral blood lymphocytes dna exposed *in vitro* to pahs with animal metabolic activation (PAHs+S9)

All PAHs+S9 produced a large increase in the 8-OHdG mean levels compared with the control (0.5% DMSO+S9) ($p<0.001$) (Figure 7). Concentrations of 80, 160, and 320 μM DB(a,h)A induced a significant increase ranging from 0.99 ± 0.04 to 1.78 ± 0.10 ng/μg DNA in relation to the control (0.54 ± 0.05 ng/μg DNA). With 40, 80, 160, and 240 μM B(ghi)P, the level of 8-OHdG ranged from 1.13 ± 0.05 to 2.23 ± 0.4 ng/μg DNA and were significantly greater compared with the control. With 20, 30, 40, 60, and 80 μM B(b)F, the level of 8-OHdG increased significantly, ranging from 1.24 ± 0.04 to 3.14 ± 0.14 ng/μg DNA, in relation to the control. At lower concentrations of DB(a, h)A and B(ghi)P, there were no significant differences in the 8-OHdG mean level compared with the control (0.5% DMSO+S9) ($p<0.01$) (Figure 7). At 80 μM B(a)P (as positive control), there was a

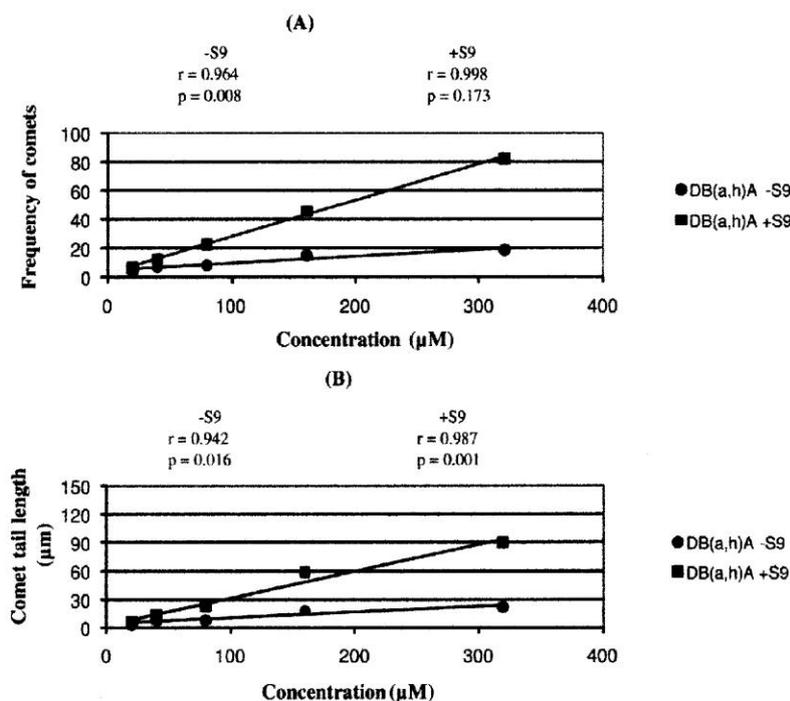


Figure 4. Linear regression of mean comet frequency (A) and the tail length (B) of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to DB(a,h)A without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

UTXM 623330

Toxicology Mechanisms and Methods

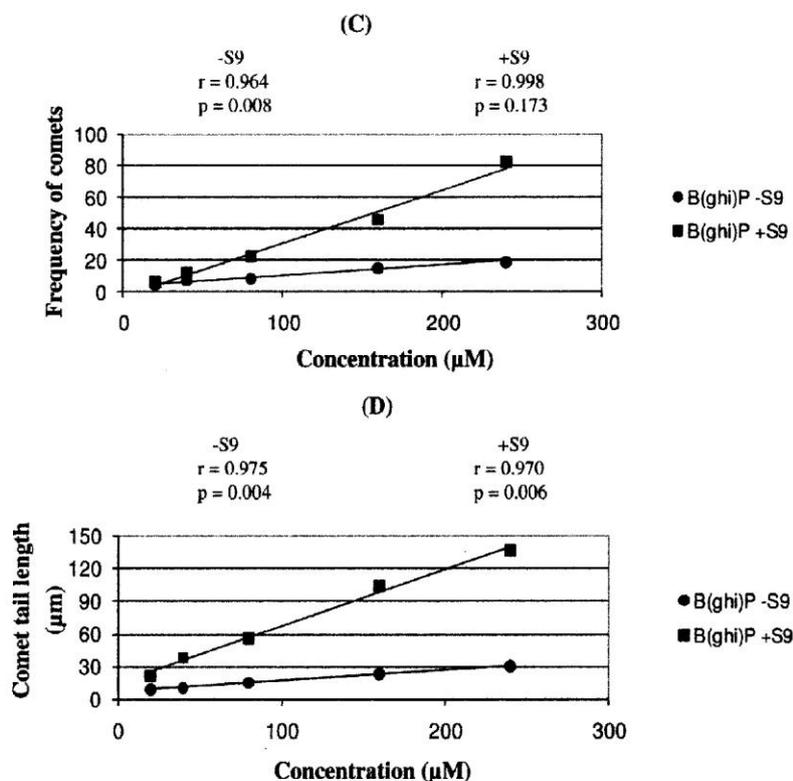


Figure 5. Linear regression of mean comet frequency (C) and the tail length (D) of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to B(ghi)P without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

significant increase in the 8-OHdG mean level ranging from 1.23 ± 0.05 to 3.28 ± 0.06 ng/ μ g DNA in relation to the B(a)P-S9 and to the control (0.5% DMSO+S9) (Figure 7).

The linear regression analysis of the 8-OHdG adduct mean levels induced by PAHs-S9 and PAHs+S9 showed positive correlations at $r=0.9$, revealing an effect-concentration response (Figure 8).

Cytotoxicity of PAHs without or with *in vitro* animal metabolic activation

The viability of lymphocytes exposed to all PAHs-S9 and PAHs+S9 *in vitro* for 24 h was not modified compared with the controls (0.5% DMSO-S9 or +S9) (Figure 9).

Discussion

Mexico City urban air contains high levels of PAHs mainly due to emissions from the increase of vehicular traffic. There is a lack of knowledge related to the genotoxic action of single PAHs, and many studies have focused on environmental and occupational exposures. Calderón-Carcidueñas et al. (1999) found significant DNA damage in the nasal epithelium of children from Mexico City using the alkaline comet assay and measuring high levels of 8-OHdG with immunohistochemistry.

Valverde et al. (1997) and Fortoul et al. (2004) found a significant increase in DNA strand breaks in the nasal epithelium cells and peripheral leukocytes from young students of the same city; both studies correlated the DNA damage with high O_3 concentrations and urban air $PM_{2.5}$ particles. Gutiérrez-Castillo et al. (2006) showed that extractable organic matter (EOM) induced DNA damage in A549 human type alveolar epithelial cells. In a previous investigation, we showed that PAHs extracted from of EOM from Mexico City urban air (PM_{10} and $PM_{2.5}$ particles) produce a significant increase in the sister chromatid exchange frequency and alterations in cellular proliferation kinetics of human peripheral lymphocytes in culture (Calderón-Segura et al., 2004) and mutagenic effects with an Ames Assay (Villalobos-Pietrini et al., 2006).

The present study examined DNA strand breaks and cytotoxicity of different concentrations of DB(a,h)A, B(ghi)P, B(b)F and B(a)P in human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* using the alkaline comet assay and trypan blue dye exclusion. In addition, oxidative DNA damage was quantified with the detection of 8-OHdG adduct levels by the ELISA method. The specified PAHs have been identified in the EOM from Mexico City urban air and were used with or without S9 enzymatic mix from rat liver. PAHs-S9 incubated with human peripheral

8 R.-R. María Isabel et al.

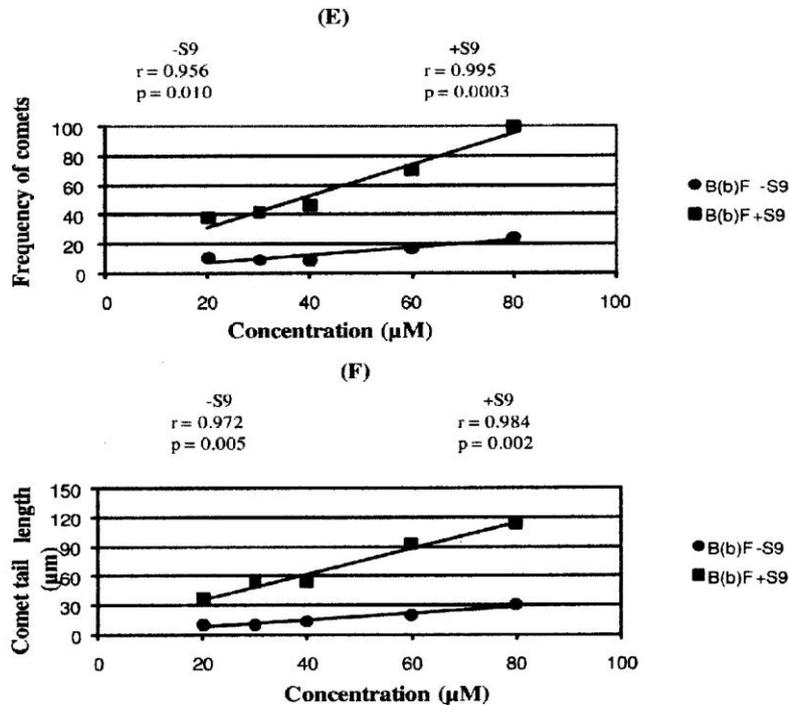


Figure 6. Linear regression of mean comet frequency (E) and in the tail length (F) of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to B(b)F without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

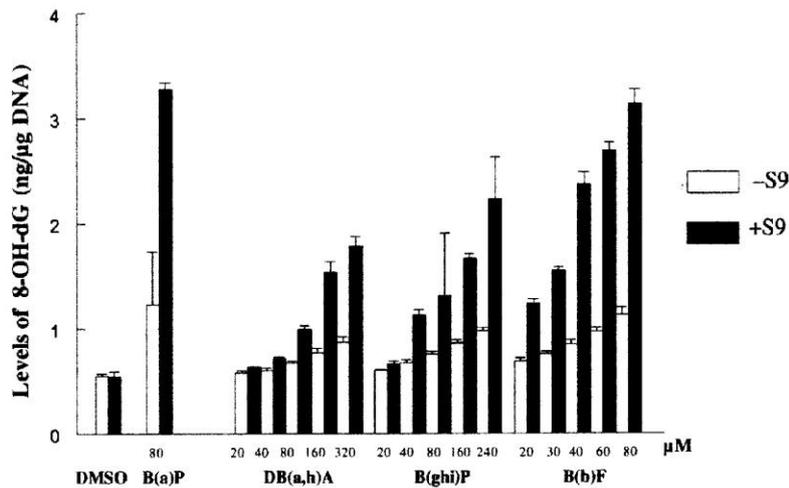


Figure 7. Mean of 8-OHdG adduct level in the DNA of the human Peripheral blood lymphocyte exposed *in vitro* to PAHs without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

lymphocytes produced a small, significant increase in the mean comet frequency, in the comet tail length and in the 8-OHdG levels in relation to the control (0.5% DMSO-S9). These results indicate that these compounds are genotoxic agents, may be less bioactive in human lymphocytes *in vitro*, producing lower concentrations of

metabolic intermediates y ROS that original molecules and metabolites interact directly and indirectly with the DNA to cause its fragmentation and oxidation bases. Our results are in agreement with other reports that human peripheral blood lymphocytes contain less CYP450 1A1 and 1B1 enzymes than liver, which are capable of

Evaluation of 8-OHdG adduct levels and DNA strand breaks 9

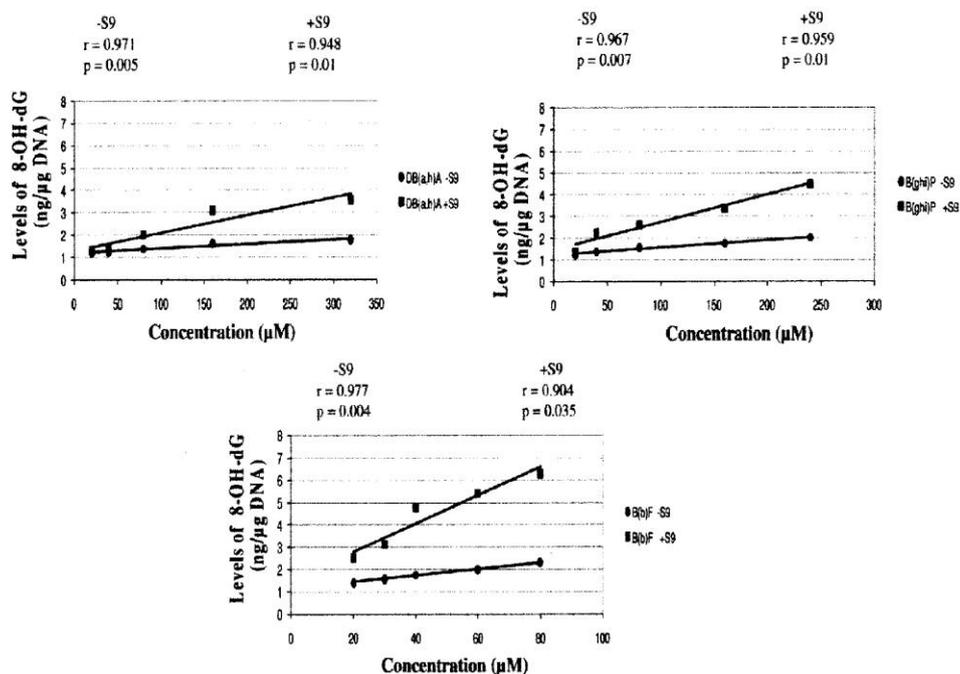


Figure 8. Linear regression of the 8-OHdG adduct mean levels in the DNA of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to PAHs without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

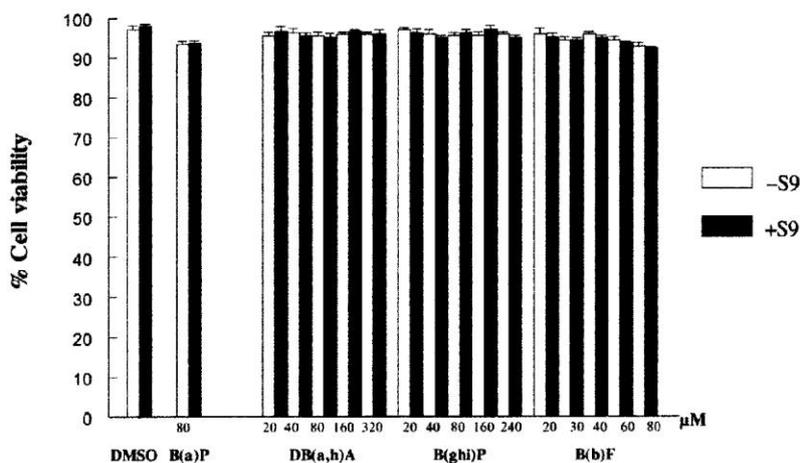


Figure 9. Mean viability of the human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to PAHs without (-S9) or with (+S9) animal metabolic activation.

metabolizing PAHs into genotoxic metabolic intermediates (Burchiel & Luster, 2001; Lin et al., 2003; Furukawa et al., 2004; van Duursen et al., 2005). However, in presence of S9 mix, all PAH produced greater DNA damage in human lymphocytes, as evidenced by a large increase in DNA strand breaks, a high percentage of comets, and higher levels of 8-OHdG compared with the control (0.5% DMSO+S9), with a concentration-effect relationship.

The metabolic activation of PAHs is well characterized; they are metabolized by the P450 cytochrome enzyme system (CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1) to produce electrophilic intermediates, such as diol epoxides. B(a)P is enzymatically transformed into arene oxides (9-OH-BaP, 7-OH-BaP, 6-OH-BaP, 3-OH-BaP, and 1-OH-BaP). These arene oxides rearrange into phenols or are catalyzed by epoxide hydrolase to generate BaP-9-diol, BaP-4,5-diol,

and BaP-7,8-diol (BPDE) which are highly carcinogenic and reacts with DNA to form DNA strand breaks and adducts with the N² of deoxy-guanosine and guanine (Briedé et al., 2004; Xue & Warshawsky, 2005; Shimada & Guengerich, 2006). Additionally, through electronic oxidation reactions, B(a)P produces quinones such as B(a)P 6, 12-6 and 3,6-B(a)P dione that through redox cycling with their respective diol epoxides induce the production of ROS. These ROS, especially the hydroxyl radical (OH), are capable of oxidizing DNA bases, principally guanine, which forms the 8-OHdG adduct (Briedé et al., 2004; Xue & Warshawsky, 2005; Ruan et al., 2007).

B(b)F metabolites that have been identified *in vitro* and *in vivo* are trans-9,10-dihydro-5,9,10-trihydroxybenzo[b]fluoranthene (5-OH-B[b]F-9,10-diol) and/or trans-9,10-dihydro-6,9,10-trihydroxybenzo[b]F (6-OH-B[b]F-9,10-diol), and trans-9,10-dihydro-anti-11,12-epoxy-5-hydroxy-9,10,11,12-tetrahydro-B(b)F-deoxyguanosine is the major B(b)F-DNA adduct in mouse skin (Geddie et al., 1987; Weyand et al., 1993; Baer-Dubowska, 1999), rat lungs and hepatocytes (Ross et al., 1992; Mass et al., 1996; Topinka et al., 1998).

The 3,4,10,11-bis-dihydrodiol-1,2-epoxide metabolite of DB(a,h)A is a major initiator in skin mouse tumors (Buening et al., 1979; Binková and Sram, 2004; Švihálková-Šindlerová et al., 2007) and DNA adduct formation in mouse skin (Lecoq et al., 1992; Carmichael et al., 1993; Baer-Dubowska, 1999; Kleiner et al., 2004).

The main metabolites of B(ghi)P, the 3,4-epoxy-3,4-dihydro-BghiP (3,4-oxide) and 3,4,11,12-bisepoxy-3,4,11,12-tetrahydro-B(ghi)P (3,4,11,12-bisoxide), being the first metabolite involved in mutagenic activity and DNA adduct formation in calf thymus (Platt & Grupe, 2005; Platt et al., 2008b).

The treatments with PAHs+S9 show the metabolic differences of the S9 mix; this exogenous mammalian activation system increased the level of metabolizing enzymes to produce higher concentrations of reactive metabolites capable of joining covalently to DNA inducing its fragmentation, as revealed by the higher significant increase in the mean comet frequency and the greater tail length. Similarly, ROS were produced, resulting in greater levels of 8-OHdG in PAHs+S9 treatments than the PAHs-S9 and control (0.5% DMSO+S9). The significant induction in the 8-OHdG adduct level had a concentration-effect relationship and was similar to DNA damage detected by the alkaline comet assay. Comparing DNA damage of the all PAHs+S9, we observed that B(b)F caused a greater increase in the level of 8-OHdG adduct and fragmentation of DNA than B(ghi)P, DB(a,h)A and control (0.5% DMSO+S9). B(b)F and B(a)P similarly increased the level of 8-OHdG adduct and DNA fragmentation compared with the control (0.5% DMSO+S9). The electrophilic intermediates and ROS production during the *in vitro* metabolism of B(b)F was greater than B(ghi)P, DB(a,h)A. But, perhaps, to B(b)F and B(a)P may be similar, as both PAHs produced higher DNA strand breaks and oxidation of guanine than B(ghi)P and DB(a,h)A. The metabolic differences of rat liver

S9 enzymatic mixture for each PAH *in vitro* reveals the genotoxic action of individual PAHs in human peripheral blood lymphocytes and in the induction of DNA damage that depends of their chemical structure and concentration to produce metabolic intermediates and ROS such as diol epoxides and hydroxyl radicals, respectively, which are capable to induce genome fragmentation and oxidizing guanine to cause DNA strand breaks and formation 8-OHdG adducts, respectively.

Although, diverse investigations have shown that ELISA has limited specificity because antibody can crossing-reactivity with similar DNA adducts (Yin et al., 1995; Cooke et al., 2006; Evans et al., 2008), however, in our results are agreement with reported values to level of 8-OHdG in DNA *in vitro* (Yin et al., 1995; Breton et al., 2003; Chiu et al., 2003). Furthermore, in our study, induced and basal values of the 8-OHdG level in human lymphocytes detected by the ELISA method from three independent assays revealed that this technique is sensitive and reproducible to analyze the oxidative DNA damage from human cells exposed *in vitro* to environmental pollutants such as PAHs, perhaps, assuring that there is great affinity and specificity to the binding of the antibody 8-OHdG from the kit (Cayman Chemical, USA) with the oxidized endogenous base.

The results of this study show that the genotoxic action of individual PAHs in human peripheral lymphocytes depends on chemical compound concentration and on the metabolic rate of the *in vitro* S9 mix to produce differently genotoxic intermediates and ROS that damage the DNA of human lymphocytes. Our results are in agreement with diverse *in vitro* and *in vivo* genotoxic studies of B(a)P, which has been shown to induce DNA strand breaks in human lung cells (Park et al., 2009); in HepG2 cultured human hepatocytes (Tarantini et al., 2009); in human umbilical vein endothelial cells (Annas et al., 2000) and lymphocytes of occupational exposure people (Cebulska-Wasilewska et al., 2005) by comet assay. B(a)P has also been shown to produce DNA adducts in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* (Wiencke et al., 1990; Zanesi et al., 1994) and *in vivo* (Grzybowska et al., 1993); in human A549 lung epithelial carcinoma cells by ³²P-Postlabeling (Drej et al. 2005); in HepG2 cultured human hepatocytes by HPLC/MS-MS (Tarantini et al., 2009); in calf thymus DNA and lung cells by radioimmunoassay (Cheng et al., 2007) and by HPLC-ES-MS/MS analyses (Beland et al., 2005). B(a)P adducts have also been detected *in vivo* by ELISA (Harris et al., 1985; Takaishi et al., 2009); in mouse epidermis (Marston et al., 2001) and in WB-F344 rat liver epithelial cells (Topinka et al., 2008), and detected by ³²P-postlabeling in human lung fibroblasts (Binková & Srám, 2004). Additionally, DB(a,h)A, B(b)F and B(ghi)P have shown to induce DNA strand breaks in V79 lung fibroblasts of the Chinese hamster by comet assay (Platt et al., 2008a) and have been shown to produce DNA adducts in calf thymus (Platt et al., 2008a); in liver (Staal et al., 2007); in cultures of rat hepatocytes and V79NH and NCI-H322 cells (Topinka et al.,

1998); in human embryonic lung diploid fibroblasts; and in mouse skin via ³²P-Postlabeling-HPLC (Weyand et al., 1993; Singh et al., 2010).

Our results support the possibility that high PAH levels identified in and associated with urban air in Mexico City are related to the increased incidence in illnesses within the population. In our study, we evaluated *in vitro* genotoxicity of B(b)F, B(a)P, B(ghi)P and B(a,h)A in human lymphocytes to concentrations higher (20–320 μM) than detected environmentally, then we can not compare PAH concentrations used in our *in vitro* genotoxic study with the PAH concentrations detected in urban air from Mexico city (B(b)F is to 2.07 ng/cm³, DB(a,h) A to 0.59 ng/cm³, B(ghi)P to 1.46 ng/cm³, B(a)P to 0.74 ng/cm³ indeno(1,2,3-cd)pyrene to 1.00 ng/cm³, phenantrene to 1.66 ng/cm³), considering that are combined with other matter particles forming a complex mixture (Calderón-Segura et al., 2004; Gutiérrez-Castillo et al., 2006; Villalobos-Pietrini et al. 2006; Amador-Muñoz et al. 2001, 2008; Thornhill et al., 2008), maybe exposure to matter particles could produce an accumulation of DNA lesions and if the DNA is not repaired, the beginning of carcinogenesis and the development of tumors may eventually occur (Burdick et al., 2003; Briedé et al., 2004; Marczyński et al., 2009). The implications and adverse health consequences depend on various factors such as individual susceptibility, DNA repair mechanism efficiency, endogenous antioxidant levels and lifestyle (smoking, alcohol intake) (Wiseman et al., 1995; Hsiao et al., 2000). The investigation of biomarkers, such as the ones employed in this research, should be a useful tool to give assistance to pollutant-exposed people, with the aim of knowing the risk of cancer development and other diseases at the beginning stages. In conclusion, our results demonstrate the individual genotoxic action of the PAHs DB(a,h)A, B(ghi)P and B(b)F identified in the EOM of Mexico City urban air. All PAHs-S9 caused little DNA damage. However, PAH+S9 produced a large increase in DNA strand breaks and increased 8-OHdG levels in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. By comparing the genotoxic actions of the PAHs, we observed that B(b)F caused more DNA damage in human peripheral lymphocytes than B(a,h)A and B(ghi)P. B(b)F and B(a)P induced a similar genotoxic response *in vitro* in human cells. Because Mexico City air contains high PAH concentrations associated with urban air, it is important to consider that the synergistic action of PAHs increases human health risk. Moreover, these results corroborated that the alkaline comet assay is an excellent and sensitive test to evaluate DNA strand breaks induced by environmental chemicals. It also showed that the ELISA method is an adequate assay to detect the 8-OHdG levels, which are a good molecular biomarker for oxidative DNA damage induced by PAHs in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*.

Acknowledgments

The authors thank CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), Apoyos Complementarios a

Evaluation of 8-OHdG adduct levels and DNA strand breaks 11

Investigadores en Fase de Consolidación SNI Nivel I, PAPIIT-DGAPA-UNAM IN213908, and Posgrado en Ciencias Biológicas Universidad Nacional Autónoma de México for the support to carry out this project. We are grateful to the chemist Ana Luisa Alarcón Jiménez of the Laboratorio de Contaminación Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera for her technical assistance in the alkaline comet assay.

Declaration of interest

References

- Akçay T, Saygılı I, Andıcan G, Yalçın V. 2003. Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. *Urol Int* 71:271–274.
- Anwar WA, Kamal AA. 1988. Cytogenetic effects in a group of traffic policemen in Cairo. *Mutat Res* 208:225–231.
- Altman SA, Randers L, Rao G. 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 9:671–674.
- Altıntaş I, Osmanoglu Ö, Dagdelen S, Isildak M, Durusoy M, Erbas T. 2009. The availability of 8-OHdG, an oxidative DNA damage marker, in the diagnosis and treatment of autoimmune thyroiditis. *Endocrinol Dialog* 6:151–155.
- Amador-Muñoz O, Villalobos-Pietrini R, Aragón-Piña A, Tran TC, Morrison P, Marriott PJ. 2008. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons based on comprehensive two-dimensional gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1201:161–168.
- Annas A, Brittebo E, Hellman B. 2000. Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 471:145–155.
- Baer-Dubowska W. 1999. Alternative pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons activation: the formation of polar DNA adducts. *Acta Biochim Pol* 46:263–274.
- Beland FA, Churchwell MI, Von Tungel LS, Chen S, Fu PP, Culp SJ, Schoket B, Györfy E, Minárovits J, Poirier MC, Bowman ED, Weston A, Doerge DR. 2005. High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo(a)pyrene-DNA adducts. *Chem Res Toxicol* 18:1306–1315.
- Białkowski K, Kowara R, Windorbska W, Olinski R. 1996. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine level in lymphocytes DNA of cancer patients undergoing radiotherapy. *Cancer Lett* 99:93–97.
- Binková B, Srám RJ. 2004. The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res* 547:109–121.
- Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M; HUMN collaborative group. 2003. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res* 543:155–166.
- Breton J, Sichel F, Bianchini F, Prevost V. 2003. Measurement of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by a commercially available ELISA test: comparison with HPLC/electrochemical detection in calf thymus DNA and determination in human serum. *Anal Lett* 36:123–134.
- Briedé JJ, Godschalk RW, Emans MTG, De Kok TMC, van Agen E, van Maanen JMS, van Schooten F, Kleinjans JCS. 2004. *In vitro* and *in vivo* studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo(a)pyrene metabolism. *Free Radic Res* 38:995–1002.
- Buening MK, Levin W, Wood AW, Chang RL, Yagi H, Karle JM, Jerina DM, Conney AH. 1979. Tumorigenicity of the dihydrodiols of

12 R.-R. María Isabel et al.

- dibenzo(a,h)anthracene on mouse skin and in newborn mice. *Cancer Res* 39:1310-1314.
- Burchiel SW, Luster MI. 2001. Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clin Immunol* 98:2-10.
- Burdick AD, Davis JW 2nd, Liu KJ, Hudson LG, Shi H, Monske ML, Burchiel SW. 2003. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res* 63:7825-7833.
- Calderón-Garcidueñas L, Wen-Wang L, Zhang YJ, Rodríguez-Alcaraz A, Osnaya N, Villarreal-Calderón A, Santella RM. 1999. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ Health Perspect* 107:469-474.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Butterworth FM, Amador-Muñoz O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytogenetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat Res* 558:7-17.
- Carmichael PL, Platt KL, Shé MN, Lecoq S, Oesch F, Phillips DH, Grover PL. 1993. Evidence for the involvement of a bis-diol-epoxide in the metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene to DNA-binding species in mouse skin. *Cancer Res* 53:944-948.
- Cavallo D, Ursini CL, Bavazzano P, Cassinelli C, Frattini A, Perniconi B, Di Francesco A, Ciervo A, Rondinone B, Iavicoli S. 2006. Sister chromatid exchange and oxidative DNA damage in paving workers exposed to PAHs. *Ann Occup Hyg* 50:211-218.
- Cebulska-Wasilewska A, Wiechec A, Panek A, Binková B, Srám RJ, Farmer PB. 2005. Influence of environmental exposure to PAHs on the susceptibility of lymphocytes to DNA-damage induction and on their repair capacity. *Mutat Res* 588:73-81.
- Celi K A, Akbas E. 2005. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:106-112.
- Chandrasekaran R, Samy PL, Murthy PB. 1996. Increased sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from traffic policemen exposed to automobile exhaust pollution. *Hum Exp Toxicol* 15:301-304.
- Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta* 334:87-94.
- Cheng YW, Tsai HJ, Wu JY, Hsu YF, Chen CY, Hao NJ, Lee H. 2007. A possible role for dihydrodiol dehydrogenase in the formation of benzo[a]pyrene-DNA adducts in lung cancer cell and tumor tissues. *Environ Mol Mut* 48:14-21.
- Cohen AJ. 2000. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4:743-750.
- Cooke MS, Singh R, Hall GK, Mistry V, Duarte TL, Farmer P, Evans MD. 2006. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine. *Free Rad Biol Med* 41:1829-1836.
- Crohms M, Saarelainen S, Erhola M, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P. 2009. Impact of radiotherapy and chemotherapy on biomarkers of oxidative DNA damage in lung cancer patients. *Clin Biochem* 42:1082-1090.
- Dreij K, Seidel A, Jernström B. 2005. Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo(a,h)pyrene and benzo(a)pyrene in human cells. *Chem Res Toxicol* 18:655-664.
- Dzepina K, Arey J, Marr LC, Worsnop DR, Salcedo QZ, Onasch TB, Molina LT, Molina MJ, Jimenez JL. 2007. Detection of particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico City using an aerosol mass spectrometer. *Int J Mass Spectrom* 263:152-170.
- Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, Ebisuno M, Ohira M, Saiki A, Koide N, Oyama T, Takeyoshi M, Shirai K. 2006. Probulcal and atorvastatin decrease urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with diabetes and hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb* 13:68-75.
- Evans MD, Singh R, Mistry V, Sandhu K, Farmer P, Cooke MS. 2008. Analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-purine-2'-deoxyribonucleosides by LC-MS/MS and improved ELISA. *Free Rad Res* 42:831-840.
- Foksinski M, Kotzbach R, Szymanski W, Olinski R. 2000. The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med* 29:597-601.
- Fortoul TI, Valverde M, López MC, Avila-Costa MR, Avila-Casado MC, Mussali-Galante P, Gonzalez-Villalva A, Rojas E, Ostrosky-Shejt P. 2004. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environ Res* 94:243-248.
- Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N, Naito S, Kuribayashi S, Moustafa MA, Uchida T, Sawada H, Kamataki T, Funae Y, Fukumoto M. 2004. Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci* 95:520-529.
- Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Dziaman T, Nicpon K, Klimarczyk M, Araszkiewicz A, Olinski R. 2008. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *J Neurol Sci* 266:57-62.
- Garry S, Nesslany F, Aliouat E, Haguenoer JM, Marzin D. 2003. Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. *Mutat Res* 534:33-43.
- Geddie JE, Amin S, Huie K, Hecht SS. 1987. Formation and tumorigenicity of benzo[b]fluoranthene metabolites in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 8:1579-1584.
- Glen ACA. 1996. Measurement of DNA and RNA in human peripheral blood lymphocytes. *Chem Clin* 13:299-313.
- Grzybowska E, Hemminki K, Szeliga J, Chorazy M. 1993. Seasonal variation of aromatic DNA adducts in human lymphocytes and granulocytes. *Carcinogenesis* 14:2523-2526.
- Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 47:199-211.
- Gyorfy E, Anna I, Kovács K, Rudnai P, Schoket B. 2008. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. *Mutagenesis* 23:1-18.
- Haghdoust S, Sjölander L, Czene S, Harms-Ringdahl M. 2006. The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 41:620-626.
- Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR, Olson JR. 2006. Tissue specific induction of cytochrome P 450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following *in vitro* and *in vivo* exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro* 20:426-438.
- Harris CC, Vahakangas K, Newmant MJ, Trivers GE, Shamsuddin A, Sinopoli N, Mann D, Wright WE. 1985. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers. *Proc Natl Acad Sci* 82:6672-6676.
- Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Uchida K, Nikaido O, Osawa T, Hiai H, Imamura S, Toyokuni S. 1996. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 107:733-737.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 1999. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300:156-166.
- Hsiao WL, Mo ZY, Fang M, Shi XM, Wang F. 2000. Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the comet assays. *Mutat Res* 471:45-55.
- Kim JY, Mukherjee S, Ngo LC, Christiani DC. 2004. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in

Evaluation of 8-OHdG adduct levels and DNA strand breaks 13

workers exposed to fine particulates. *Environ Health Perspect* 112:666-671.

Kleiner HE, Vulimiri SV, Hatten WB, Reed MJ, Nebert DW, Jefcoate CR, DiGiovanni J. 2004. Role of cytochrome P450 family members in the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mouse epidermis. *Chem Res Toxicol* 17:1667-1674.

Kondo S, Toyocuni S, Tanaka T, Hiai H, Onodera H, Kasai H, Imamura M. 2000. Overexpression of the hOGGI Gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin Cancer Res* 6:1394-1400.

Kuo H, Chou S, Hu T, Wu F. 2007. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res* 631:62-68.

Lecoq S, Pfau W, Grover PL, Phillips DH. 1992. HPLC separation of 32P-postlabelled DNA adducts formed from dibenz[a,h]anthracene in skin. *Chem Biol Interact* 85:173-185.

Lin P, Hu SW, Chang TH. 2003. Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes. *Toxicol Sci* 71:20-26.

Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P. 2008. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans* 36:1071-1076.

Marczynski B, Rozynek P, Eliehausen HJ, Korn M, Baur X. 1997. Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene. *Arch Toxicol* 71:496-500.

Marczynski B, Rihs HP, Rossbach B, Hölzer J, Angerer J, Scherenberg M, Hoffmann G, Brüning T, Wilhelm M. 2002. Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring, urinary metabolites and enzyme polymorphisms. *Carcinogenesis* 23:273-281.

Marczynski B, Pesch B, Wilhelm M, Rossbach B, Preuss R, Hahn JU, Rabstein S, Raulf-Heimsoth M, Seidel A, Rihs HP, Adams A, Scherenberg M, Erkes A, Engelhardt B, Straif K, Kählerlein HU, Angerer J, Brüning T. 2009. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: a nationwide study in Germany. *Arch Toxicol* 83:947-957.

Marie C, Ravanat JL, Badouard C, Marques M, Balducci F, Maître A. 2009. Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. *Environ Mol Mutagen* 50:88-95.

Marr LC, Grogan LA, Wöhrnschimmel H, Molina LT, Molina MJ, Smith TJ, Garshick E. 2004. Vehicle traffic as a source of particulate polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the Mexico City metropolitan area. *Environ Sci Technol* 38:2584-2592.

Marston CP, Pereira C, Ferguson J, Fischer K, Hedstrom O, Dashwood WM, Baird WM. 2001. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 22:1077-1086.

Martí-Cid R, Llobet JM, Castell V, Domingo JL. 2008. Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food Chem Toxicol* 46:3163-3171.

Mass MJ, Abu-Shakra A, Roop BC, Nelson G, Galati AJ, Stoner GD, Nesnow S, Ross JA. 1996. Benzo[b]fluoranthene: tumorigenicity in strain A/J mouse lungs, DNA adducts and mutations in the Ki-ras oncogene. *Carcinogenesis* 17:1701-1704.

Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-215.

Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H. 2004. Prognostic significance of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urology* 64:1057-1061.

Molina MJ, Molina LT. 2004. Megacities and atmospheric pollution. *J Air Waste Manag Assoc* 54:644-680.

Nilsson RI, Nordlinder RG, Tagesson C, Walles S, Järholm BG. 1996. Genotoxic effects in workers exposed to low levels of benzene from gasoline. *Am J Ind Med* 30:317-324.

Park S, Lee S, Ye S, Yoon S, Chung M, Choi J. 2006. Benzo(a)pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol Lett* 167:27-33.

Park JH, Mangal D, Frey AJ, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. 2009. Aryl-hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J Biol Chem* 284:29725-29734.

Phillips DH. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 443:139-147.

Phillips DH. 2005. DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutat Res* 577:284-292.

Platt KL, Grupe S. 2005. Microsomal biotransformation of benzo[ghi]perylene, a mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon without "classic" bay region. *Chem Res Toxicol* 18:700-710.

Platt KL, Grupe S, Fickler M. 2008. The 3,4-oxide is responsible for the DNA binding of benzo[ghi]perylene, a polycyclic aromatic hydrocarbon without a "classic" bay-region. *Chem Biol Interact* 176:179-187.

Poirier MC. 2004. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer* 4:630-637.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287:1132-1141.

Romano G, Sgambato A, Mancini R, Capelli G, Giovagnoli MR, Flamini G, Boninsegna A, Vecchione A, Cittadini A. 2000. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis* 21:1143-1147.

Ross JA, Nelson GB, Holden KL, Kligerman AD, Erexson GL, Bryant MF, Earley K, Beach AC, Gupta RC, Nesnow S. 1992. DNA adducts and induction of sister chromatid exchanges in the rat following benzo[b]fluoranthene administration. *Carcinogenesis* 13:1731-1734.

Roszkowski K, Gackowski D, Rozalski R, Dziarnan T, Siomek A, Guz J, Szpila A, Foksinski M, Olinski R. 2008. Small field radiotherapy of head and neck cancer patients is responsible for oxidatively damaged DNA/oxidative stress on the level of a whole organism. *Int J Cancer* 123:1964-1967.

Ruan Q, Gelhaus SL, Penning TM, Harvey RG, Blair IA. 2007. Aldo-keto reductase- and cytochrome p450-dependent formation of benzo[a]pyrene-derived dna adducts in human bronchoalveolar cells. *Chem Res Toxicol* 20:424-431.

Schins RP, Schilderman PA, Borm PJ. 1995. Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health* 67:153-157.

Shimada T, Guengerich FP. 2006. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2- and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 19:288-294.

Shimoi K, Kasai H, Yokota N, Toyokuni S, Kinae N. 2002. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:767-770.

Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Singh R, Teichert F, Seidel A, Roach J, Cordell R, Cheng MK, Frank H, Steward WP, Manson MM, Farmer PB. 2010. Development of a targeted adductomic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24:2329-2340.

14 R.-R. María Isabel et al.

- 1 Staal YC, van Herwijnen MH, Pushparajah DS, Umachandran M,
2 Ioannides C, van Schooten FJ, van Delft JH. 2007. Modulation of
3 gene expression and DNA-adduct formation in precision-cut liver
4 slices exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons of different
5 carcinogenic potency. *Mutagenesis* 22:55-62.
- 6 Sviháková-Sindlerová L, Machala M, Pencíková K, Marvanová S,
7 Neca J, Topinka J, Sevastyanova O, Kozubík A, Vondráček J. 2007.
8 Dibenzanthracenes and benzochrysenes elicit both genotoxic and
9 nongenotoxic events in rat liver 'stem-like' cells. *Toxicology*
10 232:147-159.
- 11 Takaishi M, Sawada M, Shimada A, Suzuki JS, Satoh M, Nagase H.
12 2009. Protective role of mellathionein in benzo(a)pyrene-induced
13 DNA damage. *Toxicol Sci* 34:449-458.
- 14 Takahashi K, Pan G, Kasai H, Hanaoka T, Feng Y, Liu N, Zhang S, Xu
15 Z, Tsuda T, Yamato H, Higashi T, Okubo T. 1997. Relationship
16 between asbestos exposures and 8-hydroxydeoxyguanosine levels
17 in leukocytes DNA of workers at a Chinese asbestos-material plant.
18 *Int J Occup Environ Health* 3:111-119.
- 19 Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Marie C, Ravanat JL,
20 Douki T. 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and
21 DNA adducts to the genotoxicity of benzo(a)pyrene as a pure
22 compound and in complex mixtures. *Mutat Res* 671:67-75.
- 23 Thornhill DA, Foy B, Herndon SC, Onasch TB, Wood EC, Zavala
24 M, Molina LT, Gaffney JS, Marley NA, Marr LC. 2008. Spatial
25 and temporal variability of particulate polycyclic aromatic
26 hydrocarbons in Mexico City. *Atm Chem Phys* 8:3093-3105.
- 27 Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H,
28 Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet
29 assay: guidelines for *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ*
30 *Mol Mutagen* 35:206-221.
- 31 Topinka J, Schwarz LR, Kiefer F, Wiebel FJ, Gajdos O, Vidová P, Dobiás L,
32 Fried M, Srám RJ, Wolff T. 1998. DNA adduct formation in mammalian
33 cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-
34 PAH in coke oven emission extract. *Mutat Res* 419:91-105.
- 35 Topinka J, Marvanová S, Vondráček J, Sevastyanova O, Nováková Z,
36 Krcmár P, Pencíková K, Machala M. 2008. DNA adducts formation
37 and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells
38 exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat*
39 *Res* 638:122-132.
- 40 Tsurudome Y, Hirano T, Yamato H, Tanaka I, Sagai M, Hirano H, Nagata N,
41 Itoh H, Kasai H. 1999. Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA,
42 its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal admini-
43 stration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 20:1573-1576.
- 44 Valverde M, del Carmen López M, López I, Sánchez I, Fortoul TI,
45 Ostrosky-Wegman P, Rojas E. 1997. DNA damage in leukocytes
46 and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air
47 pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen* 30:147-152.
- 48 van Duursen MB, Sanderson JT, van den Berg M. 2005. Cytochrome
49 P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as
50 biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms
51 and interindividual variation in expression and inducibility.
52 *Toxicol Sci* 85:703-712.
- 53 Villalobos-Pietrini R, Amador-Muñoz O, Walisevski S, Hernández
54 M, Munive C, Gómez A, Bravo C, Frías V. 2006. Mutagenicity and
55 polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable
56 organic matter from airborne particles $\le 10 \mu\text{m}$ in southwest
57 México City. *Atm Environ* 40:5845-5857.
- 58 Weyand EH, Cai ZW, Wu Y, Rice JE, He ZM, LaVoie EJ. 1993. Detection
59 of the major DNA adducts of benzo[b]fluoranthene in mouse skin:
60 role of phenolic dihydrodiols. *Chem Res Toxicol* 6:568-577.
- 61 Wiencke JK, McDowell ML, Bodell WJ. 1990. Molecular dosimetry
62 of DNA adducts and sister chromatid exchanges in human
63 lymphocytes treated with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 11:
64 1497-1502.
- 65 Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. 1995. DNA damage and cancer:
66 measurement and mechanism. *Cancer Lett* 93:113-120.
- 67 Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of
68 oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis
69 and diabetics. *Clin Chim Acta* 339:1-9.
- 70 Xue W, Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and
71 heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review.
72 *Toxicol Appl Pharmacol* 206:73-93.
- 73 Yoshida R, Ogawa Y, Kasai H. 2002. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-
74 deoxyguanosine values measured by an ELISA correlated well with
75 measurements by high-performance liquid chromatography with
76 electrochemical detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*
77 11:1076-1081.
- 78 Yin B, Whyatt RM, Perera FP, Randall MC, Cooper TB, Santella M. 1995.
79 Determination of hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity
80 chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic*
81 *Biol Med* 18:1023-1032.
- 82 Zanesi N, Ferraro F, Pavanello S, Furlan D, Celotti L. 1994. Cytotoxic
83 and mutagenic effects of anti- and syn-benzo[a]pyrene diol
84 epoxide in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro* 8:1269-1275.
- 85 Zhang J, Ichiba M, Hanaoka T, Pan G, Yamano Y, Hara K, Takahashi
86 K, Tomokuni K. 2003. Leukocyte 8-hydroxydeoxyguanosine
87 and aromatic DNA adduct in coke-oven workers with polycyclic
88 aromatic hydrocarbon exposure. *Int Arch Occup Environ Health*
89 76:499-504.
- 90 Zavala M, Herndon SC, Wood EC, Onasch TV, Knighton WB, Marr
91 LC, Kolb CE, Molina LT. 2009. Evaluation of mobile emission
92 contributions to Mexico City's emissions inventory using on-road
93 and cross-road emission measurements and ambient data. *Atm*
94 *Chem Phys* 9:6305-6317.