



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ADUCTOS EN EL
DNA DE TEJIDO PULMONAR DE RATAS SPRAGUE-
DAWLEY EXPUESTAS A PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS DE
LA CIUDAD DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JORGE ALFONSO MACIEL RUIZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT
BONAPARTE
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Maciel

Ruiz

Jorge Alfonso

52433114

Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Ciencias

407073634

2. Datos del tutor

Doctora

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

3. Datos del sinodal 1

Doctora

Patricia

Ramos

Morales

4. Datos del sinodal 2

Doctora

Andrea Marisa Gabriela

De Vizcaya

Ruiz

5. Datos de sinodal 3

Doctora

Claudia María

García

Cuellar

6. Datos del sinodal 4

Maestro en Ciencias

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

7. Datos del trabajo escrito

Cuantificación de los niveles de
aductos en el DNA de tejido
pulmonar de ratas Sprague-
Dawley expuestas a partículas
atmosféricas de la Ciudad de
México

64 paginas

2013

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi "*alma mater*" y cobijarme en sus aulas llenando mi vida de satisfacciones y conocimientos, es un orgullo pertenecer a la UNAM y a la Facultad de Ciencias.

A mi tutora, la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por todo su apoyo en la realización de ésta tesis, por su calidez humana y sobre todo darme su apoyo en momentos complicados que tuve que afrontar. Gracias por todas las enseñanzas que he adquirido por haber trabajado en su laboratorio y la confianza brindada. Mi más profundo agradecimiento.

Al Dr. Pavel Petrosyan por sus grandes enseñanzas, sus críticas a éste trabajo, sus aportaciones y sobre todo por la paciencia, sin su ayuda este proyecto no hubiera sido posible. Y por todas las historias contadas.

A mis sinodales, la Dra. Patricia Ramos Morales, la Dra. Andrea de Vizcaya Ruiz, la Dra. Claudia María García Cuellar y al M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera por sus valiosos comentarios y observaciones a este trabajo, sus aportaciones fueron muy importantes para poder culminar ésta tesis.

A la Dra. Julieta Rubio Lightbourn por sus sugerencias y observaciones. A mis compañeros de laboratorio, Lucio, Daniela, Danny, Carla, Maritza, Karla, César, Alan, Celeste, Nydia, Ángel, Cristina, Gerardo y por los que ya no están. Gracias por sus aportaciones, sus consejos y los buenos momentos vividos en el laboratorio.

A todos mis profesores de la Facultad de Ciencias, que al no nombrarlos no significa que no esté agradecido por todas sus enseñanzas y mi crecimiento como estudiante. Por todas las clases, tareas, exámenes, experimentos y prácticas de campo que me enseñaron lo que es la Biología.

A la Técnica Académica Biól. Luz María Chiu Velázquez por su asesoría y ayuda en el manejo del equipo de detección de radiación por centelleo empleado en la técnica de ^{32}P -postlabeling.

A la Fundación Miguel Alemán, quien otorgó una beca durante la realización de este trabajo, en el estudio titulado: "La presencia de aductos en ADN de habitantes de la Ciudad de México y su relación con la contaminación aérea y otros agentes contaminantes ambientales. Un estudio piloto".

A mi familia y amigos:

La culminación de esta etapa de mi vida y de mi formación profesional no hubiera sido posible sin mi familia. Quiero dedicar éste momento a mis padres, saben que todo ésto fue pensando en ustedes y a pesar de los años que no pudimos estar juntos, siempre estuvieron en mi mente, todos los días. Gracias por su incondicional apoyo, gracias por guiarme y dejarme volar, por dejarme crecer. Los quiero mucho y estoy muy orgulloso de la familia que hemos formado y que a pesar de las adversidades siempre estaremos juntos.

A mis hermanos, ustedes me motivaron siempre a querer hacer las cosas bien, saben que tienen a su hermano de manera incondicional, siempre. Gracias por todos los momentos de alegría, las risas, las peleas de niños, sus consejos y puedo decir que me siento muy orgulloso de ustedes. A mis pequeñas sobrinas Monse y Fany, por llegar a nuestras vidas.

A mis abuelitos Elfega y Francisco, mis tíos, y primos. Gracias por todo su apoyo, por su calidez y alegría. A pesar de la distancia, siempre esperé con ansia poder verlos y contarles mi aventura en la biología. Gracias por su cariño, gracias por confiar en mí.

A mis abuelitos Carmen y Margarito, de igual manera tíos y primos. Gracias por haberme abierto las puertas de su casa y haber hecho posible todo esto. Por ayudarme y haberme dado todo su apoyo, estoy profundamente agradecido con todos ustedes.

A mis amigos inseparables, Salvador, Yahir y Santiago. Saben que son y serán mis mejores amigos. Gracias por su confianza y sobre todo las innumerables tardes que pasamos los cuatro. Seguro que nos volveremos a reunir. Gracias. A mis amigos biólogos: Luis, Daniel, Silvia, Casandra. Gracias por su compañía en el camino por conocer la naturaleza, a mis amigas de otros tiempos en la UNAM Edith y Claudia. A mis amigos David, Sergio y Vania. Gracias. Sé que puedo contar con todos ustedes, asimismo saben que tienen un amigo en mí.

A todos los demás amigos y compañeros biólogos, familiares y que me acompañaron estos años, son muchos y no terminaría de mencionarlos. Pero muchas gracias. A aquellas personas que ya no están conmigo, que por algún motivo se han ido. Mi agradecimiento, sé que a algunos los volveré a ver.

Voy por la siguiente aventura en mi vida...

“La única razón para que el tiempo exista, es para que no ocurra todo a la vez”

“Lo más incomprensible del universo, es que sea comprensible”

-Albert Einstein-

Aspirando a lo imposible...

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS | II |
| RESUMEN | VII |
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Material Particulado | 1 |
| 1.1.2 Origen y clasificación de los diferentes tipos de PM | 2 |
| 1.2 Características fisiográficas de la Zona Metropolitana del Valle de México | 3 |
| 1.2.1 Distribución de PM en la ZMVM | 4 |
| 1.3 Composición del material particulado | 5 |
| 1.4 Anatomía de las vías respiratorias y penetrabilidad de las partículas | 6 |
| 1.4.1 Mecanismos de depósito | 7 |
| 1.4.2 Mecanismos de eliminación | 9 |
| 1.5 Biodisponibilidad de los compuestos asociados al PM | 10 |
| 1.6 Bioactivación de xenobióticos a metabolitos reactivos | 12 |
| 1.6.1 Citocromo P450 (CYP) | 13 |
| 1.7 Aductos en el DNA | 14 |
| 1.7.1 Familias de compuestos que generan aductos en el DNA | 15 |
| 1.8 Mecanismos de reparación del DNA | 18 |
| 1.8.1 Mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) | 19 |
| 1.8.2 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) | 20 |
| 1.8.3 Importancia de ERCC1 en la vía NER | 22 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 24 |
| 3. HIPÓTESIS | 25 |
| 4. OBJETIVOS | |
| 4.1 Objetivo general | 25 |
| 4.2 Objetivos Particulares | 25 |
| 5. METODOLOGÍA | |
| 5.1 Grupos experimentales | 26 |
| 5.2 Sistema Versátil de Concentración de Aerosoles (VACES) | 26 |
| 5.3 Obtención de los tejidos pulmonares | 28 |
| 5.4 Extracción de DNA para la determinación de aductos | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.5 Cuantificación de aductos mediante 32P-Postlabeling | 29 |
| 5.6 Extracción de proteína | 32 |
| 5.7 Inmunoblot | 32 |
| 5.8 Densitometría de los Inmunoblots | 34 |
| 5.9 Análisis de datos | 34 |
| 6. RESULTADOS | |
| 6.1 Concentración de PM | 35 |
| 6.2 Niveles de aductos en el DNA | 36 |
| 6.3 Expresión de ERCC1 | 38 |
| 7. DISCUSIÓN | 45 |
| 8. CONCLUSIONES | 55 |
| 9. PERSPECTIVAS | 56 |
| 10. REFERENCIAS | 57 |

RESUMEN

El material particulado (PM) es una mezcla de sustancias, que no son gases, que se encuentran suspendidas en la atmósfera en forma de pequeñas gotas o en forma sólida. El PM es considerado uno de los contaminantes más importantes en las grandes ciudades y para fines prácticos de su estudio se clasifica de acuerdo al diámetro aerodinámico en tres grupos: partículas gruesas, partículas finas y partículas ultrafinas ($10 > 2.5 \mu\text{m}$, $2.5 - 1 \mu\text{m}$ y $< 1 \mu\text{m}$, respectivamente). Las partículas pueden penetrar el sistema respiratorio y depositarse en él, tales procesos dependen del diámetro de las partículas y esto va a determinar los efectos que puedan provocar; siendo las partículas de un diámetro menor las que pueden llegar de manera más profunda en las vías respiratorias.

El PM representa un problema de la calidad del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), debido a factores como la gran afluencia vehicular, las industrias presentes en la zona, la altitud promedio de la ZMVM de 2240 msnm que favorece la formación de partículas y compuestos orgánicos derivados de la combustión de madera o combustibles fósiles, entre otros factores. El PM puede tener asociados diferentes compuestos de naturaleza inorgánica u orgánica, que pueden ser por ejemplo, metales pesados o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), respectivamente, los cuales pueden provocar daño en las células del tejido pulmonar. En el caso específico de los compuestos orgánicos, existen diferentes familias de hidrocarburos que pueden provocar daño en el DNA. Tales compuestos comparten la característica de requerir bioactivación metabólica debido a sus características hidrofóbicas que dificultan su eliminación, sin embargo, cuando esto sucede se generan especies reactivas que pueden unirse covalentemente con biomoléculas y generar aductos. Los aductos en el DNA son considerados como uno de los eventos primarios de la carcinogénesis química ya que pueden provocar mutaciones en genes importantes del control celular, la detección de este tipo de alteraciones es útil como un biomarcador de dosis biológicamente efectiva y también de exposición. Existen mecanismos de reparación encargados de la eliminación de este tipo de alteraciones en el material genético, como el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER).

En este estudio se evaluaron los niveles de aductos en tejido pulmonar de ratas Sprague-Dawley expuestas a partículas atmosféricas concentradas de la ZMVM en un periodo agudo (3 días) y uno subcrónico (8 semanas) con partículas gruesas, finas y ultrafinas. Los niveles de aductos no mostraron diferencias significativas entre ambos periodos de exposición, a pesar de las diferencias en la duración de la exposición, a excepción de los grupos controles, en los cuales se

encontraron diferencias debidas a limitaciones del sistema de concentración de aerosoles empleado en este trabajo. Asimismo, cabe destacar, que de acuerdo con nuestros resultados las partículas finas y en mayor medida las ultrafinas parecen poseer una mayor capacidad de generar aductos respecto a las demás.

Con los resultados obtenidos, para intentar explicar el no incremento en los niveles de aductos en los periodos de exposición agudo y subcrónico, se evaluó la expresión de la proteína Excision repair cross complementing group 1 (ERCC1, elemento importante del sistema NER) para poder analizar la posible acción de los mecanismos de reparación del DNA sobre los niveles de aductos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos de animales tratados con los distintos diámetros de partículas comparándolos entre los periodos de exposición aguda y subcrónica, siendo más elevados en esta última. Finalmente las partículas de la ZMVM son capaces de generar aductos en el DNA en un modelo *in vivo*, en mayor medida las partículas ultrafinas y los niveles de daño observados parecen estar afectados por la inducción de la reparación del DNA, cuestión por la cual no se aprecia un incremento en el daño al DNA debido al tiempo de exposición.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. María Eugenia Gosebatt Bonaparte en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con la Dra. Andrea de Vizcaya Ruiz del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Material Particulado

En general el término de material particulado (PM) se refiere a todos los compuestos presentes en la atmósfera que no son gases, los cuales están suspendidos en el aire en forma de gotas o partículas sólidas o mezclas de ambas (Rana, 2006). La distribución del total de partículas suspendidas (TSPs) en el aire ambiental es trimodal, la cual incluye partículas gruesas, finas y ultrafinas (Pope, 2000; Pope and Dockery, 2006).

De acuerdo con recomendaciones de la Organización Mundial de Salud (WHO, por sus siglas en inglés), en 2003, es conveniente clasificar a las partículas por sus propiedades aerodinámicas debido a que: (a) éstas propiedades determinan el transporte y remoción de partículas en el aire; (b) estas también van a determinar la deposición de las partículas dentro del sistema respiratorio y (c) el tamaño está asociado con la composición química y las fuentes de origen de las partículas. Estas propiedades son convenientemente resumidas por el diámetro aerodinámico para su estudio, debido a que no todas las partículas tienen el mismo diámetro y no son totalmente esféricas, la clasificación de acuerdo al diámetro aerodinámico sigue la ley de fluidos de Stokes (Manahan, 2010), en la cual la velocidad de sedimentación de una partícula estará en función del diámetro de partícula y la densidad, y se calcula con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{gd^2(\rho_1 - \rho_2)}{18\eta}$$

Donde V es la velocidad de sedimentación expresada en cm/s, g es la aceleración de la gravedad en cm/s², ρ1 es la densidad de la partícula expresada en g/cm³, ρ2 es la densidad del aire igualmente expresada en g/cm³ y η es la viscosidad del aire expresada en Poises.

El diámetro aerodinámico es el diámetro de una partícula esférica que tiene la misma velocidad de sedimentación que otra partícula independientemente de su forma, tamaño o densidad. El usar diámetros aerodinámicos permite a los especialistas en higiene

ocupacional comparar partículas de diferentes tamaños, formas y densidades en términos de cómo se sedimentan en la corriente de flujo de aire (CCSSO, 1999).

1.1.2 Origen y clasificación de los diferentes tipos de PM

Las partículas atmosféricas son un constituyente natural de la atmósfera, ya que se generan a partir de procesos como la erosión del suelo, los incendios forestales, el desprendimiento del polen de la vegetación y las erupciones volcánicas (Pope and Dockery, 2006), sin embargo, también pueden ser originadas a partir de actividades humanas.

Las partículas más grandes, se originan principalmente por disrupción mecánica de materiales sólidos que involucran procesos de rompimiento, pulverización o abrasión de materiales o por polvo suspendido en el aire. Entre las principales fuentes de estas partículas se encuentran la agricultura, las actividades industriales, la construcción y demolición de edificaciones, los caminos no pavimentados, cenizas y los granos de polen, esporas y partes pequeñas de insectos y plantas (WHO, 2003; Pope and Dockery, 2006). Estas pueden ser clasificadas como $PM \leq 10 \mu m$ de tamaño aerodinámico y llamadas PM_{10} , o clasificadas como partículas gruesas por su comportamiento modal en el aire con un tamaño aerodinámico de 10 a $2.5 \mu m$ ($PM_{10.2.5}$).

Por otro lado, las partículas finas pueden originarse a partir de gases y condensación de vapores a altas temperaturas durante la combustión; o absorción de compuestos químicos; las principales fuentes de partículas finas son la quema de combustibles fósiles y madera, procesos de fundición y procesamiento de metales, el uso de vehículos que utilizan gasolina o diesel, plantas de cemento o fábricas de papel (Pope and Dockery, 2006).

Las partículas más pequeñas, menores a $1 \mu m$, conocidas como partículas ultrafinas, son formadas por procesos de nucleación, que es la condensación de vapores a baja presión formadas por vaporización de sustancias a altas temperaturas o por reacciones fotoquímicas en la atmósfera (Brunekreef and Holgate, 2002; WHO, 2003; Pope and

Dockery, 2006). Las partículas en nucleación pueden crecer por medio de procesos de coagulación y condensación, el primero se refiere a la combinación de dos o más partículas para formar una más grande y el segundo a la condensación de gases en la superficie de partículas ya existentes. La eficiencia de los procesos de coagulación y condensación es menor con el aumento en el tamaño de la partícula, lo cual produce un límite en el que las partículas no pueden desarrollarse por estos procesos más allá de 1 μm aproximadamente, entonces las partículas tienden a acumularse entre 0.1 y 1 μm , denominado rango de acumulación (Figura 1) (WHO, 2003).

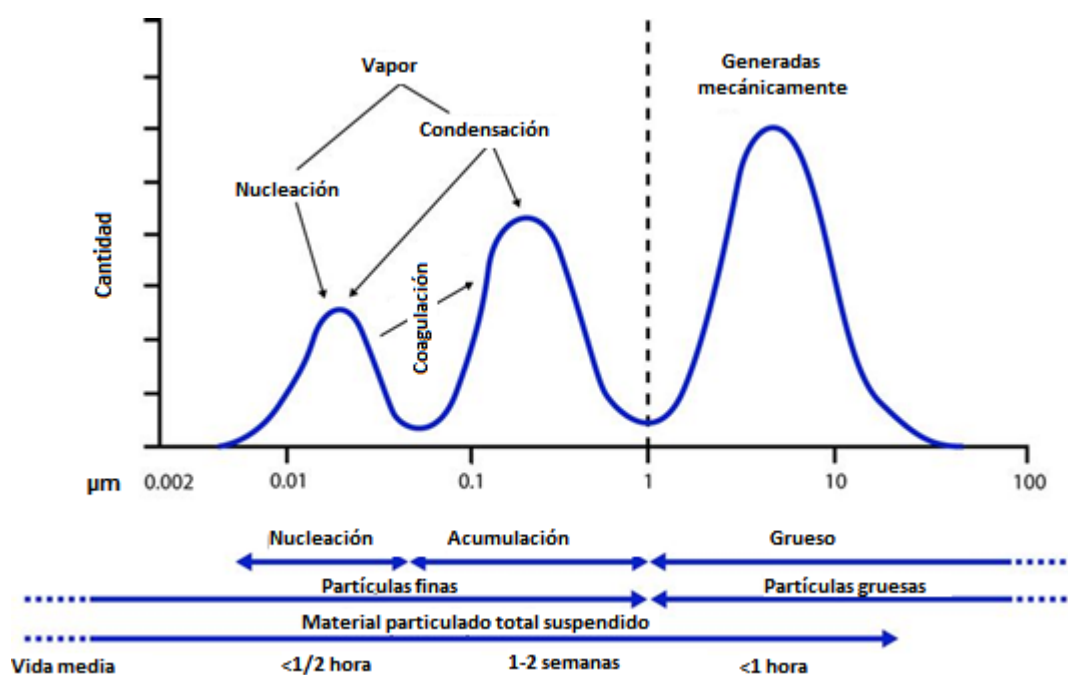


Figura 1: Comportamiento y vida media de las partículas, donde se muestran los procesos de nucleación, condensación y coagulación. Modificado de "Aerodynamic Behavior of Aerosols" de Salud Ambiental. Disponible en: <http://ocw.jhsph.edu>. DerechosReservados© Johns Hopkins Bloomberg Escuela de Salud Pública.

1.2 Características fisiográficas de la Zona Metropolitana del Valle de México

De acuerdo a la descripción de la Secretaria de Medio Ambiente (SMA) del Gobierno del Distrito Federal (GDF) en 2008, la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) abarca una superficie de 7,732 km^2 , de la que el 19% lo cubre el Distrito Federal y el 81%

restante, el Estado de México; se ubica en la parte “este” de la región conocida como Sistema Neovolcánico Transversal, formando parte del ecosistema de bosque templado, además de poseer una altitud promedio de 2240 metros sobre el nivel del mar.

La altitud en la que se encuentra la ZMVM ocasiona que los procesos de combustión sean deficientes y por lo tanto sean emitidas mayores cantidades de contaminantes debido a una concentración de oxígeno 23% menor a la que se puede encontrar al nivel del mar; la posición latitudinal es otro factor involucrado en la generación de contaminantes, ya que la radiación solar al ser intensa acelera la formación fotoquímica de contaminantes atmosféricos; sumado a esto, las cadenas montañosas que rodean a la ZMVM no permiten el libre flujo de corrientes de aire que desplacen los contaminantes.

En la ZMVM se presentan varios subtipos de climas, como resultado de las diferencias de elevación y relieve del terreno: templado con lluvias en verano, templado húmedo y subhúmedo con lluvias en verano y por último, el clima seco. Además la temporada de lluvias y la humedad relativa alta inicia a mediados de mayo y se vuelve más evidente entre junio y octubre. Un aspecto importante de la precipitación pluvial es que propicia un efecto de “lavado troposférico”, lo cual favorece una mejor calidad del aire de la zona, puesto que disminuye la generación de partículas.

1.2.1 Distribución de PM en la ZMVM

Con datos de la SMA-GDF del año 2008, la distribución espacial de las emisiones de PM₁₀ (Figura 2), nos muestra una alta concentración en la región central de la ZMVM en su mayoría sobre el Distrito Federal, las emisiones son generadas principalmente por la intensa actividad vehicular; en el caso de las zonas periféricas, las emisiones son atribuidas a las vialidades sin pavimentar. En algunas zonas, las emisiones son resultado de la combinación de las fuentes móviles y de la actividad industrial. El patrón de distribución de las emisiones de PM_{2.5} es similar al anterior, donde las emisiones del centro son originadas por las fuentes móviles y en los municipios cercanos al Norte del Distrito Federal, son debidas a las fuentes puntuales (SMA-GDF, 2008; García-Suástegui, *et al.*, 2011).

En el caso del Estado de México, los municipios de Tlalnepantla de Baz, Ecatepec, Acolman, Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza, Tultitlan y Cuautitlán Izcalli son los que presentan una mayor concentración de PM_{10} y $PM_{2.5}$. En el caso de los tres primeros municipios, las emisiones además de ser de fuentes móviles, son derivadas de actividades de producción de materiales para la construcción, fundición y moldeo de productos metálicos, así como por la generación de energía eléctrica.

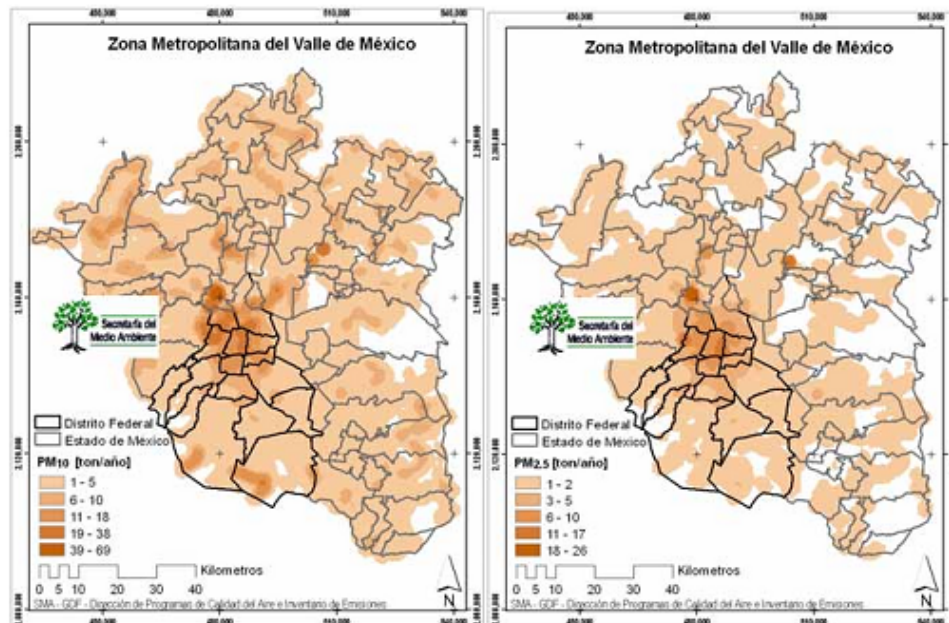


Figura 2: Izquierda: distribución espacial de PM_{10} en la ZMVM. Derecha: distribución espacial de $PM_{2.5}$ en la ZMVM. Tomado de SMA, 2008.

1.3 Composición del material particulado

El material particulado o partículas atmosféricas es una mezcla heterogénea de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos adsorbidos o absorbidos a un núcleo de carbono. Las propiedades que determinan la peligrosidad de PM pueden ser de carácter físico o químico, como el tamaño de la partícula, el número de estas mismas o el área de superficie; también la acidez de las partículas determinada por las concentraciones de H^+ , SO_4^{-2} , NO_3^- y NH_4^+ . Los compuestos orgánicos o inorgánicos asociados a éstas como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), nitrosaminas o aminas aromáticas, sales y metales de transición y además componentes biológicos como alérgenos o endotoxinas

también participan en la toxicidad del PM (Donaldson and Stone, 2003; Gutiérrez-Castillo, *et al.*, 2005).

En estudios realizados en la Ciudad de México en los que se ha analizado la composición de las partículas atmosféricas PM_{2.5} y PM₁₀, se ha visto que uno de los principales componentes del material particulado presente en la ciudad, es el carbono elemental (EC) y el carbono orgánico (OC), este último en mayor proporción (De Vizcaya-Ruiz, *et al.*, 2006; Mugica, *et al.*, 2008; Mugica, *et al.*, 2009; Valle-Hernández 2010). Dentro del OC están una serie de compuestos que ya se han mencionado como los PAHs, nitrosaminas y aminas aromáticas, los cuales tienen una enorme relevancia porque estos compuestos carbonados pueden llegar a ser muy dañinos ya que son agentes mutagénicos y carcinogénicos y pueden tener efectos adversos en la salud.

La abundancia relativa de los diferentes tamaños de partículas determina cuáles son aquellas que pueden resultar más dañinas. Por ejemplo, las partículas ultrafinas son las que poseen un mayor potencial genotóxico por su composición y el nivel de absorción que poseen, siendo consideradas como partículas respirables. Sin embargo tienden a aumentar de tamaño a partículas finas por procesos de nucleación, de tal manera que la vida media de estas partículas disminuye, por lo que las partículas finas pueden ser las que representan el mayor riesgo a la salud debido a su abundancia y no tanto por su composición (Topinka, *et al.*, 2010).

1.4 Anatomía de las vías respiratorias y penetrabilidad de las partículas

La anatomía de las vías respiratorias se divide en tres regiones: 1) nasofaríngea cuya principal función es olfatear, calentar, humedecer y filtrar el aire inhalado, 2) traqueobronquial, su función es favorecer la humidificación y filtración del aire y conducirlo de las vías aéreas superiores a la región de intercambio gaseoso, y 3) región alveolar de intercambio gaseoso, que incluye a los bronquiolos terminales y respiratorios y a los ductos y sacos alveolares, que contiene a los alvéolos, en donde se realiza el intercambio gaseoso (Debray, 2010).

De acuerdo al grado de penetración que pueden tener los diferentes tipos de partículas, éstas pueden denominarse de la manera siguiente: "partículas inhalables", que pasan a las vías respiratorias superiores (nariz y boca); "las partículas torácicas", que se depositan en las vías respiratorias inferiores o en la región traqueobronquial y "partículas respirables", que penetran a la región de intercambio gaseoso en los pulmones o región alveolar (Figura 3) (Brunekreef and Holgate, 2002; WHO, 2003).

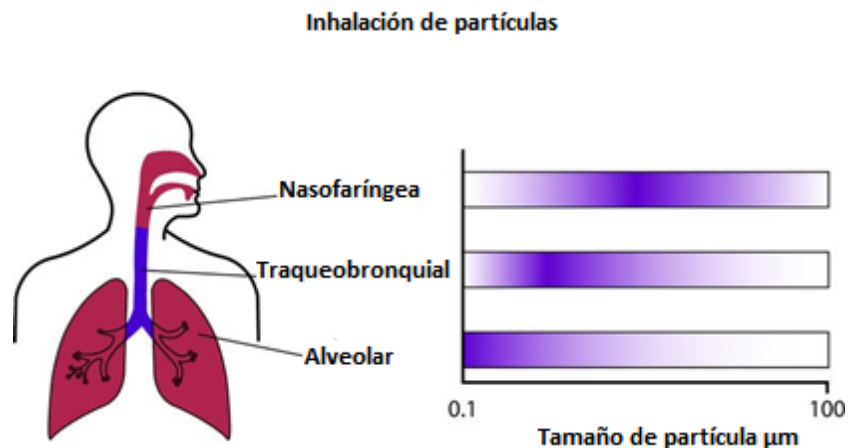


Figura 3: Grado de penetrabilidad de las partículas en las vías respiratorias de acuerdo al tamaño. Modificado de: "Particle inhalation" de impacto de la Influenza Pandémica en la Salud Pública. Disponible en: <http://ocw.jhsph.edu>. Derechos Reservados© Johns Hopkins Bloomberg Escuela de Salud Pública.

1.4.1 Mecanismos de depósito

De las fosas nasales a los pulmones, el aire que es inhalado sigue una compleja vía, en la que inicialmente el aire aspirado entra relativamente a alta velocidad en la nariz y pasa a la cavidad nasal. En la región traqueobronquial, la velocidad del aire es moderada, debido al aumento del área de la sección transversal de las vías respiratorias en cada bifurcación. Finalmente en la región pulmonar, la velocidad del aire es muy baja debido que ahora el volumen de aire inspirado está distribuido en una gran área alveolar de intercambio gaseoso. De acuerdo a Valentine y Kennedy (2008), los diferentes mecanismos de depósito de partículas están determinados por el tipo de partícula y las características individuales de la anatomía del tracto respiratorio. Tales mecanismos incluyen la impactación, sedimentación, interceptación y difusión y se ilustran en la Figura 4.

- **Impactación:** cuando un flujo de aire cambia de dirección, la inercia de alguna partícula suspendida puede causar que continúe en su dirección original por algún corto tiempo antes de que ocurra el cambio de dirección. Así, la impactación sucede cuando las características de las partículas son tales que no pueden seguir la corriente de aire, las partículas salen del flujo y se impactan sobre la superficie de las vías respiratorias. La impactación es el proceso principal en partículas mayores a $1\ \mu\text{m}$ y en regiones del tracto respiratorio donde la velocidad del aire es alta y los cambios de las corrientes de aire son abruptos.
- **Sedimentación:** las partículas suspendidas en un gas pueden poco a poco depositarse por influencia de la gravedad. La velocidad en la cual las partículas se depositan es proporcional a la densidad de la partícula y al cuadrado de su diámetro. La sedimentación es también un mecanismo importante en partículas mayores a $1\ \mu\text{m}$ y en regiones en las que la velocidad del aire es baja.
- **Intercepción:** la intercepción ocurre cuando la trayectoria de las partículas es lo suficientemente cercana a la pared de la vía respiratoria tal que la partícula entra en contacto con la superficie. La intercepción es un mecanismo importante de depósito de fibras. Las fibras generalmente se alinean en la misma dirección que la corriente de aire, sin embargo cuando la dirección del flujo cambia como sucede en las ramificaciones de las vías respiratorias el depósito de la partícula puede ocurrir. La intercepción incrementa las turbulencias de las corrientes de aire y disminuye el diámetro de la vía respiratoria.
- **Difusión:** las moléculas de gas que rodean a las partículas de aerosoles, continuamente golpean a estas partículas, induciendo un movimiento aleatorio de las partículas, conocido como "movimiento browniano". Este proceso es inversamente proporcional al diámetro de partícula, pero es dependiente de su densidad. La difusión no representa un mecanismo de depósito importante para aquellas partículas mayores a $0.5\ \mu\text{m}$, pero si representa el principal mecanismo de depósito en los alvéolos cuando la velocidad de la corriente de aire es baja.

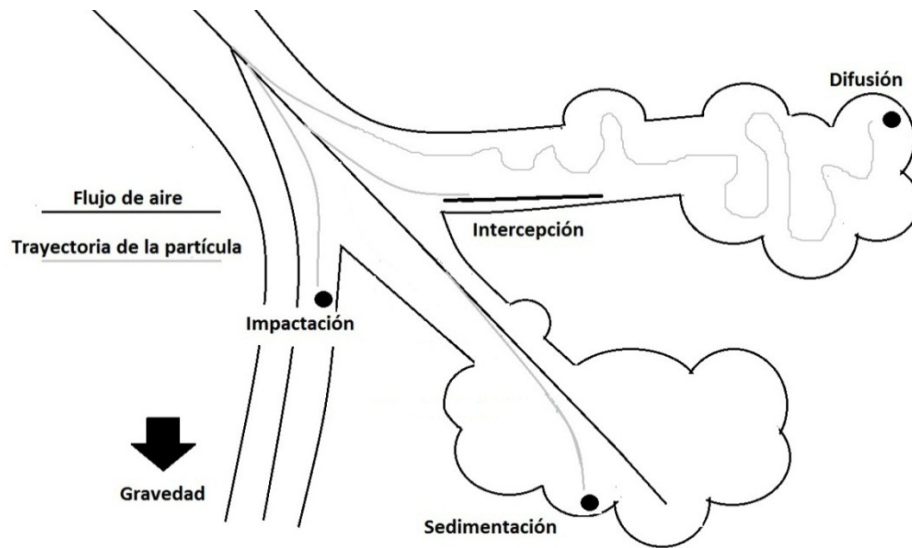


Figura 4: Mecanismos de depósito de las partículas en las vías respiratorias. Modificado de Valentine and Kennedy, 2008.

1.4.2 Mecanismos de eliminación

Existen diferentes mecanismos de eliminación de las partículas de las vías respiratorias, los cuales van a depender del tamaño de éstas y de la región en la que se encuentre localizada (Valentine y Kennedy, 2008; Tabla 1). En la región nasofaríngea, los vellos nasales filtran las partículas más grandes y las partículas que logran pasar esa barrera se adhieren en una mucosidad que recubre al epitelio respiratorio no ciliado, las cuales son removidas generalmente por estornudos o limpieza de la nariz. Las partículas que se depositan en la región más distal de la cavidad nasal son eliminadas por una capa de moco que recubre a un epitelio ciliado que mediante movimientos coordinados (transporte mucociliar) impulsa el moco a la región nasofaríngea en donde pueden ser eliminadas por engullimiento o expectoración. De la misma manera en la región traqueobronquial, el principal mecanismo de eliminación de partículas es por medio de transporte mucociliar. Aquí, las partículas son transportadas hacia la región nasofaríngea para ser removidas por engullimiento o expectoración.

En la región alveolar, los mecanismos de eliminación de partículas son diferentes. Ocurren por procesos de disolución, fagocitosis y admisión al sistema vascular o por el sistema linfático.

El proceso de disolución ocurre en el fluido de revestimiento de las vías respiratorias y los alvéolos. Los componentes de las partículas se disuelven y pasan al intersticio celular o al sistema linfático para posteriormente llegar a la sangre. Los macrófagos son el principal mecanismo de eliminación de partículas ya que la capa de moco y el epitelio ciliado están ausentes en los alvéolos; estas células fagocitan partículas o fibras que se encuentran hasta la región terminal del epitelio ciliado. Finalmente partículas libres o asociadas a macrófagos puede entrar al sistema linfático y ser translocadas a los ganglios linfáticos traqueobronquiales, donde se pueden acumular o pasar al torrente sanguíneo. Las partículas que no son eliminadas por medio del sistema linfático o por rutas bronquiales, pueden eventualmente migrar dentro del intersticio hacia la pleura donde pueden cruzar el endotelio vascular y llegar al torrente sanguíneo.

Tabla 1: Eliminación de partículas

| Región anatómica | Mecanismo de eliminación | Tiempo medio de eliminación |
|-------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Nasofaríngea | Transporte mucociliar | Minutos |
| Traqueobronquial | Transporte mucociliar | Minutos-horas |
| Alveolar | Macrófagos | Días-semanas |
| Alveolar | Migración intersticial | Meses |
| Alveolar | Disolución | Meses-años |

Modificado de Valentine and Kennedy, 2008

1.5 Biodisponibilidad de los compuestos asociados al PM

Los compuestos orgánicos asociados al PM tienen características químicas que los hacen liposolubles y estas mismas propiedades hacen que puedan ser absorbidos con facilidad por los pulmones, el intestino o la piel. En el caso de la absorción en las vías respiratorias, después del depósito de las partículas, los PAH asociados al PM pueden ser removidos

parcialmente en la mucosa ciliada durante su transporte y pueden estos penetrar a las células del epitelio bronquial donde su metabolismo puede llevarse a cabo (WHO, 2000).

Los PAH son absorbidos por ingestión, inhalación o absorción dérmica. Seguido de la absorción, los PAH pueden entrar en la linfa y el flujo sanguíneo. El benzo[a]pireno (B[a]P) es un compuesto aromático utilizado ampliamente para investigar los efectos y el metabolismo de los PAH y otros compuestos aromáticos. En el caso del B[a]P, este es fácilmente absorbido por el intestino y tiende a localizarse principalmente en el tejido adiposo o en tejidos ricos en lípidos con las glándulas mamarias. La desaparición del B[a]P en sangre, después de una inyección intravenosa en rata es muy rápida, teniendo una vida media de aproximadamente 5 minutos. La rápida desaparición de los compuestos orgánicos es debida al metabolismo y sobre todo a su distribución en los tejidos (Kulkarni and Mehendale, 1998).

Sin importar la ruta de administración, los PAH son distribuidos ampliamente y de manera muy rápida en el organismo. El patrón de distribución es muy similar cuando la administración es intravenosa o intratraqueal. Niveles detectables de B[a]P pueden ser observados en la mayoría de los órganos internos entre los primeros minutos-horas después de su administración. El B[a]P puede cruzar fácilmente la barrera placentaria y llegar al feto de manera directa (WHO, 2000).

La inhalación de ^{14}C -B[a]P asociado a partículas de carbón en ratas, resulta en niveles 100 veces más altos de ^{14}C en pulmones de ratas al final de la semana 12 de exposición, comparándolos con ratas que solo fueron expuestas a ^{14}C -B[a]P. Asimismo, el descenso de tales niveles de radiación, en las ratas expuestas a ^{14}C -B[a]P asociado a partículas de carbón, se observó en la semana 34 después de la exposición, y en las ratas expuestas solo con ^{14}C -B[a]P alrededor de la semana 6 (Wolff, *et al.*, 1989; WHO, 2000); esto debido a que las partículas y los compuestos asociados a estas permanecen más tiempo en el tejido pulmonar y su eliminación es más lenta.

1.6 Bioactivación de xenobióticos a metabolitos reactivos

Los organismos superiores tienen dos formas de manejar compuestos lipofílicos, la primera consiste en almacenarlos en compartimentos lipofílicos dentro del cuerpo, esto sucede cuando los compuestos son extremadamente lipofílicos, por ejemplo, compuestos policlorados que son muy difíciles de metabolizar; normalmente estos compuestos permanecen secuestrados en éstos compartimentos por meses o años, por lo tanto no son tan peligrosos (Boelsterli, 2007). La segunda forma es convertir enzimáticamente los compuestos lipofílicos a especies más hidrofílicas. Este proceso es denominado biotransformación (metabolismo de xenobióticos) el cual consiste de dos principales tipos de reacciones. El agente es primero sustrato de un amplio espectro de enzimas oxidantes (metabolismo de fase I) que introduce grupos polares en las moléculas y hace a las moléculas sustratos más adecuados para la conjugación (metabolismo de fase II) con moléculas endógenas (Tabla 2) (Franklin and Yost, 2000; Boelsterli, 2007; Gooderham and Carmichael, 2007; Phillips, 2007). El conjugado resultante es sustancialmente más soluble en agua que los compuestos anteriores y así es más fácil de excretar por el organismo. Los metabolitos de fase I se forman a menudo a través de la generación transitoria de compuestos reactivos tales como epóxidos, pero se convierten rápidamente en grupos hidroxilo por conversión enzimática o no enzimática por reacción con el agua. Sin embargo, su presencia en la célula puede dar lugar a la reacción con macromoléculas (Gooderham and Carmichael, 2007; Phillips, 2007).

Los agentes químicos que requieren conversión metabólica para poder ejercer su efecto carcinogénico pueden ser llamados pro-carcinógenos y aquellos metabolitos que poseen una reactividad electrofílica muy elevada son llamados carcinógenos finales (Gooderham and Carmichael, 2007).

Tabla 2: Resumen de las principales reacciones de funcionalización y conjugación involucradas en la biotransformación de xenobióticos.

| Enzima (familias) | Función |
|---|---|
| Fase I | Sustrato funcionalización |
| | Oxidación o reducción, incluyendo hidroxilación aromática o alifática, epoxidación |
| Citocromo P450 (CYP) | <i>N</i> -, <i>O</i> -, o <i>S</i> -desalquilación, <i>N</i> -hidroxilación, sulfoxidación, desulfuración, deshalogenación oxidante |
| Monoxigenasa dependiente de flavina (FMO) | <i>N</i> - y <i>S</i> -oxidación |
| Peroxidasa (Px) | Reducción de hidroperóxidos a alcoholes |
| Carbonilesterasa; Amidasa | Hidrólisis de ésteres o enlaces peptídicos |
| Alcohol deshidrogenasa (ADH) | Oxidación de alcoholes a aldehídos |
| Epóxido hidrolasa (EH) | Hidrolisis de epóxidos a dihidrodioles |
| Fase II | Sustrato conjugación |
| Uridin difosfato (UDP) – Glucuronosil transferasa (UGT) | Transferencia de ácido glucorónico (del ácido UDP-glucorónico) al xenobiótico |
| Sulfotransferasa (SULT) | Transferencia de sulfato (del fosfoadenosin fosfosulfato) al xenobiótico |
| <i>N</i> -acetiltransferasa (NAT) | Transferencia de acetato (de la acetil-CoA) al xenobiótico |
| Glutación- <i>S</i> -transferasa (GST) | Transferencia de glutación al xenobiótico |

Modificado de Boelsterli, 2007.

1.6.1 Citocromo P450 (CYP)

Los citocromo P450 son una superfamilia de enzimas encontradas en algunos procariontes y en todos los eucariontes, se han encontrado de 400 a 2000 genes de CYP (Rose and Hodgson, 2004; Boelsterli, 2007) (tan solo en *Drosophila melanogaster* se han identificado 90 genes distintos), a su vez muchas isoformas con especificidad distinta o parcialmente superpuestas han sido descritas en mamíferos e insectos. Son muy importantes en la biotransformación de muchos compuestos endógenos (esteroides, ácidos biliares, ácidos

grasos y prostaglandinas) y exógenos (contaminantes ambientales, fármacos, compuestos contenidos en plantas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros) (Boelsterli, 2007).

En los vertebrados el hígado es la fuente más abundante de CYP y la más activa en la monooxigenación de xenobióticos. CYP y otros componentes del sistema de monooxigenasas dependientes de CYP han sido encontrados también en piel, mucosa nasal, pulmón, tracto gastrointestinal, posiblemente reflejando la evolución de los mecanismos de defensa en sitios de entrada o exposición en el cuerpo. En el hígado, las CYPs metabolizan una gran cantidad de xenobióticos tales como esteroides endógenos y pigmentos biliares; las CYPs en el pulmón parecen también estar destinadas primariamente con oxidaciones de xenobióticos, sin embargo el rango de sustratos parece estar más restringido que en el hígado; la piel y el intestino delgado donde también pueden llevar a cabo oxidaciones, pero sus actividades no están bien caracterizadas (Rose and Hodgson, 2004).

1.7 Aductos en el DNA

Algunos xenobióticos y sus metabolitos son reactivos porque exhiben un centro intramolecular caracterizado por una densidad baja de electrones (tales moléculas son llamadas electrófilos), estos centros electrofílicos pueden ser atacados preferencialmente por un centro con un alto número de electrones de otra molécula (denominados nucleófilos), cuando tales centros reaccionan se obtiene como resultado un enlace covalente o aducto; los blancos nucleofílicos en el DNA son predominantemente sitios con alta densidad electrónica, como lo son los átomos de oxígeno y nitrógeno presentes en las bases que componen a los ácidos nucleicos, además existen otros factores que determinan el sitio y la manera en la que se forman los aductos, entre ellos están la secuencia del DNA o en su caso de la proteína, el tamaño y la reactividad de las especies electrofílicas, impedimentos estéricos, entre otros (Boelsterli, 2007). Tales uniones de compuestos carcinógenos en el DNA resultan en la formación de una base nitrogenada alterada químicamente (Phillips, 2007).

Las principales uniones covalentes de carcinógenos en el DNA involucran la modificación de las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas), a través de algunos agentes que reaccionan con los enlaces fosfodiéster. La guanina es la base más comúnmente atacada por moléculas electrofílicas o carcinógenos potenciales y por lo tanto más extensamente modificada, con interacciones que ocurren en N², N-3, O⁶, N-7 y C-8 (Boelsterli, 2007; Phillips 2007). Los aductos en la adenina son formados en los átomos N-1, N-3, N⁶ y N-7. Los aductos en las pirimidinas son formados en O², N-3, N⁴ y C-5 en la citosina, y O² y O⁴ en la timina (Phillips, 2007).

Algunos compuestos no son capaces de alterar la estructura helicoidal del DNA (agentes metilantes), otros compuestos promueven la conversión de B-DNA a Z-DNA, pueden llevar a la desnaturalización del DNA o causar distorsiones en la doble hélice (moléculas voluminosas "Bulky adducts", como los PAH o la aflatoxina B1) lo que podría llevar a errores en la replicación debido a la actividad de las polimerasas (Phillips, 2007; Schorr, 2010). Los aductos que deforman el DNA son reparados más rápido que aquellos aductos que no provocan cambios en la doble hélice (Schorr, 2010).

1.7.1 Familias de compuestos que generan aductos en el DNA

Entre las clases de compuestos que son capaces de formar "bulky adducts" o aductos abultados o voluminosos, se pueden mencionar a las *N*-nitrosaminas, las aminas aromáticas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Beland and Poirier, 1994).

- ***N*-nitrosaminas:** Las nitrosaminas son un grupo de compuestos químicos que se han visto asociados a diversos tipos de tumores, la mayoría de los más de 400 compuestos *N*-nitrosos que han sido evaluados han mostrado ser carcinógenos, como resultado de ello, las *N*-nitrosaminas han sido consideradas como potentes compuestos carcinógenos. La activación metabólica de estos compuestos es inicialmente mediante la α -hidroxilación, por lo cual aquellas *N*-nitrosaminas que posean un α -hidrógeno tienen un potencial carcinogénico más alto (Wood and Lai, 2010). Los aductos predominantes en el DNA son los *N*-alquilpurinas (7-guanina y 3-adenina) los cuales son reparados por la acción de enzimas glicosilasas como la glicosilasa 3-metiladenina,

generando sitios apurínicos que si no son reparados correctamente, se pueden generar mutaciones (Shuker and Bartsch, 1994).

No existe evidencia para creer que los humanos tengan diferencias con los modelos experimentales animales en su capacidad de metabolizar *N*-nitrosaminas y formar agentes alquilantes que reaccionen con el DNA (Shuker and Bartsch, 1994).

- **Aminas aromáticas:** Las aminas aromáticas fueron unos de los primeros compuestos químicos que se consideraron carcinógenos en humanos y en modelos experimentales animales debido a los efectos genotóxicos que estos presentan a través de la formación de aductos en el DNA; fuentes de exposición a estos compuestos son los lugares de trabajo, el humo del tabaco, alimentos carbonizados o la contaminación ambiental (Kadlubar, 1994).

La vía de activación predominante en este tipo de compuestos es la oxidación del grupo amino que genera un ion nitrenio electrofílico, el cual puede ser estabilizado por resonancia siendo lo suficientemente estable como para viajar del sitio de activación y poderse unir al DNA; la estructura molecular plana hace que la intercalación con el DNA sea posible y se pueda unir con las bases nitrogenadas además que esto facilita su metabolismo (Woo and Lai, 2010).

Para la mayoría de las aminas aromáticas carcinógenas, el derivado (aril-NH)-C8-dG, representa el aducto carcinógeno predominante formado *in vivo* después de tratamientos agudos o crónicos (Kadlubar, 1994).

- **Hidrocarburos aromáticos policíclicos:** A pesar de que esta familia de compuestos es bien conocida por tener un gran potencial carcinógeno, realmente sólo algunos compuestos son realmente potentes. Prácticamente todos los PAH son carcinógenos potentes contienen de 4-6 anillos con una región "bahía" porque la activación metabólica del anillo diol epóxido de la región bahía ha demostrado ser clave en la vía metabólica. La apertura del anillo epóxido genera un ion carbonilo electrofílico que puede ser estabilizado por el sistema de anillos y dar tiempo suficiente para que se

pueda unir al DNA. Otras características estructurales que pueden incrementar el potencial carcinogénico de los PAH son el bloqueo de la región L por fusión de anillos que evita la formación de conjugados con glutatión, evitando así su eliminación y la presencia de un grupo metilo muy cercano a la región bahía que la distorsiona ligeramente (Wood and Lai, 2010).

Estas modificaciones covalentes del DNA, normalmente en las bases, son generalmente consideradas como uno de los eventos primarios en la carcinogénesis química. Durante la replicación celular los aductos en el DNA pueden resultar directamente en mutaciones en genes que controlan el crecimiento y ciclo celular y así favorecer la formación de una neoplasia (Gooderham and Carmichael, 2007).

En estudios *in vitro*, se ha encontrado en el caso de los PAH la formación de BDPE DNA-aductos secuencia-específica en el gen *p53* en células de epitelio bronquial, ocurriendo estos en las mismas posiciones en las que se producen la mayoría de las mutaciones en el gen *p53* en cáncer pulmonar humano. Asimismo se ha observado que la formación de aductos en el DNA tienen la capacidad de activar pro-oncogenes como *H-ras* (Godschalk *et al.*, 2002).

Estas modificaciones covalentes han sido estudiadas con gran interés como biomarcadores de riesgo a cáncer en modelos animales (Poirier, 1997); la formación de aductos y la subsecuente formación de mutaciones son considerados causas necesarias pero no suficientes en la vía de exposición a carcinógenos químicos que lleva al desarrollo de cáncer (Poirier, 1997; Rundle, 2006).

En la epidemiología molecular, los aductos en el DNA han sido considerados como biomarcadores de dosis efectiva de un carcinógeno, esto es, representan la cantidad del carcinógeno absorbida por el cuerpo, la cual escapa de los mecanismos de desintoxicación, llegando a causar alteraciones en macromoléculas de la célula y que al no ser reparadas, pueden ser detectadas. Los aductos son considerados también biomarcadores útiles en estudios epidemiológicos en los cuales se intenta demostrar que la exposición ambiental a un xenobiótico puede causar cáncer; asimismo la medición de

los aductos se ha encontrado útil en otras áreas de la investigación como la evaluación de la exposición, estudios de los efectos en polimorfismos en genes de metabolismo o reparación del DNA (Rundle, 2006).

Los aductos se forman típicamente en concentraciones *in vivo* muy bajas, aproximadamente <3 aductos/ 10^5 nucleótidos, lo cual representa una gran dificultad para cuantificarlos, sin embargo con la llegada de nuevas técnicas como el inmunoensayo o el ^{32}P -postlabeling, la cuantificación de los aductos presentes en poblaciones humanas ha sido posible (Beland and Poirier, 1994).

La formación de aductos ha sido reconocida como una propiedad común de algunos carcinógenos y la formación de tales aductos es la base de varias estrategias actuales en epidemiología molecular y biomonitorio (Dipple, 1995).

1.8 Mecanismos de reparación del DNA

La integridad de DNA genómico, está siendo continuamente alterada por productos endógenos del metabolismo celular o por infinidad de agentes ambientales, que pueden inducir varios tipos de daño en el DNA, los cuales pueden ir desde simples alteraciones en las bases nitrogenadas a lesiones que distorsionan de manera importante la doble hélice, estas alteraciones pueden tener como resultado disfunciones celulares tales como inestabilidad genética, mutagénesis o muerte celular (Balajee and Bohr, 2000; Costa *et al.*, 2003). Las lesiones generadas de manera endógena pueden ser resultado de procesos de hidrólisis, oxidación y metilación no enzimática del DNA. Ejemplos de agentes exógenos son la radiación ionizante, radiación ultravioleta y la exposición a agentes químicos (Melis *et al.*, 2011).

Los organismos, ya sean procariontes o eucariontes están, equipados con diversas vías de reparación para proteger la integridad del DNA, las principales formas de reparación incluyen reparación reversa directa, reparación por escisión, reparación por recombinación y post-replicación. Los dos principales mecanismos de reparación por escisión son: el mecanismo de reparación de escisión de bases (BER) y el mecanismo de

reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Balajee and Bohr, 2000). BER remueve bases nitrogenadas dañadas por radiación ionizante, especies reactivas de oxígeno, desaminación espontánea y agentes alquilantes monofuncionales, en cambio NER es eficiente removiendo aductos (bulky adducts) en el DNA, dímeros de pirimidina de ciclobutano y fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (Balajee and Bohr, 2000; Memisoglu and Samson, 2000; González-Pumariega *et al.*, 2009).

1.8.1 Mecanismo de reparación por escisión de bases (BER)

El mecanismo de reparación BER puede ser dividido en 5 fases (ver Figura 5) extracción de la base por medio de la actividad de DNA glicosilasas, incisión en el sitio apurínico/apirimídico (sitio AP) resultante por medio de una AP endonucleasa, procesamiento del punto de término bloqueado, rellenado del espacio vacío y ligamiento del segmento sintetizado (Fortini, *et al.*, 2003).

En el mecanismo BER, un grupo de glicosilasas se encargan de reconocer bases dañadas o anormales y actúan rompiendo el enlace glicosídico que une a la base con el azúcar en la cadena de DNA, formando sitios AP, tales sitios AP pueden ser formados además de manera espontánea o ser inducidos de diversas maneras, ya sea por factores físicos o químicos. Sobre los sitios AP, pueden actuar AP endonucleasas o AP liasas para generar un rompimiento de cadena sencilla sobre el DNA. En células de mamíferos, la vía de reparación puede ser de dos maneras, la vía "short-patch BER" en la cual sólo un nucleótido es reemplazado y la vía "long-patch BER" en la cual son removidos 2-13 nucleótidos (Memisoglu and Samson, 2000; Fortini, *et al.*, 2003). En el primer caso, el nucleótido extraído es resintetizado por medio la polimerasa β y X-Ray cross complementing group 1 (XRCC1) y ligado por medio de la DNA ligasa III, en la segunda sub-vía el segmento es resintetizado por medio de un complejo formado por la polimerasa β y δ/ϵ , antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), factor de replicación-C (RFC) y "flap" endonucleasa 1 (FEN1). Finalmente el segmento (Fontini, *et al.*, 2003).

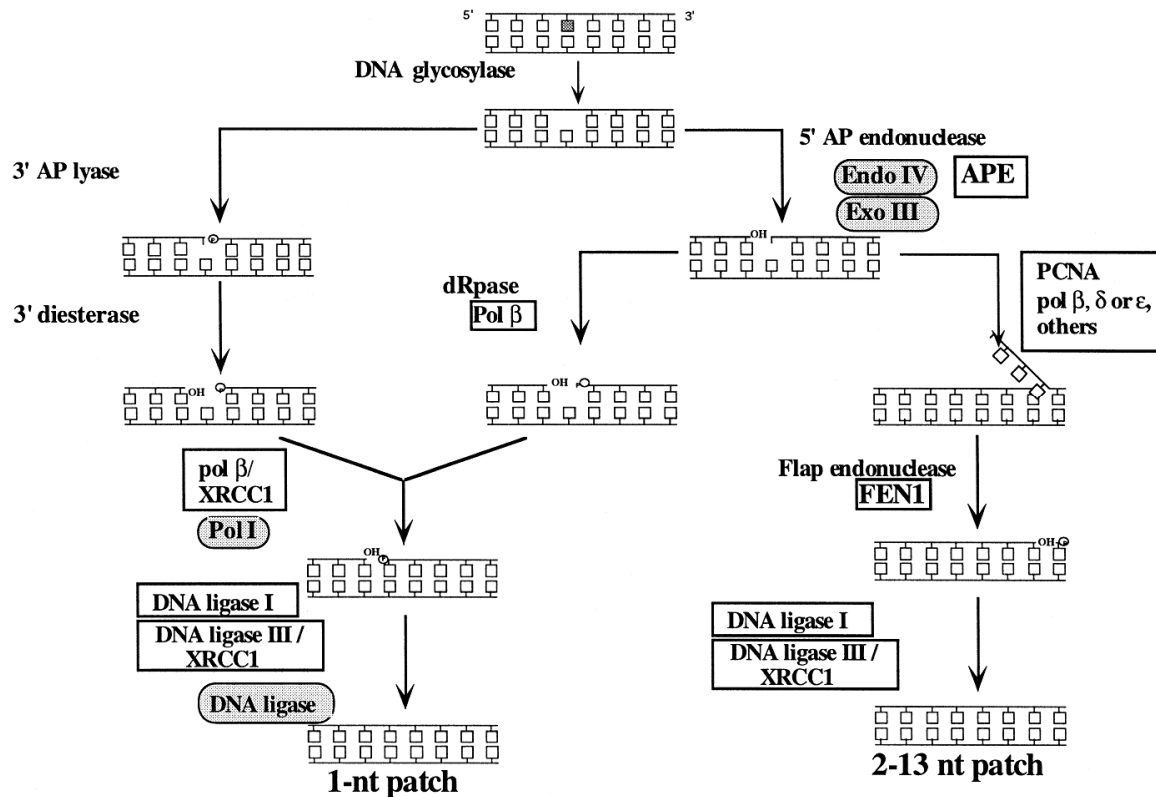


Figura 5: Pasos involucrados en el mecanismo de Reparación por Escisión de Bases (BER) (Tomado de Memisoglu and Samson, 2000).

1.8.2 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)

En eucariontes, la mayoría de los estudios han sido realizados con células mutadas en diferentes pasos de la vía, estas células pertenecían a pacientes con diferentes desórdenes genéticos directamente relacionados con la reparación del DNA, tales como el síndrome de Cockayne, la tricotiodistrofia (TTD) y el *Xeroderma pigmentosum* (XP) (Costa *et al.*, 2003).

En 1968, se encontró la primera relación entre la reparación del DNA y la carcinogénesis al observar que las células derivadas de pacientes con XP, eran incapaces de reparar el daño en el DNA generado por radiación ultravioleta. Esto lleva a una mayor predisposición a desarrollar cáncer de piel. A través de estudios realizados en células pertenecientes a pacientes con XP, se han identificado siete grupos de complementación, que van de XPA a

XPG y cada grupo refleja una proteína requerida en el proceso de incisión durante NER (Batty and Wood, 2000; Shuck, *et al.*, 2008).

La vía de reparación NER en organismos eucariontes es compleja y es llevada a cabo por alrededor de 25-30 proteínas (Costa, *et al.*, 2003; Shuck, *et al.*, 2008). Existen en este mismo mecanismo de reparación dos vías alternativas: la vía de reparación global genómica (GGR) y la reparación acoplada a la transcripción (TCR, ambas por sus siglas en inglés), las cuales difieren en la modalidad en la que se reconoce el daño en el DNA. La vía GGR está involucrada en la reparación de lesiones de regiones transcripcionalmente silenciadas del genoma o de las cadenas no transcritas de los genes activos. La vía TCR repara las lesiones que distorsionan las cadenas transcritas de los genes que se encuentran activos, con la finalidad de evitar la inmovilización de la RNA polimerasa II (Hang, 2010).

Los pasos involucrados en el mecanismo NER, consisten en agrupamientos secuenciales de proteínas que realizan diferentes funciones (ver Figura 6): reconocimiento del daño por XPC-HR23B, desnaturalización del segmento dañado por medio de TFIIH, incisión de la cadena dañada es llevada a cabo por XPG y XPF-Excision Repair Cross Complementing Group 1 (ERCC1), desplazamiento y escisión del daño que contiene el oligonucleótido (24-32 bases de longitud), resíntesis por medio de la DNA polimerasa δ/ϵ y ligamiento del DNA por medio de la ligasa III (Balajee and Bohr, 2000; Hang, 2010).

Los seis factores fundamentales que han sido implicados en el reconocimiento del daño y en los pasos de la incisión dual de la vía GGR son el complejo XPC-RAD32B, el factor de transcripción IIH (TFIIH), XPA, la proteína de replicación A (RPA), XPG y XPF-ERCC1. XPC-RAD32B juega un rol crítico en el reclutamiento de TFIIH e interactúa fuertemente con este complejo. TFIIH es un complejo de nueve subunidades que participa en NER y en la iniciación de la transcripción. Dos de estas subunidades, XPB y XPD, son helicasas que abren y desenrollan el DNA dañado; una vez que el DNA ha sido desenrollado, XPG y XPF-ERCC1 son empleados secuencialmente para formar incisiones 3' y 5', respectivamente en cada lado de la lesión. Posterior a la incisión, el oligómero que contiene el daño de

aproximadamente 24-32 nucleótidos es extraído y la estructura del DNA es restablecida por medio del llenado de espacios vacíos por medio de RFC, la PCNA, la DNA polimerasa δ/ϵ , DNA ligasa III y RPA (Revisado en Shuck, *et al.*, 2008).

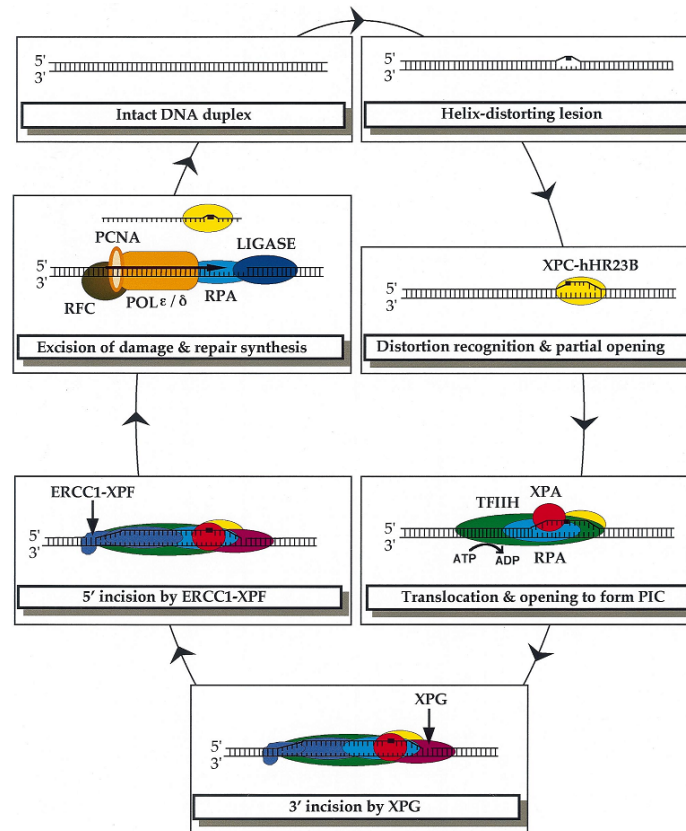


Figura 6: Pasos involucrados en el mecanismo de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) (Tomado de Batty, *et al.*, 2000).

1.8.3 Importancia de ERCC1 en la vía NER

En el ser humano, el gen para ERCC1 está localizado en el cromosoma 19q13.2, posee alrededor de 10 exones repartidos en 15 kb del genoma y el promotor está localizado en una región de 170 pares de bases antes del sitio de inicio transcripcional; la región promotora posee un sitio de unión AP-1, el cual es un activador de transcripción nuclear compuesto por c-fos y c-jun que se sabe que regulan la transcripción por interacción con elementos reguladores conocidos como sitios de unión AP-1 (Gossage and Madhusudan, 2007). En el ser humano, ERCC1 consta de 323 aminoácidos y en rata (*Rattus norvegicus*)

está constituido por 298 aminoácidos, teniendo ambas proteínas un porcentaje de identidad de alrededor del 80%.

En la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER), existen componentes que son importantes para que el funcionamiento e inducción del mecanismo y la reparación del daño en el DNA se lleven a cabo. En varias investigaciones se han propuesto varias proteínas como elementos críticos de la vía NER, por ejemplo XPC, XPF y ERCC1, sin embargo, se ha demostrado que ERCC1 puede funcionar como un marcador de resistencia a quimioterapia con cis-platino (Li, *et al.*, 2000; Lord, *et al.*, 2000; Fautrel, *et al.*, 2005), asimismo se ha visto en varios trabajos una correlación positiva entre la expresión de ERCC1 y el incremento en la reparación del DNA (Chang, *et al.*, 1999; Vogel, *et al.*, 2000; Yang, *et al.*, 2007; Yang, *et al.*, 2009). Como se recordará, el mecanismo NER tiene dos sub-mecanismos (TCR y GCR) los cuales tienen diferentes formas de detectar el daño y reclutar a la maquinaria de escisión, sin embargo ERCC1 es una proteína que se localiza en el punto de convergencia entre ambos sub-mecanismos y resulta ideal como un marcador de reparación (Costa, *et al.*, 2003; Hang, 2010) ya que independientemente de la vía de reconocimiento se puede evidenciar la inducción del mecanismo NER.

2. JUSTIFICACIÓN

La Ciudad de México es un centro urbano densamente poblado con gran actividad industrial, que provoca que existan grandes emisiones de contaminantes a la atmósfera, dentro de los cuales se incluye al material particulado (PM). El PM deteriora la calidad del aire y se ha establecido que la población expuesta a este tipo de contaminantes tiene un riesgo incrementado a padecer diferentes enfermedades. Se sabe que el PM puede tener diferentes grados de toxicidad dependiendo del tipo de partícula respirada así como de tener diferentes sustancias asociadas que pueden tener efectos dañinos o deletéreos para las células. Debido a los problemas de la calidad del aire en la Ciudad de México, deben ser evaluados los efectos tóxicos que tienen las partículas atmosféricas en los residentes de la Zona Metropolitana del Valle del México (ZMVM), específicamente en la formación de aductos con el DNA. Los aductos en el DNA se consideran alteraciones importantes en las fases tempranas de la carcinogénesis. La detección de aductos entonces nos da evidencia de la dosis biológicamente efectiva por exposición a carcinógenos asociados a cada tipo de partícula suspendida, sirviéndonos como un biomarcador de exposición y/o de dosis efectiva.

3. HIPÓTESIS

Las partículas atmosféricas de la Zona Metropolitana del Valle de México generarán aductos en el DNA en tejido pulmonar de rata y estas lesiones en el DNA estarán en función del diámetro de partícula, así como del tiempo de exposición. Asimismo el comportamiento observado en los niveles de aductos podría tener relación con la inducción de los mecanismos de reparación del DNA.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de aductos en el DNA y la expresión de los mecanismos de reparación en tejido pulmonar de ratas Sprague-Dawley expuestas a partículas atmosféricas de la ZMVM durante un periodo agudo (3 días) y uno subcrónico (8 semanas) a partículas gruesas, finas y ultrafinas.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los niveles de aductos en los pulmones de ratas Sprague-Dawley en dos periodos de exposición: aguda (3 días) y subcrónica (8 semanas) a partículas gruesas, finas y ultrafinas de la Zona Metropolitana del Valle de México por medio de la técnica ³²P-Postlabeling.
- Determinar si existe una relación con el tipo de partícula respirada y el número de aductos.
- Analizar si existe una relación dosis-efecto entre el número de aductos y el tiempo de exposición.
- Evaluar la expresión de la proteína ERCC1 como indicador de inducción del mecanismo de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER), como respuesta celular al daño genotóxico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Grupos experimentales

El diseño experimental estuvo constituido por 48 ratas machos Sprague-Dawley con 4 semanas de edad y con un peso de 300-350 g, obtenidas de Harlan (México). Se formaron 4 grupos de exposición aguda que duró tres días y 4 grupos de exposición subcrónica que duró 8 semanas (n=6, para cada grupo). Los grupos fueron expuestos a partículas atmosféricas concentradas durante el periodo correspondiente, con partículas gruesas (10-2.5 μ m), finas (2.5-1 μ m) y ultrafinas (<1 μ m) y a aire filtrado como control.

Las sesiones de exposición a partículas fueron de 5 horas al día. Para la exposición subcrónica fue de 4 días por semana durante las 8 semanas. Para la exposición se utilizó el sistema VACES (Versatile Aerosol Concentration Enrichment System) que se detalla más adelante (ver apartado 5.2).

La exposición de los animales con el sistema VACES y la obtención de los tejidos pulmonares se realizaron en el Laboratorio de Toxicología de Contaminantes Atmosféricos y Estrés Oxidativo del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, a cargo de la Dra. Andrea de Vizcaya Ruíz, quien proporcionó las muestras que se analizaron en este trabajo

5.2 Sistema Versátil de Concentración de Aerosoles (VACES)

El sistema VACES consiste de una serie de concentradores que recogen el aire ambiental y lo dirigen a unos impactadores virtuales que separan las partículas de acuerdo a su tamaño aerodinámico y peso en tres fracciones: gruesa, fina y ultrafina (10–2.5 μ m, \leq 2.5 μ m y \leq 1 μ m, respectivamente). Las partículas separadas son entonces suministradas para los tratamientos *in vivo* a las cámaras de exposición de cuerpo entero (Figura 7). El proceso de enriquecimiento de PM por el sistema VACES tiene una eficiencia casi del 100% el cual no afecta el tamaño de la partícula ni su composición química, y mantiene un ambiente óptimo para los animales (Kim *et al.*, 2001 a y b).

De acuerdo a la metodología utilizada por Debray (2010), en la primera etapa (Ver Figura 6), para la concentración de las fracciones fina y ultrafina, el PM proveniente del aire ambiental es saturado con vapor de agua para aumentar su volumen, lo que permite su separación a través de impactadores virtuales tipo Ventury. Una vez que las fracciones finas y ultrafinas son separadas, pasan por desecadores con sílica-gel que remueven el agua condensada para regresar a la partícula a su tamaño original, después pasan por filtros de cascada cuya ranura permite la separación de la fracción fina y ultrafina para ir directamente a la cámara de exposición. La fracción gruesa no necesita un proceso de condensación para ser separada ya que ésta tiene un diámetro mayor y puede ser separada por el impactador virtual tipo Ventury, una vez separada pasa de igual manera, directamente a la cámara de exposición.

Este sistema cuenta con 8 cámaras de exposición, dos unidas a cada tipo de partícula. Las cámaras de aire filtrado están conectadas a un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) y a un cartucho con carbón activado y óxido de aluminio para evitar la presencia de compuestos orgánicos volátiles y partículas.

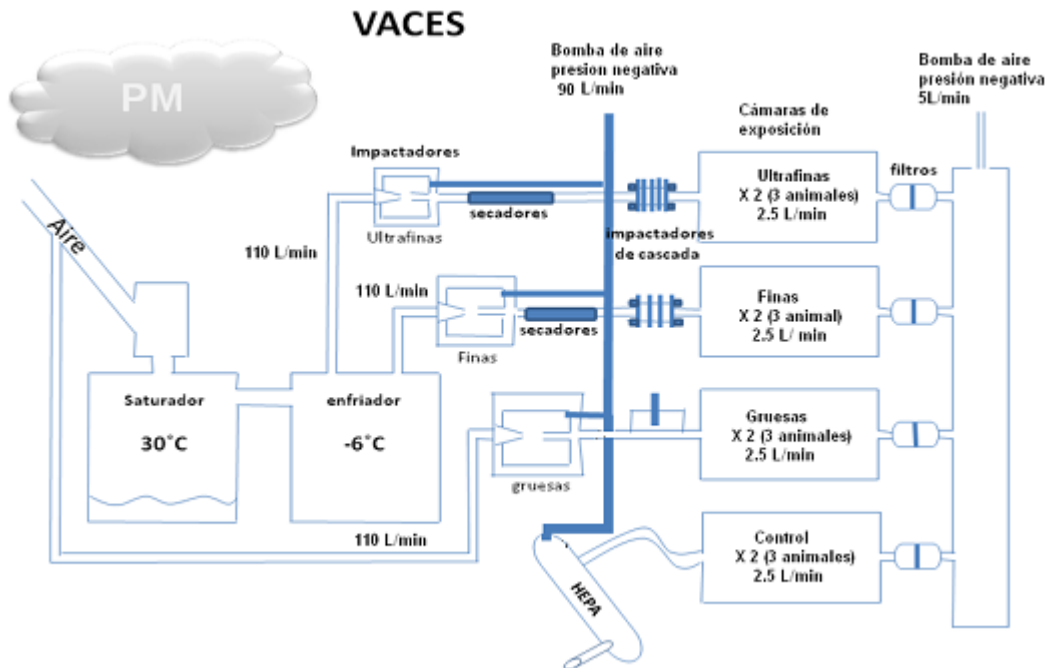


Figura 7: Esquema del sistema versátil de concentración de aerosoles (VACES), utilizado en los experimentos de exposición a partículas (Modificado de Debray, 2010).

5.3 Obtención de los tejidos pulmonares

Las ratas al término de cada exposición fueron sacrificadas por exanguinación después de la inyección de penobarbital sódico (60-80 mg/kg). Enseguida, se extrajeron los pulmones mediante disección, los cuales fueron preservados a -70°C para su posterior uso.

5.4 Extracción de DNA para la determinación de aductos

Se colocó medio pulmón en un sobre de papel aluminio que se sumergió en nitrógeno líquido para ser posteriormente pulverizado en un mortero de porcelana. El tejido pulverizado se colocó inmediatamente en un tubo Falcon de polipropileno dentro de hielo seco.

La extracción de DNA se realizó a partir del tejido pulverizado de acuerdo al método de Shibutani y colaboradores (2006). Se agregó al tejido el buffer de lisis (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 1% SDS, 100 mM EDTA, 500 mM NaCl) y el homogenado fue incubado a 37°C por

60 minutos con 20µg/mL de RNasa A (Sigma-Aldrich), posteriormente se incubó por 60 minutos con 200 µg/mL de proteinasa K (Sigma-Aldrich) a 50°C.

Se agregó un volumen igual de fenol saturado con Tris a pH 7.8 (Invitrogen) a la mezcla, se agitó a temperatura ambiente y se centrifugó por 15 minutos a 6000g a 4°C. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo y se desecharon la interfase y la fase orgánica. Se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1, v/v), se mezcló y se centrifugó en las condiciones anteriores. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio.

Para aislar el DNA, se adicionaron tres volúmenes de etanol frío, se mezcló y el DNA se removió con una punta de pipeta y se lavó con etanol al 70% dos veces. El DNA se precipitó por una nueva centrifugación y se disolvió en agua libre de DNasas.

La concentración y pureza del DNA se estimó por absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) y revisando la relación 260/280 y 230/280 nm, considerando que un cociente respectivamente por arriba de 1.8 y 0.46 indica una pureza adecuada para nuestros experimentos.

5.5 Cuantificación de aductos mediante ³²P-Postlabeling

El proceso de detección de aductos mediante la técnica de post-marcaje con ³²P (³²P-Postlabeling) puede ser aplicable de manera muy amplia en aductos que tienen la característica de ser muy grandes (Bulky adducts), aromáticos o hidrofóbicos, como aquellos formados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (Phillips and Arlt, 2007).

Para la determinación de aductos se utilizó el protocolo de Phillips y Arlt, (2007). De las muestras, 4 µg de DNA fueron evaporados en el DNA110 SpeedVac (ThermoSavant) e incubadas toda la noche con 4µl de una mezcla de 90 mU de MN y 10 mU SPD (Nucleasa Micrococcal de Sigma-Aldrich, Cat. N3755 y Fosfodiesterasa tipo II de bazo de ternero de Calbiochem, Cat. 524711, respectivamente), y 0.8 µl de buffer de digestión (100 mM de succinato de sodio, pH 6.0; 50 mM cloruro de calcio) a 37°C, esto con la finalidad de digerir de manera total el DNA, dando como resultado nucleótidos 3' monofosfato.

Posteriormente se realizó un enriquecimiento mediante una digestión con la nucleasa P1 (Sigma-Aldrich, Cat. N8630) para desfosforilar los nucleótidos sin aductos, dejando fosforilados aquellos nucleótidos que poseen aductos. Se agregaron a la mezcla anterior 2.4 µl de buffer de acetato de sodio 250 mM, 1.44 µl de cloruro de zinc 2 mM y 0.96 µl de NP1 (1.25mg/ml) y las muestras se incubaron durante una hora a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 1.92 µl de Tris base a 0.5 M.

Inmediatamente después, los nucleótidos 3' monofosfato con aductos se marcaron con 50 µCi de [γ -³²P] ATP (IZOTOP, Institute of Isotopes Co., Ltd, Cat. FP301-1mCi) en presencia de 6 U de Polinucleótido cinasa T4 (USB, No. Cat. 70031) y buffer de cinasa a 1X (50 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM de Cloruro de magnesio y 10 mM de β -Mercaptoetanol). Se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se aplicó el total de la mezcla en hojas de PEI polietilenoimina-celulosa para cromatografía en capa fina (10 x 20 cms, unida a una membrana de papel filtro Whatman de 10 x 12 cms) (ver Figura 6).

Una vez aplicada la mezcla se corrió la placa cromatográfica en buffer D1 (1.0 M fosfato de sodio, pH 6.0), durante toda la noche en dirección 1 hacia el papel filtro Whatman (ver Figura 6), se desechó la parte del papel filtro y se cortó la placa después del corrimiento dejándola de 10 cm x 10 cm, se lavaron las placas durante 10 minutos con agua y se dejaron secar.

Se corrieron posteriormente las placas en los buffers D2 (3.5 M formato de litio, 8.5 M urea, pH 3.5) y D3 (0.8 M cloruro de litio, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0) en sus respectivas direcciones (ver Figura 8).

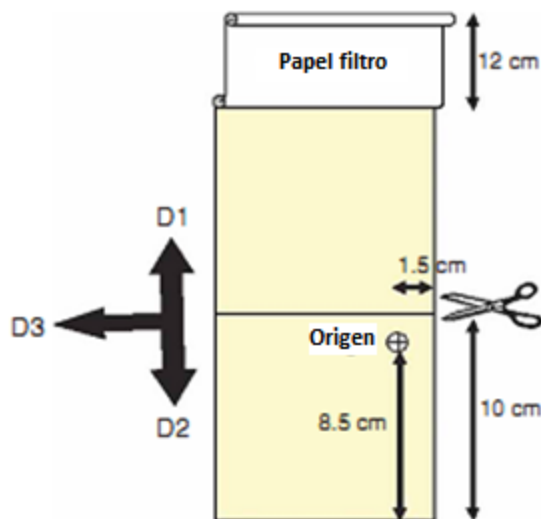


Figura 8: Diagrama que muestra la dirección de los diferentes corrientes en la placa de polietilenoimina-celulosa para la cromatografía en capa fina, se muestra el sitio de aplicación de la muestra de DNA marcado radioactivamente, la colocación del papel filtro y la manera de corte de la placa (Modificado de Phillips and Artl, 2007).

Finalmente las placas cromatográficas fueron colocadas en cassettes con pantallas y expuestas a película autoradiográfica (Kodak X-OMAT V, Cat. 1611912) a -80°C durante tres días. Después de revelar la película, los "spots" de interés fueron recortados y la radioactividad fue medida en el contador de centelleo Multi-purpose scintillation counter LS 6500 (Beckman-Coulter, USA).

Se corrió por duplicado una reacción de marcaje en paralelo (omitiendo el tratamiento con nucleasas) con 30 fmoles de AMP y se determinó la radioactividad del spot de ^{32}P -ADP resultante después de separar por cromatografía en capa fina el ^{32}P -ADP en una placa de PEI-celulosa con 250 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 mM de NaH_2PO_4 , pH 6.0 de la cual se sustrajo el valor del control negativo sin sustrato AMP.

Las cantidades de nucleótidos con aductos en las muestras fueron determinadas comparando los valores de radioactividad en los spots o zonas diagonales con el valor del spot correspondiente al ^{32}P -ADP, el producto de la fosforilación de 30 fmoles de AMP. Las

cantidades de DNA-Aductos se presentaron como aductos por 10^8 nucleótidos asumiendo que 4µg de DNA de las muestras contienen 0.01212 µmoles de nucleótidos.

Las mediciones de los niveles de aductos fueron hechos en duplicado y en caso de que la desviación estándar superara el 20% del valor promedio, el ensayo para estas muestras se realizó por triplicado. (Binková, *et al.*, 1994)

5.6 Extracción de proteína

Para la extracción de proteínas totales, los pulmones guardados a -70°C se homogenizaron en un baño de hielo con el siguiente buffer: Hepes 10 mM pH 7.6, NaCl 200 mM, KCl 42 mM, MgCl_2 5 mM, dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 1%, fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM, ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 1 mM, ácido etileno-glicol-bisamino-etil-eter-tetracético (EGTA) 1 mM, ditiotreitól 1 mM, pepstatina 1.5 mM, leupeptina 2 mM, aprotinina 0.7 mM. Los homogenados fueron centrifugados a 12000 g por 15 minutos y fueron almacenados a -70°C (Badaut, *et al.*, 2001).

La concentración de proteínas, se determinó mediante el método de Bradford en microplaca de 96 pozos, comparando los valores de absorbancia con los de una curva patrón de albumina con concentraciones de 0.1-0.5 mg/mL de proteína. Se realizaron mediciones de la absorbancia a 595 nm con un Multimode Detector DTX 880 (Beckman-Coulter, USA). Todas las muestras fueron cuantificadas por duplicado, las curvas patrón de albúmina, fueron consideradas válidas cuando el coeficiente de correlación (R^2) fue superior a 0.99.

5.7 Inmunoblot

Para la determinación de ERCC1, las muestras de proteína fueron cargadas y corridas en un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences, UK) mediante una electrotransferencia a 200mA durante una hora. Las membranas se bloquearon con TBS-Tween 1X (Tris pH 7.6, 140 mM de NaCl y Tween 20 al 1%) y leche Blotto (Santa Cruz Biotechnology, USA) al 5% durante toda la noche a 4°C con la finalidad de evitar la unión

inespecífica del anticuerpo primario. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario Anti-ERCC1 (Santa Cruz Biotechnology, Cat. sc-17809) en dilución 1:2000 en TBS-Tween 1X y leche Blotto al 5% durante una hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Después de la incubación con el anticuerpo primario las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 1X durante 10 minutos tres veces para eliminar el exceso de anticuerpo primario, posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen, Cat. #61-6520) diluido 1:2000 en TBS-Tween 1X con leche Blotto al 5% durante una hora a temperatura ambiente con agitación moderada, para finalmente realizar tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween y un cuarto lavado solo con TBS.

Para la determinación de la presencia y cuantificación de las proteínas de interés se realizó una reacción quimioluminiscente incubando las membranas con el sistema Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare, Cat. RPN2232) y exponiéndolas a placas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL (Amersham, GE Healthcare). Como proteína control de carga, se determinaron las cantidades de GAPDH en cada muestra después de someter las membranas a un proceso de "Stripping" con NaOH 0.2M durante 20 minutos y lavando con agua destilada y TBS-Tween 1X, para retirar los anticuerpos acoplados permitiendo repetir la inmunodetección con anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Cat. sc-20357) en dilución 1:8000 y el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón acoplado a HRP en dilución 1:8000. Para identificar las proteínas mediante su peso molecular se utilizó el marcador de peso molecular biotinilado (Biotinylated protein ladder detection pack #7727, Cell Signaling Technology) el cual se detectó mediante el anticuerpo anti-biotina acoplado a HRP (Cell Signaling Technology, Cat. #7075) agregándolo junto con los anticuerpos secundarios en dilución 1:2000.

5.8 Densitometría de los Inmunoblots

Para la cuantificación de la expresión de ERCC1, las placas fotográficas obtenidas durante la determinación con ECL, fueron digitalizadas con la cámara Kodak Gel Logic 200.

El análisis densitométrico se realizó con el software Image J 1.45s (W. Rasband, NIH, USA) y las densidades integradas de las bandas correspondientes a ERCC1 se normalizaron contra el control de carga GAPDH.

5.9 Análisis de datos

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio del software Sigma Plot 12.0 para Windows (Systat Software, Inc). Todos los datos están expresados como promedio \pm error estándar (E.E.). Para la comparación de dos grupos entre ambos tiempos de exposición se realizó una prueba de t de Student y para comparar los grupos experimentales dentro de cada tiempo de exposición respecto al control se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

6. RESULTADOS

6.1 Concentración de PM

La concentración de PM en las cámaras de exposición se calculó a partir de la gravimetría (pesaje antes y después de la toma de la muestra) de los filtros de salida del VACES y fue realizada por parte del laboratorio de Toxicología de Contaminantes Atmosféricos y Estrés Oxidativo del CINVESTAV del IPN. La concentración de PM en las cámaras de exposición para la fracción gruesa fue de $32 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para la fracción fina $170 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y para la fracción ultrafina $107 \mu\text{g}/\text{m}^3$, como se puede ver en la Figura 9.

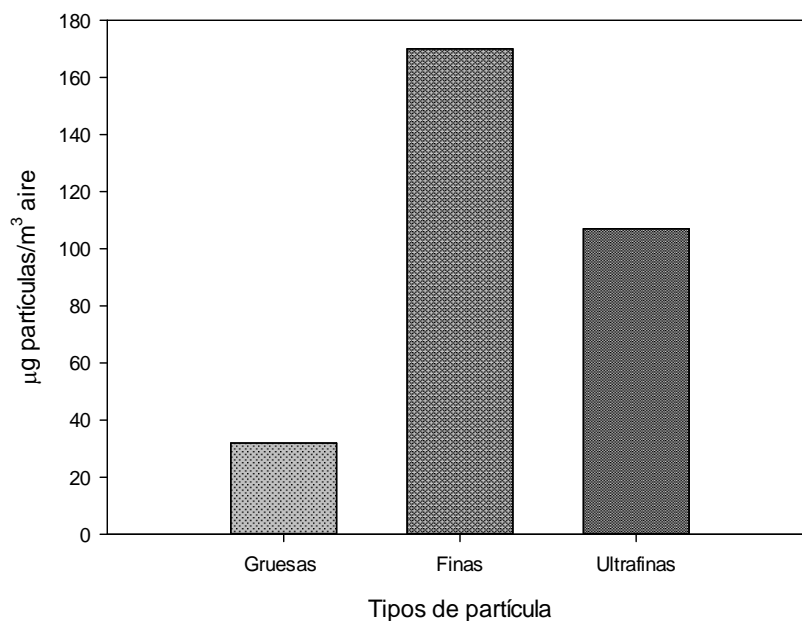


Figura 9: Concentraciones de PM por m^3 de aire respirado para cada tipo de partícula en el sistema VACES.

6.2 Niveles de aductos en el DNA

En el grupo de animales expuestos durante 3 días (exposición aguda) a partículas gruesas, finas y ultrafinas, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales tratados con los diferentes tipos de partículas comparándolas contra el grupo control (ver Figura 10). Sin embargo, se puede apreciar una tendencia positiva, observando que las partículas ultrafinas son las que generaron mayor cantidad de aductos con respecto al control (193.71% más), siendo éste el incremento más alto de los tres tipos de partículas; seguidas de la fracción fina (160.74%) y por último en las partículas gruesas (122.46%).

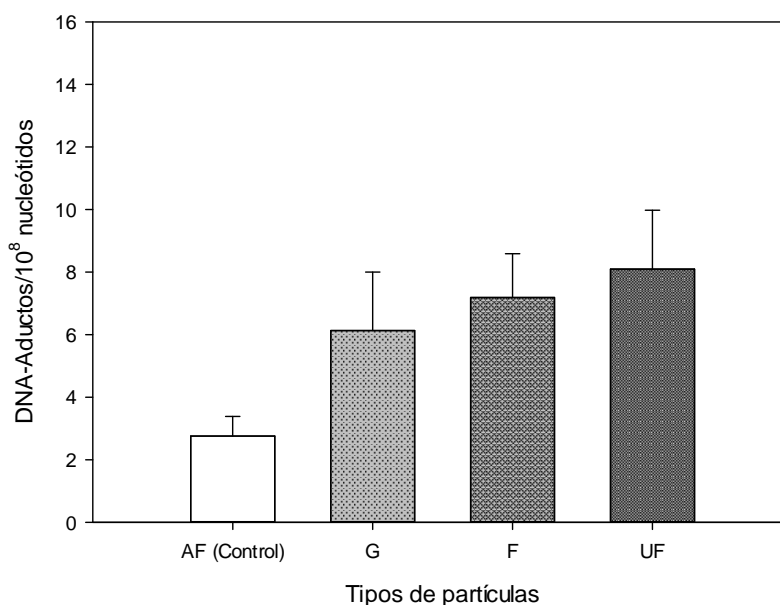


Figura 10: Niveles de aductos en el DNA en pulmón de rata Sprague-Dawley a los 3 días de exposición con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. N=6 por cada grupo. Cada valor representa la media ± E.E.

En la exposición de 8 semanas (exposición subcrónica) el grupo de ratas expuestas a partículas ultrafinas se aprecia un incremento respecto al grupo control, los niveles de aductos generados por las partículas ultrafinas tienden a incrementarse un 46.55%, sin embargo tal incremento no es significativo. En el caso de las partículas gruesas y finas, al

ser comparadas respecto al grupo control, no muestran diferencias siendo el nivel de aductos muy similar entre estos grupos de animales (ver Figura 11).

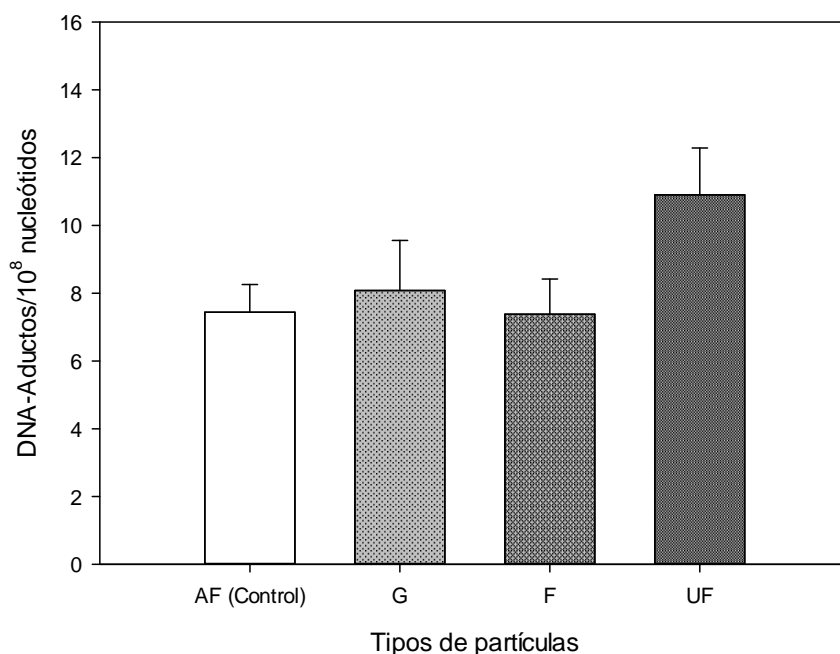


Figura 11: Niveles de aductos en el DNA en pulmón de rata Sprague-Dawley a las 8 semanas de exposición con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. N=6 por cada grupo. Cada valor representa la media ± E.E.

Al comparar los niveles de aductos cuantificados de la exposición aguda con aquellos presentes en las ratas sometidas a una exposición subcrónica, se puede notar que los aductos en el periodo de 8 semanas son mayores en todos los grupos de ratas tratadas con los distintos diámetros de partículas (ver Figura 12), sin embargo tales diferencias no son significativas estadísticamente y solo muestran un ligero incremento, a excepción de los grupos controles, ya que se observan diferencias que no se deben a la variabilidad de la muestra ($P < 0.002$).

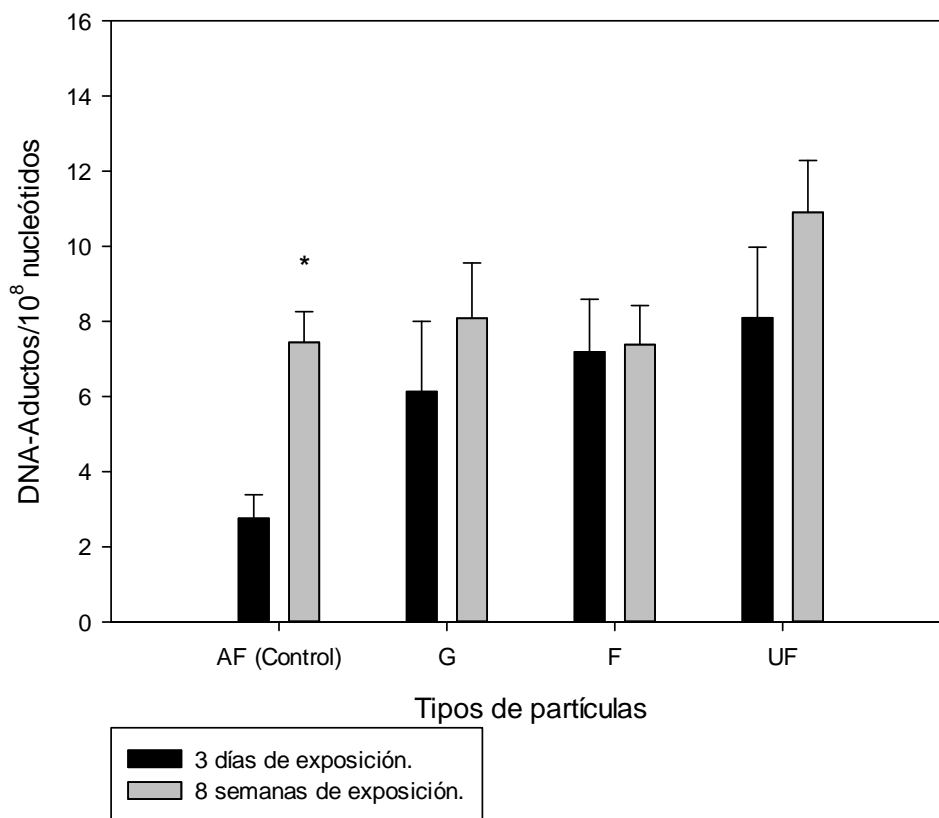


Figura 12: Comparación de los niveles de aductos en el DNA en pulmón de rata Sprague-Dawley a los 3 días y 8 semanas de exposición con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. N=6 por cada grupo. Cada valor representa la media \pm E.E. *(P<0.002).

6.3 Expresión de ERCC1

Para poder observar la reparación del daño generado por los compuestos presentes en los diferentes diámetros de partículas, se eligió una proteína implicada en el mecanismo de reparación encargado de eliminar este tipo de lesiones en el DNA. La vía encargada de la reparación de los "Bulky Adducts" es la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y ERCC1 parece ser una proteína crucial en el funcionamiento de la vía NER.

Se midieron los niveles de ERCC1 presentes en los pulmones de las ratas sometidas a una exposición aguda y una exposición subcrónica (3 días y 8 semanas, respectivamente), para

poder establecer alguna relación con los niveles de aductos obtenidos mediante ³²P-Postabeling.

Se identificó la banda correspondiente a ERCC1 en un peso molecular de 38 kDa (ver Figura 13) en el tratamiento de 3 días con partículas gruesas, finas y ultrafinas. Se utilizó como control de carga a la enzima GAPDH, con un peso de 37 kDa.

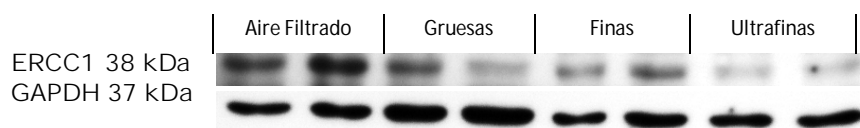


Figura 13: Inmunoblot de ERCC1 en pulmones de ratas expuestas a durante 3 días con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. Los valores de cada tratamiento están normalizados respecto a la expresión de GAPDH, 37 kDa.

Se realizó la cuantificación de ERCC1 por medio del análisis de la densitometría de las bandas obtenidas mediante inmunoblot (ver Figura 14), sin obtener para este tratamiento diferencias significativas entre los grupos de ratas expuestas durante 3 días con los diferentes diámetros de partículas comparadas respecto al grupo control. Sólo es posible apreciar una ligera tendencia a disminuir el nivel de la proteína conforme el tamaño de partícula es menor, siendo mínimo el cambio en el grupo de las ratas expuestas a partículas gruesas (-3.877%) y más evidente en el de las que fueron expuestas a partículas finas y ultrafinas (-10.338% y -10.912%, respectivamente).

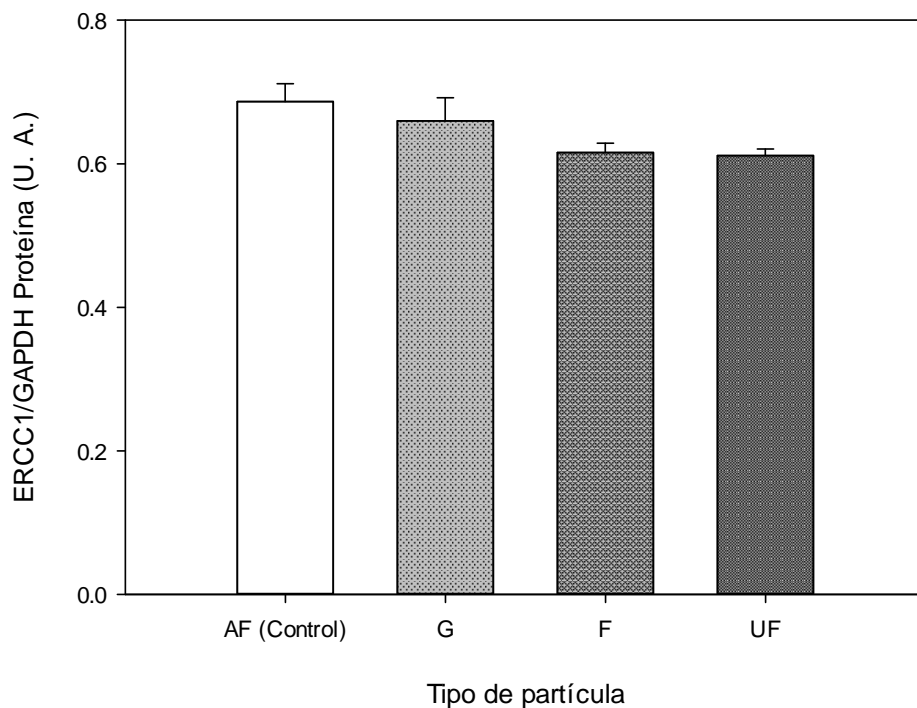


Figura 14: Expresión de ERCC1 en pulmones de ratas expuestas a durante 3 días con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. Los valores de cada tratamiento están normalizados respecto a la expresión de GAPDH. N=4 para cada grupo. Cada valor representa la media \pm E.E.

De la misma manera se identificó la banda correspondiente a ERCC1 en el peso molecular de 38 kDa (ver Figura 15) en el tratamiento de 8 semanas con los diferentes diámetros aerodinámicos de partículas. Se utilizó como control de carga a la enzima GAPDH, con un peso de 37 kDa.

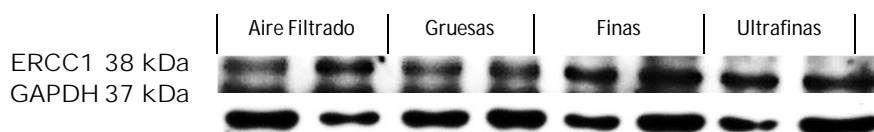


Figura 15: Inmunoblot de ERCC1 en pulmones de ratas expuestas a durante 8 semanas con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. Los valores de cada tratamiento están normalizados respecto a la expresión de GAPDH, 37 kDa.

Se realizó la cuantificación de ERCC1 en el tratamiento de 8 semanas (ver Figura 16), sin mostrar diferencias significativas entre los diferentes diámetros de partículas comparados contra el grupo control, siendo ligeramente mayor la expresión de la proteína en los grupos de animales tratados con partículas finas y ultrafinas (6.032% y 4.543% respectivamente).

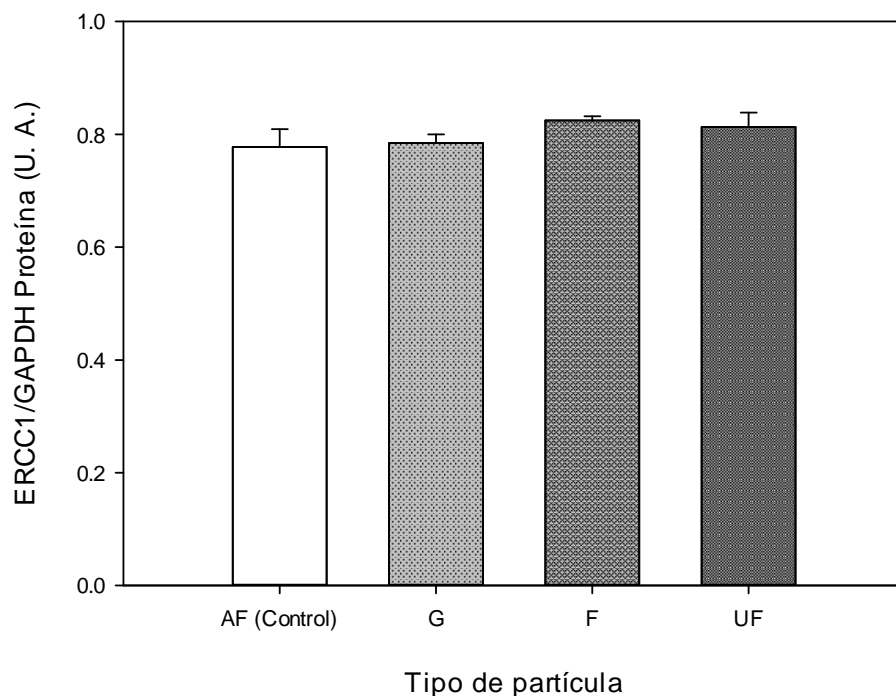


Figura 16: Expresión de ERCC1 en pulmones de ratas expuestas a durante 8 semanas con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. Los valores de cada tratamiento están normalizados respecto a la expresión de GAPDH. N=4 para cada grupo. Cada valor representa la media \pm E.E.

Al realizar una comparación entre los niveles de expresión de ERCC1 de los animales tratados con los diferentes diámetros aerodinámicos de partículas en las exposiciones aguda y subcrónica (ver Figura 17), se observa que la expresión de ERCC1 es notoriamente más elevada en el tratamiento de 8 semanas de duración en todos los grupos experimentales, siendo para cada uno de ellos significativa esta diferencia ($P < 0.001$: Aire filtrado, partículas finas y ultrafinas; $P < 0.009$: partículas gruesas).

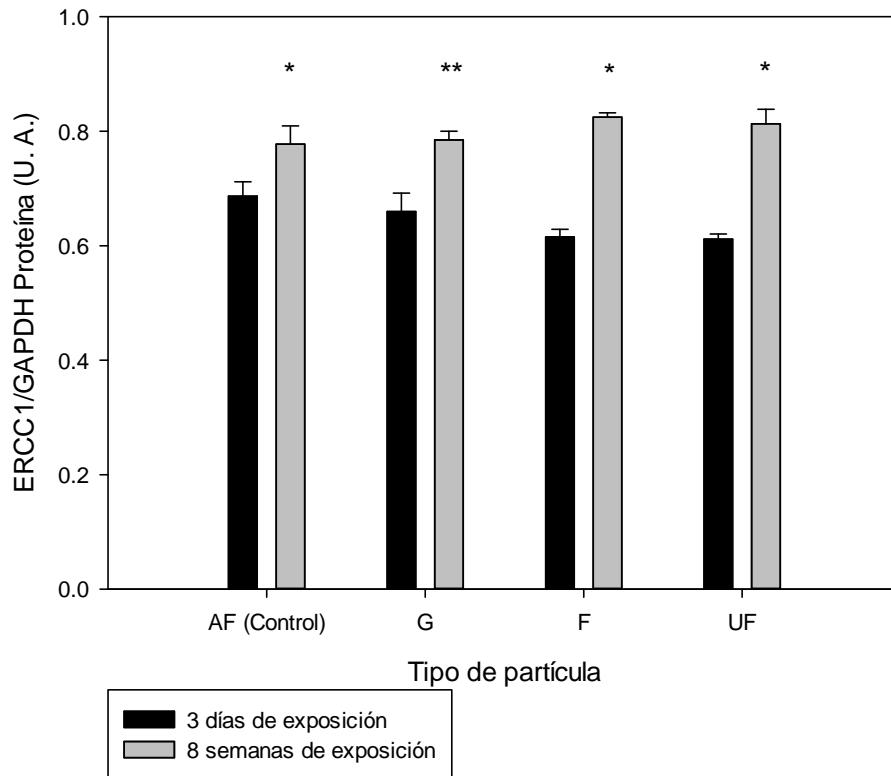


Figura 17: Comparación de los niveles de ERCC1 en pulmones de rata Sprague-Dawley a los 3 días y 8 semanas de exposición con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. N=4 para cada grupo. Cada valor representa la media \pm E.E. *(P<0.001) ** (P<0.009).

Finalmente se graficaron los promedios de cada grupo experimental en el tratamiento de 3 días de los niveles de expresión de ERCC1, contra todos los resultados de la cuantificación de aductos en el DNA, para poder evidenciar si existe una relación entre la cantidad de daño al DNA y la expresión de la proteína (ver Figura 18). Se observa que en el grupo control, los niveles de daño en el DNA son bajos y los niveles de ERCC1 son mayores que en los demás grupos experimentales. Conforme el diámetro de partícula disminuye, los niveles de aductos en el DNA son mayores y la expresión de ERCC1 es menor, sin observar en este caso diferencias estadísticamente significativas, pero se puede apreciar

entonces una relación inversamente proporcional entre la expresión de ERCC1 y los niveles de aductos.

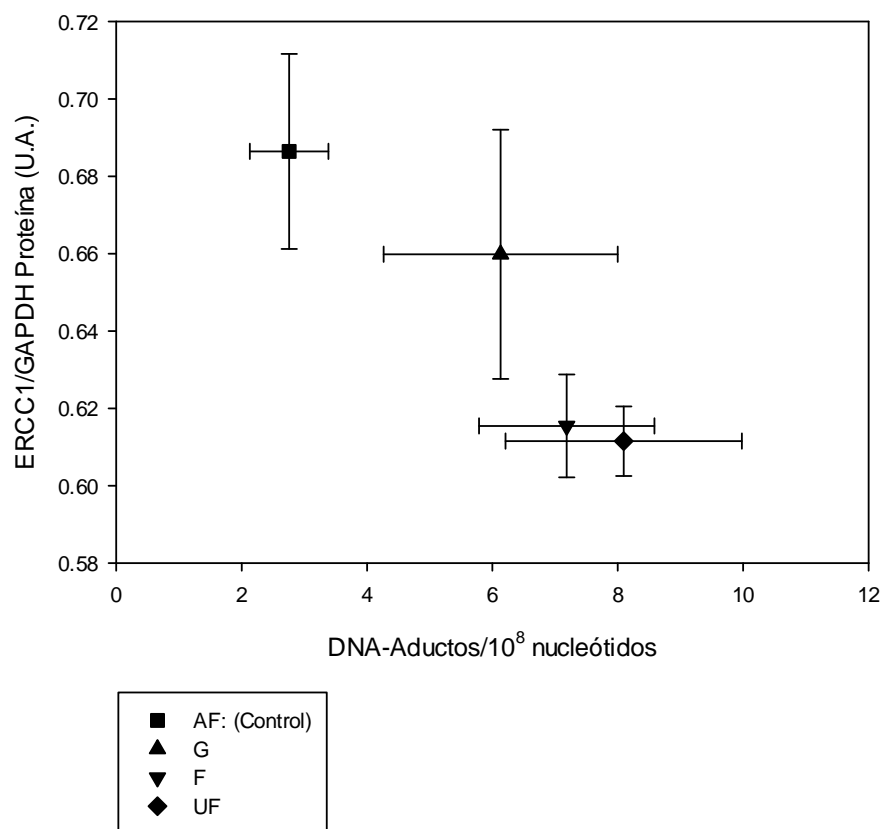


Figura 18: Correlación entre los niveles de ERCC1 y los niveles de aductos en pulmones de rata Sprague-Dawley a los 3 días de exposición con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. Cada valor representa la media \pm E.E.

De igual manera se graficaron los promedios de cada grupo experimental en el periodo de exposición de 8 semanas de los niveles de ERCC1 contra todos los resultados de la cuantificación de DNA-aductos de ese mismo periodo de exposición (ver Figura 19), se aprecia que en las ratas tratadas con aire filtrado y partículas gruesas los niveles de aductos y expresión de ERCC1 son muy similares, en cambio en las ratas expuestas a partículas finas los niveles de ERCC1 son mayores a pesar de tener daño similar en el DNA. Finalmente en las ratas tratadas con partículas ultrafinas podemos ver que a pesar de que

el número de aductos es alto, la proteína también tiene niveles superiores, en todos los casos las diferencias no son significativas estadísticamente.

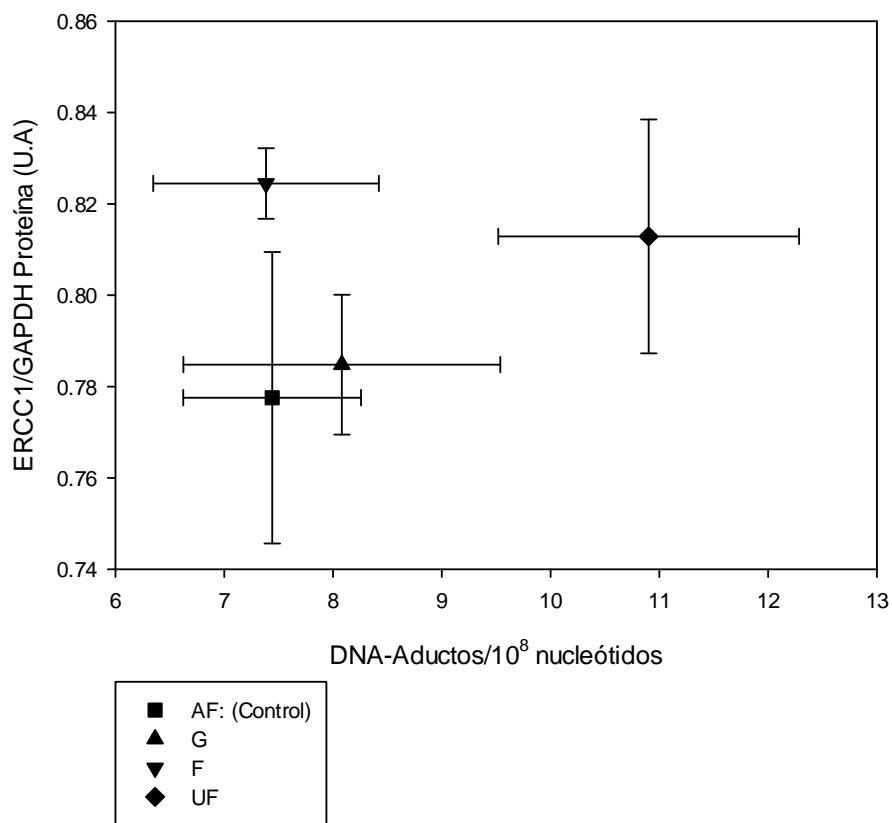


Figura 19: Correlación entre los niveles de ERCC1 y los niveles de aductos en pulmones de rata Sprague-Dawley a las 8 semanas de exposición con cada diámetro de partícula. AF: Aire filtrado (Control); G: fracción gruesa; F: fracción fina y UF: fracción ultrafina. Cada valor representa la media \pm E.E.

7. DISCUSIÓN

La Zona Metropolitana del Valle de México presenta niveles altos de PM a los cuales la población está expuesta y que podrían representar un riesgo para la salud (SMA-GDF, 2008). Esto debido a la gran cantidad de actividades industriales que se llevan a cabo, al gran número de fuentes móviles de contaminación y a las características latitudinales, altitudinales y del relieve de la región.

En este trabajo evaluamos la formación de aductos en el DNA en tejido de pulmón de ratas expuestas a partículas atmosféricas de tres diámetros aerodinámicos (gruesas: 10-2.5 μm , Finas: $\leq 2.5 \mu\text{m}$ y Ultrafinas: $\leq 1\mu\text{m}$) y aire filtrado como control. Los animales fueron expuestos de forma aguda y subcrónica (3 días y 8 semanas respectivamente). Indicadores de exposición a carcinógenos presentes en las partículas atmosféricas de la ZMVM en un modelo pulmonar de rata (Sprague-Dawley) fueron considerados al evaluar la formación de aductos en el DNA, así como la expresión de la vía de reparación involucrada en su remoción.

En el laboratorio de Toxicología de Contaminantes Ambientales y Estrés Oxidativo del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional se llevó a cabo la exposición de los animales (ver figura 8) mediante el sistema VACES. Tales concentraciones reflejan la proporción de los distintos diámetros de partículas en el aire de la ZMVM. En el Atmospheric Sampling Course (1988) del Instituto de Capacitación en Contaminación de Aire (APTI, por sus siglas en inglés), institución dependiente de la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), se describen detalladamente las proporciones de los diferentes diámetros de partículas en distintos ambientes o sitios de producción de material particulado. Por ejemplo en sitios donde se lleva a cabo la combustión de madera, diesel o derivados del petróleo, la cantidad de partículas finas es mayor que la fracción de gruesa y ultrafina, probablemente esto se deba a los procesos de acumulación que hacen que las partículas ultrafinas se agreguen y formen partículas de mayor diámetro (WHO, 2003). En zonas donde se practica la agricultura o se realiza la construcción de inmuebles, las partículas gruesas son las que predominan sobre las finas y

ultrafinas en gran proporción. Por lo tanto las concentraciones de partículas de la ZMVM concuerdan con los patrones de partículas observados en diversos procesos de combustión, los cuales son los que generan la mayor cantidad de partículas en la Ciudad de México, la proporción de cada diámetro de partícula es la esperada para las actividades industriales y procesos de combustión presentes en la ZMVM.

La cuantificación de los niveles de aductos en DNA es utilizada como biomarcadores de dosis biológicamente efectiva y de exposición, lo que nos permite conocer si el modelo de estudio está expuesto a carcinógenos químicos (Poirier, 1997; Rundle, 2006).

Al realizar la cuantificación de los niveles de aductos, se puede ver que en el tratamiento agudo de 3 días (ver Figura 10), los niveles se incrementan conforme al tipo de partícula, siendo el grupo expuesto a partículas ultrafinas el que presentó mayor aumento en la cantidad de aductos, aunque las diferencias no son significativas, pero sugieren una tendencia entre el tipo de partícula y el número de aductos, esto acorde con lo reportado, el potencial carcinogénico es mayor en las partículas finas y ultrafinas (Topinka, *et al.*, 2010)

García-Suástegui y colaboradores (2011) en un estudio llevado a cabo en la ZMVM, encontraron una relación entre las variaciones de concentraciones de PM₁₀ y PM_{2.5} en dos épocas del año y los niveles de aductos en residentes de la ZMVM. Tales resultados muestran que durante la época seca del año, las concentraciones de PM₁₀ y PM_{2.5} son más altas comparadas con la época lluviosa; asimismo los niveles de aductos en el DNA en habitantes de la ZMVM mostraron ser significativamente mayores durante la época seca del año. Mostrando la capacidad de las partículas atmosféricas presentes en la ZMVM para poder generar daño en el DNA. Tal estudio es de carácter epidemiológico, sin embargo, en nuestros resultados efectivamente se demuestra la capacidad del PM de la ZMVM en un modelo *in vivo* para poder generar tales lesiones en el material genético.

En un estudio realizado por Topinka y colaboradores (2010) en cuatro localidades de la República Checa, se evaluó el efecto del tamaño de las partículas en las cantidades de c-PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinogénicos) presentes en las partículas y

en la generación de daño en el DNA en forma de aductos en el DNA en un ensayo *in vitro*. Como resultado se observó que las partículas ultrafinas son las que tienen asociada una mayor cantidad de c-PAHs y a su vez, son éstas las que generan una mayor cantidad de aductos, sin presentar diferencias entre las cuatro localidades a pesar de tener diferentes características en las actividades industriales y el flujo de automóviles.

Las partículas ultrafinas son las que penetran de manera más profunda el pulmón, hasta la zona de intercambio gaseoso y permanecen por más tiempo en el tejido debido a que la eliminación de estas partículas es más lenta (Valentine and Kennedy, 2008), permitiendo que los agentes genotóxicos asociados a éstas continúen por más tiempo en el tejido provocando más daño en el DNA, tal como lo muestran nuestros resultados.

En estudios realizados con exposiciones crónicas de carcinógenos, la relación entre los aductos en el DNA y la exposición al carcinógeno es más compleja, ya que los niveles de aductos cambian en función del tiempo y pueden seguir diferentes farmacocinéticas para diferentes órganos (Godschalk, *et al.*, 2002). Cuando la administración de agentes genotóxicos es por inhalación, el tejido pulmonar presenta mayor daño en el DNA comparado con otros tejidos blanco con alta actividad metabólica como el hígado (Binková, *et al.*, 1994). También se ha demostrado que dependiendo del agente genotóxico al que se estén exponiendo los animales experimentales, se pueden observar niveles de aductos diferentes en distintos órganos, derivado de las diferencias toxicocinéticas órgano-específicas (Binková, *et al.*, 1994; Arlt, *et al.*, 2003).

Sin embargo, también se ha demostrado que el tejido pulmonar es más sensible a presentar aductos y daño oxidante en el DNA, cuando se administran de manera oral a ratas dosis bajas y medias de partículas generadas por combustión de diesel. Se puede observar más daño en el pulmón que en otros órganos como el hígado o el colon, a pesar de que el pulmón sólo está expuesto de manera directa a los compuestos de las partículas cuando la exposición es por inhalación, evidenciando la susceptibilidad del tejido pulmonar a compuestos aromáticos (Müller, *et al.*, 2004). Por esta razón, por ejemplo, en el tratamiento de 3 días con partículas gruesas se observan niveles superiores de aductos

que los del grupo control, ya que estas partículas al ser eliminadas por deglución (Valentine and Kennedy, 2008), pueden provocar daño en el tejido pulmonar, a pesar de no haber estado en contacto con tal órgano.

Nuestras mediciones muestran que la exposición subcrónica de 8 semanas (ver Figura 11), los niveles de aductos no cambian de manera significativa respecto al grupo control, las ratas expuestas a con partículas gruesas y finas no muestran ninguna diferencia y en el grupo expuesto a partículas ultrafinas hay un cambio más evidente, sin embargo, no es significativo. También al comparar los niveles de aductos entre los periodos de exposición de 3 días y 8 semanas (ver Figura 12), resulta interesante notar que los niveles son bastante similares a pesar de las grandes diferencias en los tiempos de exposición, mostrando sólo cambios significativos entre los grupos control de ambos tratamientos.

Se podría esperar que a altas concentraciones de PAH la cantidad de aductos en el DNA sea alta y asimismo esto implique una mayor probabilidad a que se generen mutaciones críticas que lleven al desarrollo del cáncer, sin embargo se ha demostrado que no se trata de una relación simple (Godschalk, *et al.*, 2003). Además, se ha observado que la administración crónica de un agente carcinógeno aromático resulta en la obtención de un nivel estable de aductos y la inhibición en el incremento del número de aductos resulta en una menor carcinogenicidad de los compuestos aromáticos (Poirier and Beland, 1992).

Stinn y colaboradores (2005), en un estudio con ratas Wistar, tratadas con partículas provenientes de la combustión del diesel encontraron diferencias en el número de aductos en tejido pulmonar cuando la dosis de partículas es alta, observando una disminución en los niveles de aductos conforme el tratamiento se prolonga, es decir el número de aductos es mayor a los 18 meses que a los 24 meses de tratamiento con partículas; asimismo se observó que la probabilidad de generar tumores pulmonares es más alta cuando las ratas son expuestas por inhalación a partículas provenientes de la combustión del diesel que cuando son expuestas a partículas del humo de cigarrillo que inhalaron de forma pasiva, incrementándose a su vez la cantidad de tumores cuando las dosis de partículas en ambos casos son más altas. También Bottin y colaboradores (2006),

al exponer ratas Big Blue® con partículas derivadas del bitumen (producto derivado del proceso de refinación del petróleo) durante periodos de 3 y 30 días de exposición, no encontraron diferencias en el número de aductos en tejido pulmonar, a pesar de las diferencias en la duración de los tratamientos con partículas.

En un estudio realizado por Sato y colaboradores (2003) en la ciudad de Kawasaki, Japón, se observó que en ratas expuestas a partículas atmosféricas durante 4, 12, 24, 48 y 60 semanas, los niveles de aductos en tejido pulmonar y mucosa nasal, empiezan a decaer a partir de las 12 semanas de exposición respecto al número de aductos presentes en los animales expuestos durante 4 semanas, manteniéndose estables sin tener diferencias aparentes durante todo el tratamiento a pesar de estar hasta 60 semanas expuestas a partículas.

Las diferencias entre los tiempos de exposición utilizados en nuestro trabajo y los utilizados por Sato y colaboradores en sus grupos experimentales, podrían explicar la toxicocinética de los compuestos asociados a las partículas atmosféricas, al describir una curva en la que se podría ver el comportamiento de los niveles de aductos. Es decir, nuestro tratamiento de 3 días en una línea temporal se encuentra antes de la medición de 4 semanas del otro estudio y nuestro tratamiento de 8 semanas está antes del de 12 y 24 semanas. Podríamos sugerir que los niveles de aductos a los 3 días se encuentran apenas incrementándose, al no mostrar diferencias significativas respecto al control, pero sí existe una tendencia clara a aumentar. Sin embargo, alrededor de las 4 semanas se podría llegar a un punto cercano al nivel máximo en donde las diferencias son significativas al comparar contra el grupo control, ya que el número de aductos es bastante alto. Posteriormente los aductos podrían empezar a descender gradualmente como se ve en el tratamiento de 8 semanas, al mostrar niveles similares con el de 3 días de exposición y finalmente como se reporta en el trabajo de Sato (2003), a las 12 semanas de tratamiento se ve una disminución bastante evidente en el número de aductos, siendo a las 24 semanas, cuando los niveles son más bajos y se mantienen así hasta 60 semanas de tratamiento con partículas (Sato, *et al.*, 2003).

Las diferencias encontradas en los niveles de aductos entre los grupos controles de ambos periodos de exposición (ver figura 12), probablemente se deban a los límites de filtrado y purificación del sistema VACES, ya que a pesar de poseer un filtro HEPA con carbón activado y dióxido de aluminio (Debray, 2010), no se pueden eliminar en su totalidad los compuestos orgánicos volátiles presentes en el aire y asimismo es difícil filtrar partículas muy finas de diámetros inferiores a 0.3 μm que escapan del filtro (EPA, 2008). Entonces, tales partículas y los compuestos orgánicos volátiles presentes en las cámaras de aire filtrado, muy probablemente son los agentes causales de los altos niveles de aductos observados en el grupo control con 8 semanas de exposición a partículas.

En este caso, para monitorear si los animales estuvieron expuestos a compuestos aromáticos y PM inferior a 0.3 μm , lo ideal hubiera sido realizar pruebas de orina para determinar la presencia por ejemplo de 1-Hidroxipireno, el cual es utilizado como un biomarcador de exposición interna a PAHs (Bottin, *et al.*, 2006).

En una investigación realizada por la Universidad Autónoma Metropolitana y el CINVESTAV por Angulo (2012), a cargo de la Dra. Andrea de Vizcaya se llevó a cabo la caracterización de las partículas atmosféricas de la ZMVM. Para PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ se encontró que los PAH que se encuentran en mayor concentración (ng/mg de partícula) son: pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1, 2, 3-cd]pireno, dibenzo[a, h] antraceno, benzo[g, h, i]perileno. Haciendo un análisis de sus estructuras, se encontró que todos a excepción del pireno, poseen una región, denominada "bay-region" la cual se ha visto tiene relación con su grado de carcinogenicidad, siendo más tóxicos aquellos que posee tal región (Harvey, 1991; Woo and Lai, 2010), por lo que las partículas de la ZMVM parecen tener un alto potencial tóxico y carcinogénico.

También en el estudio anteriormente mencionado, se evaluó el papel de las enzimas de fase I, como el CYP1A1 así como de enzimas de fase II, la gamma-glutamyl cisteína sintetasa (γ -GCS) en el mismo modelo experimental usado en este trabajo. No se encontraron diferencias en la expresión de enzimas de fase I y II frente a la exposición a

partículas en los pulmones de rata, sugiriendo quizá que el metabolismo de compuestos orgánicos presentes en el PM llevado a cabo por CYP1A1 pudo haber sido muy rápido, por lo que a los 3 días y 8 semanas ya no es posible apreciar diferencias en su expresión debido a su decaimiento. En el caso específico de γ -GCS, al no hallar incrementos en su expresión, sugiere que las especies reactivas generadas por el metabolismo de fase I no están siendo eliminadas debido a la no inducción de γ -GCS o porque quizá se ha llevado el límite el sistema de conjugación, razón por la cual obtuvimos niveles detectables de aductos en el DNA. .

Dado que en nuestro estudio, los niveles de aductos no mostraron diferencias entre los dos tiempos de exposición (a excepción de los grupos controles), se sugirió que tales observaciones se pueden deber a la inducción de mecanismos de apoptosis debido al daño celular o genotóxico y/o la activación de los mecanismos de reparación del DNA. Se realizó la evaluación de la expresión de la proteína Caspasa 3 activa (datos no mostrados), para poder evidenciar si en el tejido pulmonar se estaban presentado eventos de apoptosis derivados de la exposición a las partículas (Zhang, *et al.*, 2007), sin embargo no se logró cuantificar la proteína en ninguno de los tratamientos, probablemente esto sea debido a que no se esté induciendo apoptosis en los pulmones de las ratas. Este hallazgo nos llevó a la posterior evaluación de la expresión de la proteína, componente crítico del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER), el cual es específico para la reparación de los "Bulky Adducts" o aductos abultados.

La expresión de ERCC1 a las tres semanas de exposición disminuye ligeramente en los tratamientos con partículas comparados respecto al control (ver Figura 14), esta disminución no es significativa, pero sí se aprecia una disminución de acuerdo al tipo de partícula. Asimismo, los niveles de expresión de ERCC1 en la exposición a partículas durante 8 semanas (ver Figura 16) no muestran diferencias respecto al control. Se puede apreciar un nivel de expresión de ERCC1 muy similar en todos los grupos experimentales y ninguna diferencia significativa fue encontrada. Sin embargo cuando se comparan los niveles ERCC1 a los 3 días y 8 semanas de tratamiento con partículas (ver Figura 17), se puede apreciar de manera muy clara que los niveles de expresión muestran diferencias

significativas entre cada de grupo de ambos tratamientos, la expresión de ERCC1 es más alta en todos los grupos experimentales del tratamiento de 8 semanas. Además, cabe destacar que también se encontraron diferencias significativas en la expresión de ERCC1 en los grupos controles, evidenciando que tales grupos de animales efectivamente estuvieron expuestos a compuestos aromáticos y tienen una relación con los incrementos de los niveles de aductos (ver Figura 12), y tales observaciones no son debido a error de la técnica de ^{32}P -Postlabeling.

En varios trabajos se ha estudiado la dinámica de expresión de diversos componentes del mecanismo NER (XPA, XPC, XPF, XPG y ERCC1). Tales investigaciones se han realizado en células bronquiales humanas (16HBE) expuestas a diferentes concentraciones de B[a]P. Se ha observado que la exposición en concentraciones bajas de B[a]P se puede inducir un incremento en la expresión de las proteínas del mecanismo NER, siendo ERCC1 la que se induce en mayor medida, lo que sugiere que funciona como un elemento crítico del mecanismo NER. En todas las proteínas evaluadas, después de haber estado expuestas a dosis altas de B[a]P y tiempos de entre 24-48 horas, los niveles de expresión decaen a niveles inferiores a los observados en el tiempo cero del tratamiento, describiendo una curva dependiente del tiempo y la dosis en la expresión de elementos del mecanismo NER (Yang, *et al.*, 2007; Yang, *et al.*, 2009).

Este comportamiento podría estar ocurriendo en nuestro modelo experimental, cuando los niveles de ERCC1 disminuyen de acuerdo al tipo de partícula y es menor a los tres días de haber iniciado la exposición. Al ser la disminución en la expresión de ERCC1 más evidente en el tratamiento con partículas ultrafinas (ver Figura 12), el potencial carcinogénico de este tipo de partícula podría ser mayor debido a la presencia de una concentración más alta de compuestos, por tal motivo la expresión de ERCC1 disminuye, como se demuestra en los otros trabajos. El comportamiento observado de las enzimas de reparación no se ha descrito bien en su totalidad, pero podría ser debido a la competencia entre la formación de aductos, la reparación del daño y la síntesis de las proteínas del sistema NER (Yang, *et al.*, 2007).

El incremento significativo de los niveles de expresión de ERCC1 entre la exposición aguda y crónica (ver Figura 17), podría explicar el comportamiento encontrado en los niveles de aductos. El mecanismo NER, es el encargado de reparar el daño en el DNA originado por las diferentes clases de compuestos aromáticos que están asociados a las partículas respiradas por los animales experimentales. Se ha demostrado en varios estudios que ERCC1 es una proteína que juega un papel crucial en el mecanismo NER, su sobreexpresión ha demostrado que refleja una alta actividad del mecanismo NER, lo cual está relacionado con la resistencia de varias clases de tumores a agentes quimioterapéuticos que generan aductos o alquilaciones en el DNA y su expresión se ha empleado como un marcador de resistencia, por ejemplo a cisplatino en pacientes con cáncer de hígado, ovario, pulmón, entre otros (Li, *et al.*, 2000; Lord, *et al.*, 2000; Fautrel, *et al.*, 2005). En este caso, la sobreexpresión de ERCC1 evita que el número de aductos en el tejido pulmonar se incremente, fungiendo como un mecanismo protector al daño genómico por aductos, como en los tumores que sobreexpresan ERCC1.

Al realizar una correlación entre el nivel de daño y la expresión de ERCC1 a los tres días de exposición (ver Figura 18), se puede apreciar una relación inversamente proporcional con el nivel de daño y la expresión de ERCC1. Conforme al tipo de partícula, la expresión de ERCC1 disminuye y posiblemente debido a ese descenso los niveles de aductos tiendan a incrementarse. El mecanismo por el cual descienden los niveles de expresión de los componentes del mecanismo NER no se encuentra del todo descrito, pero como sugiere Yang y colaboradores (2007), quizá tales descensos se deban a un equilibrio entre la generación de aductos, reparación y la síntesis de los elementos del sistema NER, ya que la formación de aductos en el DNA y la inducción de los mecanismos de reparación están determinados por la cantidad (concentración) de compuestos orgánicos asociados a las partículas atmosféricas.

Sin embargo, en la correlación del nivel de daño y expresión de ERCC1 de la exposición crónica de 8 semanas (ver Figura 19), en los niveles de aductos entre el grupo control y los grupos tratados con partículas gruesas y finas no hay cambio, los niveles de ERCC1 muestran ligeros incrementos conforme al tipo de partícula, asimismo en el grupo tratado

con partículas ultrafinas el número de aductos es más alto comparado con los demás grupos y los niveles de ERCC1 son superiores que en el grupo control y el grupo tratado con partículas gruesas. Se puede notar que en una exposición crónica, los niveles de expresión de la proteína son mayores probablemente debido a la respuesta que se ha montado contra los agentes genotóxicos a los que se han expuesto a los animales del laboratorio, cuando se comparan con los niveles observados en una exposición aguda donde los mecanismos de reparación apenas se podrían estar induciendo.

8. CONCLUSIONES

- Las partículas atmosféricas de la ZMVM son capaces de generar aductos en tejido pulmonar de ratas Sprague-Dawley, muy posiblemente debido a los compuestos aromáticos asociados a éstas, y este tipo de daño en el DNA podría ser útil como biomarcador de exposición y dosis biológicamente efectiva.
- Como se esperaba, debido a las propiedades aerodinámicas y químicas ya bien conocidas, las partículas ultrafinas fueron las que generaron mayores niveles de aductos en el DNA.
- Asimismo, el nivel de daño en el DNA parece estar en función del tamaño de partícula cuando la exposición es aguda (3 días), ya que la cantidad de daño tiene una tendencia a ser inversamente proporcional respecto al tamaño de partícula, incrementándose conforme las partículas son de menor diámetro.
- La expresión de ERCC1 hallada, muestra que en los tratamientos de 3 días y 8 semanas, no hay diferencia entre tratamientos con diferentes tipos de partículas y el grupo control para cada tiempo de exposición. Sin embargo, entre ambos periodos, se encontró un incremento significativo de la expresión de ERCC1 entre todos los tipos de tratamientos y controles, siendo más alta en el periodo de exposición subcrónico.
- Contrario a lo esperado, en exposiciones subcrónicas (8 semanas), los niveles de aductos en el DNA no se incrementan debido al tratamiento que es más extenso comparándolo con el grupo de exposición agudo; este comportamiento entre ambos periodos de exposición se debe muy probablemente a la inducción de los mecanismos de reparación del DNA a través de ERCC1. En este caso, el mecanismo NER elimina los aductos voluminosos (Bulky Adducts) generados por la exposición al material particulado. Por lo tanto ERCC1 es una proteína útil como indicador de la inducción del mecanismo de reparación NER en este modelo.
- De la misma manera, dentro del grupo de exposición subcrónica los niveles de aductos no siguen una relación con el tamaño de partícula, a excepción de la fracción ultrafina. Tal comportamiento también puede deberse a la inducción del sistema NER, teniendo

en cuenta que la fracción ultrafina tiene una muy alta capacidad de generar daño en el DNA que sobrepasa la actividad del sistema de reparación.

- El mecanismo NER en este modelo, parece no tener una respuesta inmediata, ya que en tiempos cortos de 3 días no muestra un efecto sobre el nivel de aductos, esto posiblemente sea debido a que la expresión basal de las proteínas que conforman el mecanismo NER quizá no es la suficiente como para disminuir el nivel de daño.

9. PERSPECTIVAS

Otros factores podrían estar involucrados en la toxicocinética de los compuestos asociados a las partículas atmosféricas y asimismo en los niveles de aductos en el DNA. Tales factores son la actividad y expresión de enzimas de fase I o la expresión de enzimas de fase II, por tanto sería conveniente evaluar esos parámetros para poder comprender de manera más específica el metabolismo de los compuestos asociados a las partículas atmosféricas y sus efectos. Del mismo modo, para poder esclarecer tal cuestión, se podrían realizar estudios a tiempos intermedios y más extensos a los usados en este estudio, evaluando los parámetros antes mencionados. También se puede llevar a cabo la determinación de la composición del material particulado para cada diámetro aerodinámico de la distribución trimodal de la ZMVM para conocer de manera específica a que clases de compuestos los animales experimentales y la población están expuestos.

La expresión de las proteínas del mecanismo NER ha sido poco investigada para estudios de monitoreo realizados *in vivo*, su estudio está más restringido al área clínica sobre la resistencia a agentes quimioterapéuticos, por tal motivo, el evaluar los demás componentes y asimismo los demás mecanismos de reparación, por ejemplo, el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) podría aportar ideas su papel de estos sistemas en exposiciones a carcinógenos químicos, debemos recordar que estamos expuestos a mezclas de agentes genotóxicos, por lo tanto, más de un mecanismo de reparación podría estar funcionando al mismo tiempo.

10. REFERENCIAS

- Angulo, O. R. 2012. Evaluación de la inducción de enzimas de biotransformación por la exposición a compuestos orgánicos contenidos en las PM de la Ciudad de México, Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, México, 68 pp.
- Arlt, V. M., B. L. Sorg, M. Osborne, A. Hewer, A. Seidel, H. H. Schmeiser and D. H. Phillips. 2003. DNA adduct formation by the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone and its metabolites in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **300**: 107-114 p.
- Badaut, Jérôme, L. Hirtz, C. Granziera, J. Bogousslavsky, P. J. Magistretti and L. Regli. 2001. Astrocyte-specific Expression of Aquaporin-9 in Mouse Brain is Increased After Transient Focal Cerebral Ischemia, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **21**: 477-482 p.
- Balajee, A. S. and V. A. Bohr. 2000. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair, *Gene*, **250**: 15-30 p.
- Batty, D. P. and R. D. Wood. 2000. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA, *Gene*, **241**: 193-204 p.
- Beland, F. A. and M. C. Poirier. 1994. DNA Adducts and Their Consequences. In: *Methods to Assess DNA Damage and Repair: Interspecies Comparisons*, R. G. Tardiff, P. H. M. Lohman and G. N. Wogan (Eds.), First edition, John Wiley & Sons Ltd, England, 29-55 p.
- Binková, B., L. Dobiáš, T. Wolff and R. J. Šrám. 1994. ³²P-Postlabeling analysis of DNA adducts in tissues of rats exposed to coke-oven emissions. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **307**: 355-363 p.
- Boelsterli, U. A. 2007. *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets*, Second edition, CRC Press Taylor and Francis Group, United States of America, 63-11, 221-246 p.
- Bottin, M. C., L. Gate, B. Rihn, J. C. Micillino, M. Nathalie, A. Martin, H. Nunge, G. Morel, R. Wrobel, L. A. Fanou, C. Champmartin, G. Keith and S. Binet. 2006. Genotoxic

- effects of bitumen fumes in Big Blue® transgenic rat lung. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **596**: 91-105 p.
- Brunekreef, B. and S. T. Holgate. 2002. Air pollution and health, *The Lancet*, **360**: 1233-1242 p.
 - CCSSO (Centro Canadiense de Seguridad y Salud Ocupacional). 1999. ¿Cómo entran los Particulados al Sistema Respiratorio? Recurso en línea, consultado el 25 de febrero de 2013 en: <www.ccsso.ca/oshanswers/chemicals/how_do.html#top>
 - Chang, C., H. M. Sheu, Y. S. Huang, T. R. Tsai and K. W. Kuo. 1999. A Novel Function of Emodin, Enhancement of the Nucleotide Excision Repair of Uv and Cisplatin-Induced DNA Damage in Human Cells, *Biochemical Pharmacology*, **58**: 49-57 p.
 - Costa, R. M. A., V. Chinganças, R. S. Galhardo, H. Carvalho, and C. F. M. Menck. 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, *Biochimie*, **85**: 1083–1099 p.
 - De Vizcaya-Ruiz, A., M. E. Gutiérrez-Castillo, M. Uribe-Ramírez, M. E. Cebrián, V. Mugica-Álvarez, J. Sepúlveda, I. Rosas, E. Salinas, C. García-Cuellar, F. Martínez, E. Alfaro-Moreno, V. Torres-Flores, A. Osornio-Vargas, C. Siouta, M. Singh, M. D. Geller, T. Kuhn, A. H. Miguel, A. Eiguren-Fernández, R. H. Schiestl, R. Reliene, J. Froines. 2006. Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City, *Atmospheric Environment*, **40**: S583-S592 p.
 - Debray, G. Y. 2010. Evaluación de la Respuesta Inflamatoria y Daño Oxidativo en Pulmón de Ratas Expuestas a Partículas Atmosféricas (PM) de la Ciudad de México, Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional (IPN), México, 97 pp.
 - Dipple, A. 1995. DNA adducts of chemical carcinogens, *Carcinogenesis*, **16 (3)**: 437-441 p.
 - Donaldson, K. and V. Stone. 2003. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles, *Ann Ist Super Sanità*, **39 (3)**: 405-410 p.
 - EPA (Environmental Protection Agency). 1988. Atmospheric Sampling Course 435, Student Manual, Chapter 4: Particulate Matter Sampling, Air Pollution Training Institute (APTI), United States of America, Chicago, 62 pp.

- EPA (Environmental Protection Agency). 2008. Guide to Air Cleaners in the Home. Office of Air and Radiation, Indoor Environments Division, 11 pp.
- Fautrel, A., L. Andrieux, O. Musso, K. Boudjema, A. Guillouzo and S. Langouët. 2005. Overexpression of the two nucleotide excision repair genes ERCC1 and XPC in human hepatocellular carcinoma, *Journal of Hepatology*, **43**: 288-293 p.
- Fortini, P., B. Pascucci, E. Parlanti, M. D'Errico, V. Simonelli, E. Dogliott. 2003. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*, **85**: 1053-1071 p.
- Franklin, M. R., and G. S. Yost. 2000. Biotransformation: A balance between bioactivation and detoxification. In Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, P. L. Williams, R. C. James, and S. M. Roberts (Eds.), 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 57-86 p.
- García-Suástegui, W. A., A. Huerta-Chagoya, K. L. Carrasco-Colín, M. M. Pratt, K. John, P. Petrosyan, J. Rubio, M. C. Poirier and M. E. Gonsebatt. 2011. Seasonal variations in the levels of PAH–DNA adducts in young adults living in Mexico City, *Mutagenesis*, **3 (26)**: 385-391 p.
- Godschalk, R. W. L., F. J. Van Shooten and H. Bartsch. 2003. A Critical Evaluation of DNA Adducts as Biological Markers for Human Exposure to Polycyclic Aromatic Compounds, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36 (1)**: 1-11 p.
- González-Púmariega, M., M. V. Tamayo y A. Sánchez-Lamar. La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana, *Theoria*, **18**: 69-80 p.
- Gooderham, H. J. and P. L. Carmichael. 2007. The Formation of DNA Adducts, In: The Cancer Handbook, M. R. Alison (Ed.), 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 292-307 p.
- Gossage, L. and S. Madhusudan. 2007. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **33**: 565-577 p.
- Gutiérrez-Castillo, M. E., M. Olivos-Ortiz, A. De Vizcaya-Ruiz and M. E. Cebrián. Chemical characterization of extractable water soluble matter associated with PM₁₀ from Mexico City during 2000, *Chemosphere*, **61**: 701-710 p.

- Hang, B. 2010. Formation and Repair of Tobacco Carcinogen-Derived Bulky DNA Adducts. *Journal of Nucleic Acids*, doi:10.4061/2010/709521, 29pages.
- Harvey, R. G. 1991. Polycyclic Aromatics Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge Monographs on Cancer Research, Cambridge University Press, 396 pp.
- Kadlubar, F. F. 1994. DNA Adducts of carcinogenic aromatic amines. In: DNA Adducts: Identification and Biological Significance, K. Hemminki, D. E. G. Shuker, F. F. Kadlubar, D. Segerbäck and H. Bartsh (Eds.), First edition, IARC (International Agency for Research on Cancer) Scientific Publications, N° 125, Lyon, France, 199-216 p.
- Kim, S., A. Jaques, M. Chang, J. Froines and C. Sioutas. 2001a. Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous *in vivo* and *in vitro* evaluation of toxic effects of ultrafine, fine and coarse ambient particles. Part I: Development and laboratory characterization. *Journal of Aerosol Science*, **32**: 1281-1297 p.
- Kim, S., Jaques, A., Chang, M., Barone, T., Xiong, C., Friedlander, K., Sioutas, C. 2001b. Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous *in vivo* and *in vitro* evaluation of toxic effects of ultrafine, fine and coarse ambient particles. Part II: Field evaluation. *Journal of Aerosol Science*, **32**: 1299-1314 p.
- Kulkarni, S. G. and H. M. Mehendale. 1998. Benzo[a]pyrene. In: Encyclopedia of Toxicology, Volume 1, P. Wexler (Ed.), Academic Press, 137-139 p.
- Li, Q., J. J. Yu, C. Mu, M. K. Yunmbam, D. Slavsky, C. L. Cross, F. Bostick-Bruton and E. Reed. 2000. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* **20**: 645-52 p.
- Lord, R. V., J. Brabender, D. Gandara, V. Alberola, C. Camps, M. Domine, F. Cardenal, J. M. Sanchez, P. H. Gumerlock, M. Taron, J. J. Sanchez, K. D. Danenberg, P. V. Danenberg and R. Rosell. 2002. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**: 2286-2291 p.

- Manahan, S. E. 2010. Environmental Chemistry, Ninth edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 265-284 p.
- Melis, J. P. M., M. Luijten, L. H. F. Mullenders and H. Steeg. 2011. The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutation Research*, **728**: 107-117 p.
- Memisoglu, A. and L. Samson. 2000. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutation Research, Fundamental and molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **451**: 39-51 p.
- Mugica, V., E. Ortiz, L. Molina, A. De Vizcaya-Ruiz, A. Nebot, R. Quintana, J. Aguilar, E. Alcántara. 2009. PM composition and source reconciliation in Mexico City, *Atmospheric Environment*, **43**: 5068-5074 p.
- Mugica, V., F. Mugica, M. Torres, J. Figueroa. 2008. PM_{2.5} Emission Elemental Composition from Diverse Combustion Sources in the Metropolitan Area of Mexico City, *The Scientific World Journal*, **8**: 275-286 p.
- Müller, A. K., E. O. Farombi, P. Møller, H. N. Autrup, U. Vogel, H. Wallin, L. O. Dragsted, S. Loft and M. S. Binderup. 2004. DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue® rats. *Mutation Research, Fundamental and molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **550**: 123-132 p.
- Phillips, D. H. 2007. The Formation of DNA Adducts, In: The Cancer Handbook, M. R. Alison (Ed.), 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 308-311 p.
- Phillips, D. H. and V. M. Artl. 2007. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts. *Nature Protocols*, **2**: 2772-2781 p.
- Poirier, M. C. 1997. DNA Adducts as Exposure Biomarkers and Indicators of Cancer Risk, *Environmental Health Perspectives*, **105**: 907-912 p.
- Poirier, M. C. and F. A. Beland. 1992. DNA Adduct Measurements and Tumor Incidence During Chronic Carcinogen Exposure in Animal Models: Implications for DNA Adduct-Based Human Cancer Risk Assessment, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**: 749-755 p.
- Pope, C. A. 2000. Epidemiology of Fine Particulate Air Pollution and Human Health Biologic Mechanisms and Who's at Risk?, *Environmental Health Perspectives*, **108**: 713-723 p.

- Pope, C. A. and D. W. Dockery. 2006. Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect, *Journal of the Air & Waste Management Association*, **56**: 709-742 p.
- Rana, S. V. S. 2006. Environmental Pollution: Health and Toxicology, First edition, Alpha Science International Ltd., Oxford, United Kingdom, 12-13 p.
- Rose, R. L. and E. Hodgson. 2004. Metabolism of Toxicants. In: A Textbook of Modern Toxicology, E. Hodgson (Ed.), Third edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 111-148 p.
- Rundle, A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **600**: 23-36 p.
- Sato, H., K. T. Suzuki, H. Sone, Y. Yamano, J. Kagawa and Y. Aoki. 2003. DNA-adduct formation in lungs, nasal mucosa, and livers of rats exposed to urban roadside air in Kawasaki City, Japan, *Environmental Research*, **93**: 36-44 p.
- Schorr, S. 2010. Replication of Bulky DNA Adducts, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland, 186 pp.
- Secretaria del Medio Ambiente-Gobierno del Distrito Federal, 2008. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM, México, Distrito Federal, 149 pp.
- Shibutani, S. S. Y. Kim and N. Suzuki. 2006. ³²P-Postlabeling DNA Damage Assays: PAGE, TLC, and HPLC. In: Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols: Mammalian systems, D. S. Henderson (Ed.), Second edition, Humana Press Inc., 307-321 p.
- Shuck, S. C., E. A. Short, J. J. Turchi. 2008. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Research*, **18**: 64-72 p.
- Shuker, D. E. G. and H. Bartsch. 1994. DNA Adducts of nitrosamines. In: DNA Adducts: Identification and Biological Significance, K. Hemminki, D. E. G. Shuker, F. F. Kadlubar, D. Segerbäck and H. Bartsh (Eds.), First edition, IARC (International Agency for Research on Cancer) Scientific Publications, N° 125, Lyon, France, 73-89 p.

- Stinn, W., A. Teredesai, E. Anskeit, K. Rustemeier, G. Schepers, P. Schnell and H. S. Haussmann. 2005. Chronic Nose-Only Inhalation Study in Rats, Comparing Room-Aged Sidestream Cigarette Smoke and Diesel Engine Exhaust. *Inhalation Toxicology*, **17**: 549-576 p.
- Topinka, J., J. Hovorka, A. Milcova, J. Schmuczerova, J. Krouzek, P. Rossner and R. J. Sram. 2010. An acellular assay to assess the genotoxicity of complex mixtures of organic pollutants bound on size segregated aerosol. Part I: DNA adducts, *Toxicology Letters*, **198**: 304-311 p.
- Valentine, R. and G. L. Kennedy. 2008. Inhalation Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A. W. Haynes (Ed.), Fifth edition, Taylor and Francis, Philadelphia, USA, 1407-1464 p.
- Vogel, U., M. Dybdahla, G. Frenzb and B. A. Nexø. 2000. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutation Research/DNA Repair*, **461**: 197-210 p.
- WHO (World Health Organization). 2000. Chapter 5.9: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), In: Air Quality Guidelines Second Edition, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 24 pp.
- WHO (World Health Organization). 2003. Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen Dioxide, Bonn, Germany, 98 pp.
- Wolff, R. K., J. A. Bond, J. D. Sun, R. F. Henderson, J. R. Harkema, W. C. Griffith, J. L. Mauderly, R. O. McClellan. 1989. Effects of adsorption of benzo[a]pyrene onto carbon black particles on levels of DNA adducts in lungs of rats exposed by inhalation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **97**: 289-299 p.
- Woo, Y. and D. Y. Lai. 2010. (Q) SAR Analysis of Genotoxic and Nongenotoxic Carcinogens: a State-of-the-Art Overview. In: *Cancer Risk Assessment, Chemical Carcinogenesis, Hazard Evaluation and Risk Quantification*, C. Hsu and T. Stedeford (Eds.) First edition, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA, 517-556 p.

- Yang, J. X. Liu, P. Niu, Y. Zou and Y. Duan. 2009. Correlations and co-localizations of Hsp70 with XPA, XPG in human bronchial epithelia cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicology*, **265**: 10-14 p.
- Yang, J., X. Liu, P. Niu, Y. Zou, Z. Gong, J. Yuan and T. Wu. 2007. Dynamic changes of XPA, XPC, XPF, XPG and ERCC1 protein expression and their correlations with levels of DNA damage in human bronchial epithelia cells exposed to benzo[a]pyrene, *Toxicology Letters*, **174**: 10-17 p.
- Zhang, J., A. J. Ghio, W. Chang, O. Kamdar, G. D. Rosen and D. Upadhyay. 2007. Bim mediates mitochondria-regulated particulate matter-induced apoptosis in alveolar epithelial cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **581**: 4148-4152 p.