



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

GENOTOXICIDAD EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS
EXPUESTOS *IN VITRO* A METALES PESADOS ASOCIADOS A PM₁₀ DE
ECATEPEC (EDO. DE MÉXICO)

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

ZELMY CASTRO GÁLVEZ

TUTORA PRINCIPAL

DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA.
UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.
DR. JESÚS FRANCISCO ARENAS HUERTERO, POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014.



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.



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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria celebrada el día 17 de febrero del presente, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CASTRO GÁLVEZ ZELMY** con número de cuenta 98049095 con la tesis titulada "**GENOTOXICIDAD EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS EXPUESTOS IN VITRO A METALES PESADOS ASOCIADOS A PM₁₀ DE ECATEPEC (EDO. DE MÉXICO)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA**:

Presidente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAÍZ
Vocal: DR. RAFAEL DE JESÚS VILLALOBOS Y PIETRINI
Secretario: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Suplente: DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA
Suplente: DR. RICARDO TORRES JARDÓN

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de abril 2014.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente interesada

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el crecimiento profesional que obtuve al estudiar la maestría.

A CONACYT por la beca recibida durante 2 años del desarrollo del presente trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo financiero a través del PAEP para la asistencia “4° International Conference on Biomarkers & Clinical Research, Philadelphia Downtown, USA”. Asimismo, reitero mi agradecimiento a la UNAM por el apoyo monetario del PAEP para la impresión de la presente tesis.

A PAPIIT por el apoyo económico (PAPIIT-DGAPA-UNAM IN215911) para la asistencia al “IV Congreso Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina de la Sociedad Mexicana de Bioquímica” en Juriquilla, Querétaro y para el Taller impartido en dicho congreso.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera por el apoyo financiero recibido del Fondo Especial de Ingresos Extraordinarios del CCA, para concluir con los trámites y obtener el grado de maestría.

A los integrantes de mi Comité Tutorial: a la Dra. María Elena Calderón Segura, al Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero y al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por su tiempo, apoyo, amistad, por todo lo que me enseñaron, por sus observaciones, sugerencias y críticas que fortalecieron mi crecimiento profesional y me permitieron desarrollar mejor el presente trabajo. Muchas gracias desde el corazón.

A mis sinodales por tu tiempo y sugerencias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Quiero agradecer:

A mis padres, por la vida amorosa que me han dado. Son para mí un ejemplo de disciplina, constancia, esperanza, generosidad y amor.

A los pequeños Andrés y Enrique por su existencia que alegra mi vida.

A mis hermanas, por lo que me enseñan para superarme.

A mis amigos y compañeros con los que he compartido muchas vivencias en este andar: Oli, Ile, Sarai, Francisco, Montserrat, Liliana, Isabel, Tere, Arisbel, Anita, Aida, Liz, al equipo computo maravilla (Miguel, Carlos, Higicel y Luis), Danniely, Marthitas, Lolita, Maru, Laura, Jessy y Clau.

A Victoria Carrillo Rodríguez y Elena Margarita Amaya Silva por todo su apoyo en el laboratorio.

A Gabriela Diego Casimiro por ser una gran amiga y por apoyarme siempre con todos mis trámites de la maestría con mucho profesionalismo.

A Juan Carlos por compartir una vida con amor, risas y admiración.

Y a la vida por lo increíble que ha sido.

¡GRACIAS!

Para mis padres con mucho amor

“Aprendí administración de las hormigas; música, oyendo los aguaceros;
esculturabuscando parecido a los seres en las líneas de las rocas;
color, en la luz; poesía, en toda la naturaleza”

Salvador Rueda

ÍNDICE

	Página
RESÚMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	7
II.I Biomarcadores	7
II.II El Ensayo Cometa como un biomarcador de efecto	10
II.III Los micro-RNAs como marcadores moleculares epigenéticos de contaminación ambiental	11
II.IV Genotoxicidad por MP	17
II.V Estudios epigenéticos deMP	18
II.VI Toxicidad de los metales pesados y su relación con estrés oxidante	20
II.VI.I Aluminio	23
II.VI.II Cadmio	24
II.VI.III Cobalto	26
II.VI.IV Cromo	27
II.VI.V Cobre	29
II.VI.VI Hierro	30
II.VI.VII Níquel	32
II.VI.VIII Plomo	34
II.VI.IX Vanadio	35
II.VI.X Manganeso	37
II.VII Inhalación de MP	38
III. ÁREA DE ESTUDIO	41
IV. JUSTIFICACIÓN	43
V. HIPÓTESIS	44
VI. OBJETIVOS	44
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	45
VII.I Obtención de la fracción de MP asociados al aire urbano de Ecatepec, Edo. de México	45

VII.II Digestión de los filtros para la extracción de MP	45
VII.III Evaluación genotóxica y citotóxica de las fracciones de MP en linfocitos periféricos humanos in vitro	47
VII.III.I Ensayo Cometa alcalino	49
VII.III.II Evaluación de la expresión del miR-21	51
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
IX. RESULTADOS	54
IX.I Genotoxicidad	54
IX.II Regresión Lineal	63
IX.III Evaluación de la expresión del miR-21	69
IX.IV Citotoxicidad in vitro en los linfocitos periféricos humanos expuestos a las mezclas de MP de las PM ₁₀ de cuatro sitios de Ecatepec Estado de México	72
IX.V Identificación y Cuantificación de MP	72
X. DISCUSIÓN	79
X.I Genotoxicidad.	81
X.II Expresión del miR-21.	88
X.III Comparación de la concentración de los metales de la zona de estudio con otros lugares.	91
XI. CONCLUSIONES	94
XII. ANEXO I	96
XIII. ANEXO II	99
XIV. REFERENCIAS	101

RESUMEN

El municipio de Ecatepec se encuentra al noreste de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVC), ocupa el cuarto lugar de las zonas más industrializadas del país, en donde se liberan metales pesados (MP) a la atmósfera. Los MP ejercen su toxicidad directa o indirectamente por producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales oxidan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos induciendo rompimientos del ADN, modificaciones de sus bases o aductos (Mena et al., 2008). El presente estudio analizó la concentración y tipo de MP asociados a PM_{10} de cuatro sitios de Ecatepec, Estado de México, así como el daño en ADN y la expresión del miRNA-21 en linfocitos periféricos humanos (LPH) *in vitro* de dos donadores sanos masculinos y de la misma edad.

El análisis químico de las mezclas de MP (F1-F4) asociados PM_{10} del aire urbano de Ecatepec muestra diferentes concentraciones de Al, Fe, V, Cd, Co, Cr, Cu, Ni y Mn. Los resultados genotóxicos muestran que las mezclas de MP de los cuatro sitios de Ecatepec inducen significativamente daño en el ADN en LPH *in vitro* de ambos donadores, con aumento en los promedios de la frecuencia de cometas: de 29 % a 91 %; de la longitud de la cauda: de 48.5 a 72.62 μm ; y del momento de la cauda: de 5.87 a 6.44%, comparados con los valores del testigo negativo ($p < 0.001$). La acción genotóxica de las mezclas de MP en los LPH *in vitro* en ambos donadores fue dependiente de la concentración. A mayores concentraciones de las mezclas de MP causaron severo daño en el ADN de las células humanas de ambos donadores con el 80 % y 90 % de los cometas con gran longitud de las caudas con relación al testigo negativo ($p < 0.001$). Las mezclas de MP indujeron sobreexpresión del miR-21 en los LPH de los dos donadores en el intervalo de 1 a 3040 con relación al testigo negativo. Las acciones genotóxica, epigenética y citotóxica de las mezclas de MP de los cuatro sitios de Ecatepec en las células sanguíneas humanas *in vitro* fueron dependientes del tipo y concentraciones de metales y de la sensibilidad interindividual.

ABSTRACT

The township of Ecatepec is located Northeast of the Metropolitan Zone of the Valley of Mexico (ZMVC), it has the fourth place of the townships more industrialized in the country, where the Heavy Metals (MP) are release to the atmosphere. MP exert their toxicity direct or indirectly by production a large quantity of reactive oxygen species (ROS), which can oxidate to proteins, lipids and nucleic acids to induce DNA strand breaks or bases modifications or adduct (Mena et al., 2008). The present study analyzed concentration and type of the heavy metal associated to PM₁₀ as well as DNA damage and miRNA-21 expression in human peripheral lymphocytes (LPH) *in vitro* from two sex and age male donors. Chemistry analyze of MP-PM₁₀ mixes from Ecatepec, shows concentration different of Al, Pb, V, Fe Cd, Co, Cr, Cu, Ni, and Mn. Genotoxic results show that heavy metals mix of the four sites in Ecatepec induce significantly DNA damage in LPH *in vitro* in both donors with increase in means of the comets frequencies: 29-91 comets, in the tail length: 48.5 to 72.62 μ m, and in the tail moment: 5.87 to 6.44% compared with negative controls (6 comets, 18.33 μ m, 0.49%)($p < 0.001$). The genotoxic effect of the heavy metals mix from the four sites was concentration-dependent manner and composition of heavy metals. To higher concentrations of heavy metals caused severe DNA damage, as indicated by between 80 and 90% of comets with a greater tail length with relation negative to controls ($p < 0.001$). The PM₁₀-heavy metals mixes produced the miR-21 differential expression in the LPH *in vitro* from both donors of 1 to 3040 times more than the negative control ($p < 0.001$). The genotoxic, epigenetic and cytotoxic actions of the PM₁₀-heavy metal mixes in the human peripheral lymphocytes *in vitro* from two donors were dependants of the type and concentration of metals and interindividual susceptibility.

I. INTRODUCCIÓN

La gran demanda de combustibles fósiles que se requieren para abastecer las necesidades de la industria, el transporte y los diversos servicios que se consumen en las grandes ciudades, genera diversos contaminantes atmosféricos, algunos de ellos difíciles de mitigar. En la Ciudad de México, se han detectado niveles elevados de compuestos orgánicos volátiles (COVs), óxidos de nitrógeno (NO_x), ozono (O_3), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), MP, partículas suspendidas totales (PST), PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, los cuales tienen repercusiones negativas en la salud humana y en el equilibrio de los ecosistemas (Querol et al., 2008; Molina et al., 2010; SMA-GDF, 2012).

De acuerdo al Informe Anual de Calidad del Aire (SMA-GDF, 2009) el valor límite de ozono (0.110 ppm) fue superado en la Ciudad de México y el Estado de México, registrándose hasta 0.198 y 0.165 ppm en la estación Pedregal y Xalostoc (Edo. de México), respectivamente. Para el caso de las partículas suspendidas totales el valor límite de $210 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sólo se cumplió en la estación de UAM Iztapalapa con $202 \mu\text{g}/\text{m}^3$, mientras que Xalostoc alcanzó los $769 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Acorde a la Organización Mundial de la Salud, México ocupó entre el 2000 y el 2005 el segundo lugar a nivel mundial por reportar concentraciones elevadas de dióxido de nitrógeno y el tercero por dióxido de azufre.

En 1990, con el “aparente” intento de disminuir las emisiones de contaminantes por el aumento del tránsito vehicular en la Ciudad de México se establecieron medidas como los programas de verificación vehicular, el “hoy no circula” y la introducción de gasolina con menor cantidad de plomo y más oxigenada (Lacasaña-Navarro et al., 1999). Estas medidas no fueron suficientes para disminuir los contaminantes emitidos a la

atmósfera, sino que al contrario, resultaron en un incremento en otros contaminantes como ozono y formaldehído (Bravo-Álvarez y Torres-Jardón, 2002). En zonas industriales como es el Norte de la Ciudad de México, se han encontrado en la atmósfera partículas ricas en MP, principalmente zinc y plomo (Mofett et al., 2008). Vega y colaboradores (2004) encontraron que del 70 al 80% de la materia particulada de la Ciudad de México está compuesta por metales, constituyendo el 13% de genotóxicos. A partir de 1991 en la ZMVM comenzaron los estudios del efecto a nivel genético sobre partículas suspendidas.

Comúnmente, las partículas suspendidas (PM) se agrupan en tres grupos: partículas suspendidas totales (PST) que son todas aquellas con tamaño menor o igual a 80 μm aproximadamente; partículas menores o iguales a 10 μm (PM_{10}) y partículas menores a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$). Las partículas ultra finas que tienen un corte de $\sim 0.1 \mu\text{m}$, representan una pequeña proporción de la masa total de las PST, pero presentan el mayor efecto en la salud debido a su habilidad de pasar desde los pulmones directamente al torrente sanguíneo (Bravo-Álvarez y Torres-Jardón, 2002).

Las PM_{10} pueden ser generadas por procesos mecánicos como la abrasión de superficies, por la fracción de sólidos o gotas, por la suspensión y re-suspensión de polvos y por la reacción de gases con partículas. En esta categoría se encuentran las partículas provenientes del suelo, del polvo de caminos, de la construcción de los incendios forestales, de la industria, cenizas, aceites, madera, nitratos y clorhídricos, carbonatos de calcio, sales, polen, residuos de neumáticos y óxidos de elementos de la corteza terrestre (aluminio, titanio, hierro, sílice), los cuales tienen vida media de minutos a días y son

removidos por la lluvia o por gravedad (Barrera, 2012). Las partículas de polvo y hollín, facilitan las reacciones heterogéneas de oxidación que se dan entre metales como hierro, manganeso, vanadio o níquel, con dióxidos de azufre (SO₂) emitidos por las industrias (Johnson et al., 2006).

La distribución espacial de las partículas atmosféricas no es homogénea, depende de diversos factores físicos y químicos, tales como la ubicación de las fuentes que las generan, las estaciones, la dirección e intensidad de los vientos y la temperatura. Los dos últimos están más asociados con la ocurrencia de condiciones de turbulencia atmosférica, que a su vez favorece la resuspensión de las partículas ya depositadas en el suelo y en superficies. Las concentraciones de PM₁₀ y PM_{2.5} pueden alcanzar el máximo nivel en el invierno debido a que durante la noche en esta época se forma una capa de inversión térmica sobre la superficie que propicia la acumulación de los contaminantes y evita su dispersión, mientras que el mínimo se encuentra en la temporada de lluvias, ya que la precipitación remueve una cantidad importante de contaminantes del aire mediante el depósito húmedo.

En el proyecto “Diseño, adquisición e instalación de una red para el monitoreo de partículas menores a 2.5 µm (PM_{2.5}) en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, identificación de sitios para el monitoreo de PM_{2.5} en las regiones de Ecatepec, Tlalnepantla, Cuauhtémoc y Nezahualcóyotl” llevado a cabo por la red de Calidad del Aire del Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA), se reporta que la región noreste (Xalostoc), tiene mayor concentración y variedad de partículas, propiciada por el tránsito vehicular y las emisiones industriales, mientras que el sureste

(Pedregal) registra menor número de partículas. Además, se identificó que el 93.3% de las partículas colectadas de las distintas regiones eran menores a $1 \mu\text{m}$.

De acuerdo al informe sobre la calidad de aire del 2009, la ciudad de México y el Estado de México no cumplen con el valor promedio anual límite ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$) definido en la NOM-025-SSAI-1993 para las PM_{10} ni para $\text{PM}_{2.5}$ ($15 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Sólo los reportes de la estación de Lomas y Pedregal se encontraron dentro de los límites permisibles para PM_{10} .

Los riesgos en la salud por la inhalación de $\text{PM}_{2.5-10}$ se han asociado a exposiciones crónicas. Sin embargo, en estudios hechos por periodos cortos de contingencia se han observado procesos pro-inflamatorios. Contra las sustancias nocivas inhaladas, las primeras células de defensa que se activan son los macrófagos alveolares y las células epiteliales pulmonares las cuales inician una cascada pro-inflamatoria que se distribuye rápidamente por los leucocitos. Las respuestas hacia las $\text{PM}_{2.5-10}$ pueden ser medidas para analizar el cambio en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidante (Motta et al., 2012).

Debido al aumento de las enfermedades respiratorias y cardiovasculares vinculadas a la exposición por contaminantes atmosféricos como aeropartículas, se han generado biomarcadores para medir sus efectos en la salud. Por lo que el interés de la investigación reportada en esta tesis, es evaluar el efecto tóxico de la exposición de los MP de PM_{10} en el ADN y en el miR-21 de LPH, por su posible vinculación con el desarrollo de múltiples enfermedades como se mencionaran en este trabajo.

II. ANTECEDENTES

II.I. Biomarcadores

Los biomarcadores son mediciones en matrices y muestras de tejidos biológicos (pelo, orina, uñas, sangre, células epiteliales de descamación) de la respuesta a exposición a sustancias químicas poco frecuentes en la naturaleza, u originadas artificialmente por el ser humano, que son tóxicas para los seres vivos, mejor conocidas como xenobióticos. Las respuestas a los contaminantes pueden ser medidas a nivel bioquímico, molecular y celular. Se caracterizan por ser en su mayoría poco invasivos, específicos, sensibles y confiables. Son herramientas que deben ser evaluadas en una primera fase en estudios con cultivos celulares y en modelos animales, y en una segunda etapa se utilizan en poblaciones humanas expuestas a un agente tóxico (Zapata-Pérez, 2002). Se clasifican en:

- Biomarcadores de exposición. Puede ser un compuesto químico exógeno, los metabolitos generados por el compuesto o el producto de la interacción con una biomolécula. Indican la concentración del xenobiótico en un tejido u órgano.
- Biomarcadores de efecto. Son cambios bioquímicos como las alteraciones en las actividades enzimáticas, lesiones en el ADN o aductos de lípidos, proteínas y ADN. Pueden ser de efecto temprano ya que indican el desarrollo a ciertas enfermedades. Ejemplos de este tipo de biomarcador son el análisis de aberraciones cromosómicas (AC) (translocaciones, deleciones), intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y micronúcleos (MN). Cuando se ha iniciado una

enfermedad, se pueden aplicar los biomarcadores de efecto temprano y tardío como la evaluación de la expresión de microRNAs.

- Biomarcadores de susceptibilidad. Indican la susceptibilidad individual hacia un xenobiótico. Por ejemplo, los polimorfismos génicos como el que puede darse en el receptor a la interleucina 4, en la actividad de las enzimas de la fase II en el metabolismo de xenobióticos como el de las Glutación S-Transferasas o la eficiencia de reparación del ADN (Muñoz y Albores, 2011).

Existe gran diversidad de biomarcadores para evaluar el efecto tóxico de los metales, algunos ejemplos de trabajos actuales se muestran en la Tabla I.

Uno de los biomarcadores que evalúan el estrés oxidante en el ADN es la detección de los niveles del aducto 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) por ELISA o HPLC con detección electroquímica. Con este biomarcador, se confirma que las EROs generadas por un xenobiótico han lesionado al ADN. El radical OH⁻ es muy reactivo y se puede unir a cualquier base. Sin embargo, la base más oxidada por tener la mayor afinidad electrónica es la guanina. El aducto 8-OHdG se forma al unirse el OH⁻ al 2'-desoxiguanosina con la eliminación de un electrón. La unión de este radical al carbono 8 de la guanina puede provocar transversiones G-A, o T-A debido a la alteración de la complementariedad en la estructura del genoma, por lo que durante el proceso de transcripción la ADN polimerasa “lee” una guanina como si hubiera una adenina (A) por lo que agrega una timina (T) (Rodríguez-Romero et al., 2012).

Tabla I. Evaluación de toxicidad de Metales Pesados con diversos biomarcadores^a.

ESTUDIOS IN VITRO	TIPO DE CELULA	RESULTADOS	REFERENCIAS
MN e ICH	Cultivo de LPH	Aumento significativo en la producción de malondialdehído, en MN e ICH inducidos por As ₂ O ₃ (3 y 5 ppm), CdCl ₂ (3 y 5 ppm), HgCl ₂ (6 y 9 ppm) y PbCl ₂ (3 y 5 ppm).	Turkeza et al., 2012.
MN	Cultivo de LPH	Incremento significativo en MN en linfocitos expuestos <i>in vitro</i> a CdCl ₂ (10 ⁻⁶ -10 ⁻³ M) y HgCl ₂ (10 ⁻³ -10 ⁻¹ M) y muerte celular con 10 ⁻⁴ M de los mismos compuestos.	Bérceles et al., 1993.
MODELOS EN ANIMALES	TIPO DE CÉLULA	RESULTADOS	REFERENCIAS
MN, ensayo cometa, 4-hidroxinonenal	Leucocitos de Ratones CD-1	Ascenso significativo en fragmentación del ADN y MN en machos con V ₂ O ₅ 0.02 M por 1 hora dos veces a la semana. Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las células de hepatocitos.	Fortoul et al., 2011.
Ensayo 6-Thioguanina (6-TG) para mutaciones puntuales (MP) y Spi- para deleciones	Ratas Delta transgénicas F344gtp	Diferencias significativas después de 3 meses de tratamiento (7 y 14 mg/kg de Ni ₃ S ₂) en MF y lesiones pulmonares.	Kamigaito et al., 2012.
POBLACIONES EXPUESTAS	TIPO DE CÉLULA	RESULTADOS	REFERENCIAS
MN y ensayo cometa	Células del epitelio de la mucosa bucal	Incremento significativo en MN y la longitud de la cauda en el personal expuesto a Cr (VI).	Shuda et al., 2011.
AC	Cultivo de linfocitos periféricos humanos	Inducción significativa de brechas ("gaps"), rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN en trabajadores expuestos a disolventes y a Cr.	Monteiro et al., 2010.

II.II. El ensayo cometa como un biomarcador de efecto

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina ($\text{pH} > 13$) es una herramienta para medir daño en el ADN, aplicado en estudios *in vitro* e *in vivo* en diversas áreas de biomonitorio humano, ecotoxicología y epidemiología, el cual permite en poco tiempo, de manera sencilla, fácil y muy sensible, detectar rompimientos de una o doble cadena del ADN, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos proteína-ADN, eventos de reparación por escisión incompleta y apoptosis en células individuales (Moller, 2005)

A partir de la estandarización por Singh y colaboradores en 1988 (electroforesis a $\text{pH} > 13$ y lisis $\text{pH} = 10$), este método se ha ido complementando con la introducción de enzimas de digestión (endonucleasas/glicosilasas) para detectar lesiones específicas o con la aplicación de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), con el cual se pueden evaluar los entrecruzamientos o el daño en un gen específico (Collins, 2004).

El ensayo cometa es considerado como un biomarcador de exposición ya que permite medir cualitativa y cuantitativamente el daño en el ADN inducido por un xenobiótico. Mediante el microscopio de fluorescencia y la adaptación del programa como el Comet IV, se pueden visualizar y medir variables continuas como el porcentaje de ADN en la cauda (intensidad) o la longitud de la cauda. El producto de la multiplicación de estas dos variables proporciona el momento de la cauda (Collins, 2004).

Los extremos rotos del ADN que tienen carga negativa migran en el momento de la electroforesis hacia el ánodo, formándose la cauda. La forma de ésta dependerá del tamaño y el número de extremos rotos que contenga la célula. Cuando la cantidad de

rompimientos es elevada, los fragmentos migran libremente e incluso llegan a separarse completamente del núcleo, por lo que se espera que a concentraciones mayores del xenobiótico, se observen caudas más largas. La intensidad de la fluorescencia en la cauda proporciona un número relativo de cadenas rotas. Además, se puede medir la frecuencia de núcleos con cometa, la cual generalmente es una relación lineal de dosis-efecto (Fairbairn et al., 1995; Calderón-Segura et al., 2007) (Figura 1).

Las células humanas más estudiadas para mostrar el daño en el ADN por ensayo cometa son los linfocitos, debido a que es fácil detectarlo en éstos, se obtienen de forma poco invasiva y por su relevancia biológica al participar en la respuesta inmunológica hacia los agentes exógenos (Calderón-Segura et al., 2007; Carreras et al., 2013).

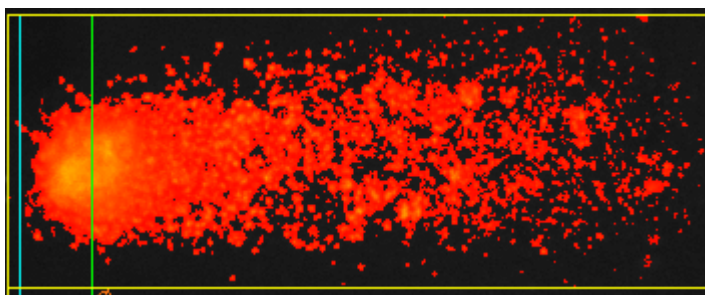


Figura 1. Imagen de un cometa de un linfocito de sangre periférica expuesto *in vitro* metales pesados- PM_{10} de Ecatepec, Estado de México.

II.III. Los micro-RNAs como marcadores moleculares epigenéticos de contaminación ambiental

La expresión de genes no sólo está determinada por el orden y composición de las secuencias del ADN, sino también por los cambios en la metilación del ADN y las modificaciones pos-traduccionales de las histonas que inducen o suprimen su expresión.

La exposición a contaminantes incluso a los agentes químicos que no han sido considerados genotóxicos pueden inducir cambios en los patrones de metilación del ADN (Arita y Costa, 2009; Jardim, 2011). Los MP provocan cambios en la expresión de genes sin afectar las secuencias. El arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobalto, así como el níquel y sus derivados, han sido reconocidos como agentes carcinogénicos. Su habilidad radica principalmente en inhibir la reparación del ADN y en activar la sobre-expresión de genes o su “apagado” (Beyersmann, 2002).

Varios trabajos han demostrado que los contaminantes atmosféricos como la materia particulada producen mutaciones que se han relacionado con el desarrollo de enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Los factores ambientales como la contaminación provocan cambios epigenéticos que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer (Lu et al., 2009; Lema y Cunningham, 2010; Wang et al., 2013).

Uno de los mecanismos de regulación epigenética descrito recientemente, es el que realizan los microRNAs. En el año del 2001 se aceptó el concepto de miRNA y se estableció la nomenclatura sistemática para designar a moléculas de cadena sencilla de ácido Ribonucleico (ARN) no codificante de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos de longitud en su forma madura, los cuales regulan de manera negativa la expresión de los RNAm induciendo su degradación o inhibición de su traducción (Nath, 2013). Se estima que más de 1000 miRNAs existen en el ser humano y que el 30% de los RNAm son un blanco para los miRNAs, por lo que regulan la expresión de múltiples genes como los

factores de transcripción, proteínas de organelos celulares, modificadores de la cromatina, receptores y ligandos, entre otros (Tsuchiya et al., 2006).

Los miRNAs son codificados por ADN y son transcritos por la RNA polimerasa II. En el núcleo, el transcripto primario (pri-miRNA) de 1000 bases es anclado por la enzima Drosha y genera el pre-miRNA formado por 70 nucleótidos, el cual es exportado al citosol por la enzima Exportina 5. Una vez en el citoplasma, la RNasa III Dicer rompe el pre-miRNA en 22 nucleótidos y genera la forma madura que es un dúplex de RNAm. Una de las cadenas, se une a un complejo de silenciamiento (RISC) en el extremo 3' (UTR) del RNAm, mediante complementariedad de bases y suprime la traducción de éste. La otra cadena llamada miRNA “pasajero” se degrada la mayoría de las veces, aunque se cree que también puede participar en la regulación de la transcripción y de la traducción (Tétrault y De Guire, 2013) (Figura 2).

Los microRNAs tienen un papel importante en procesos como el desarrollo celular, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. Los cambios en la expresión de los microRNAs son inmediatos, acumulables, reversibles y sólo si el agente ambiental es de exposición crónica se provoca expresión permanente (Jardim, 2011). Entre los 1400 miRNAs que se han detectado, el miRNA-21 es uno de los conocidos como onco-miR, debido a que se ha encontrado sobre-expresado en tumores sólidos de pulmón, mama, estómago, próstata, colon, cerebro, cuello, esófago y páncreas (Salnikow y Zhitkovich, 2008; Lu et al., 2009).

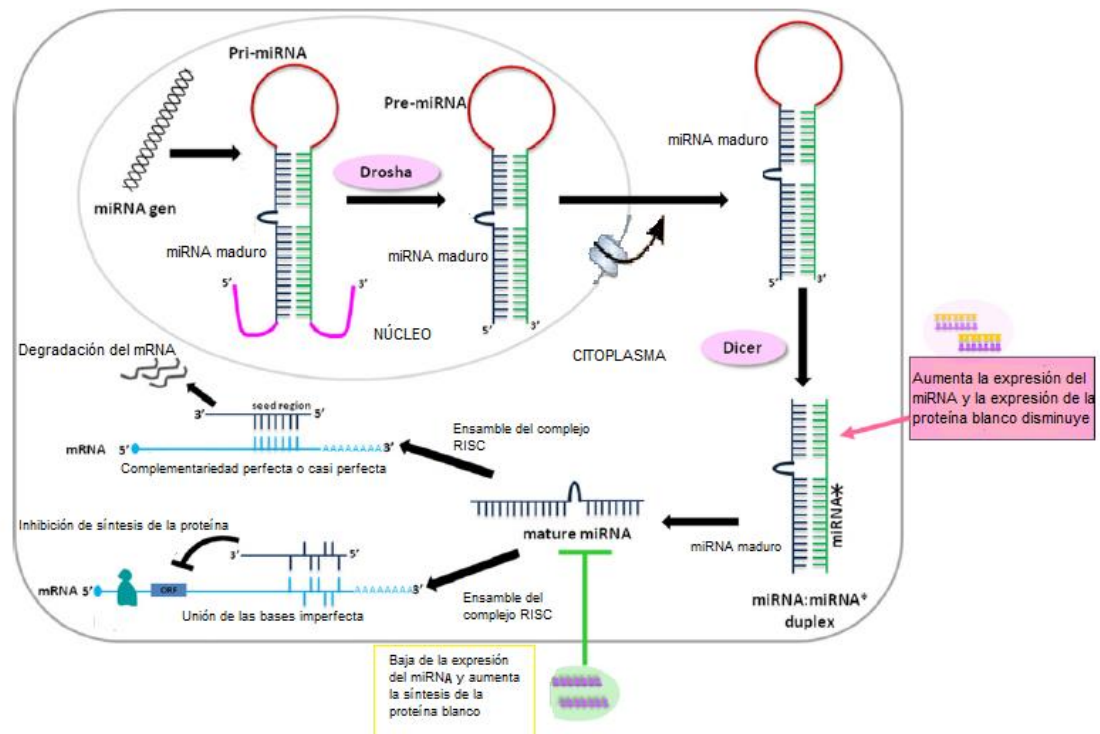


Figura 2. Biogénesis de microRNAs (Hou et al., 2012).

El miR-21 se ha relacionado con reducción de estrés oxidante, evita la inducción de apoptosis y participa en la modulación de las respuestas inflamatorias (Chan et al., 2005; Cheng et al., 2009; Lu et al., 2009). Este microRNA se encuentra en la región intrónica del gen TMEM49 que se localiza en el cromosoma 17q23-A y cuenta con su propia región promotora (Figura 3), es un gen único y no tiene alelos ni variantes de secuencia (Kumarswamy et al., 2011).

A fin de entender su mecanismo de acción en el control del crecimiento celular y la supresión de tumores, el estudio de este miRNA se ha enfocado en evaluar los efectos de su sobre-expresión en algunos de sus genes blanco como la tropomiosina I (TPM-I), el gen pro-apotótico p53 y la proteína de muerte celular programada 4 (PDCD 4) (Lu et al.,

2008; Mathé et al., 2012). En modelos con roedores y con células humanas, la sobre-expresión de este miRNA se ha relacionado con el desarrollo de tumores, por lo que tiene un papel esencial desde el inicio, el progreso, hasta la metástasis en algunos tumores (Kumarswamy et al., 2011). Una de las causas de esta relación, es que su gen se encuentra en una región frágil (FRA17B) del cromosoma 17, la cual queda más expuesta a rompimientos y otras mutaciones (Figura 3). En estudios recientes sobre enfermedades cardíacas y pulmonares también se ha encontrado modificación en la expresión de este miRNA (Kumarswamy et al., 2011).

Durante la respuesta inmune, se ha visto que la expresión del miR-21 es distinta. La sobre-expresión de este microRNA se da principalmente con las células efectoras T activas, seguidas de las células de memoria y su expresión disminuye cuando predominan las células T nativas (Kumarswamy et al., 2011).

La reparación del daño al ADN es un proceso que está regulado epigenéticamente, durante la reparación la cromatina se reacomoda para permitir que las enzimas lleguen a las zonas dañadas mediante modificación de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación) y/o por el desplazamiento de éstas o de nucleosomas enteros. El grado y tipo de daño en el ADN parece activar ciertos miRNAs. El miR-21 tiene genes blancos como el gen hMSH2, el cual participa en la reparación de las bases del ADN. Cuando el miR-21 está sobre-expresado, el factor TGF- β no activa la zona promotora del hMSH2 por lo que reduce la expresión de esta enzima de reparación (Yu et al., 2010; Wan et al., 2011).

Debido a su importancia en procesos proinflamatorios y la relación que se ha encontrado con el cáncer, el miR-21 se ha propuesto como un biomarcador epigenético para evaluar el oncofenotipo en muestras de sangre, mucosa de las vías respiratorias, en fluido cerebroespinal y en heces fecales (Kumarswamy et al., 2011).

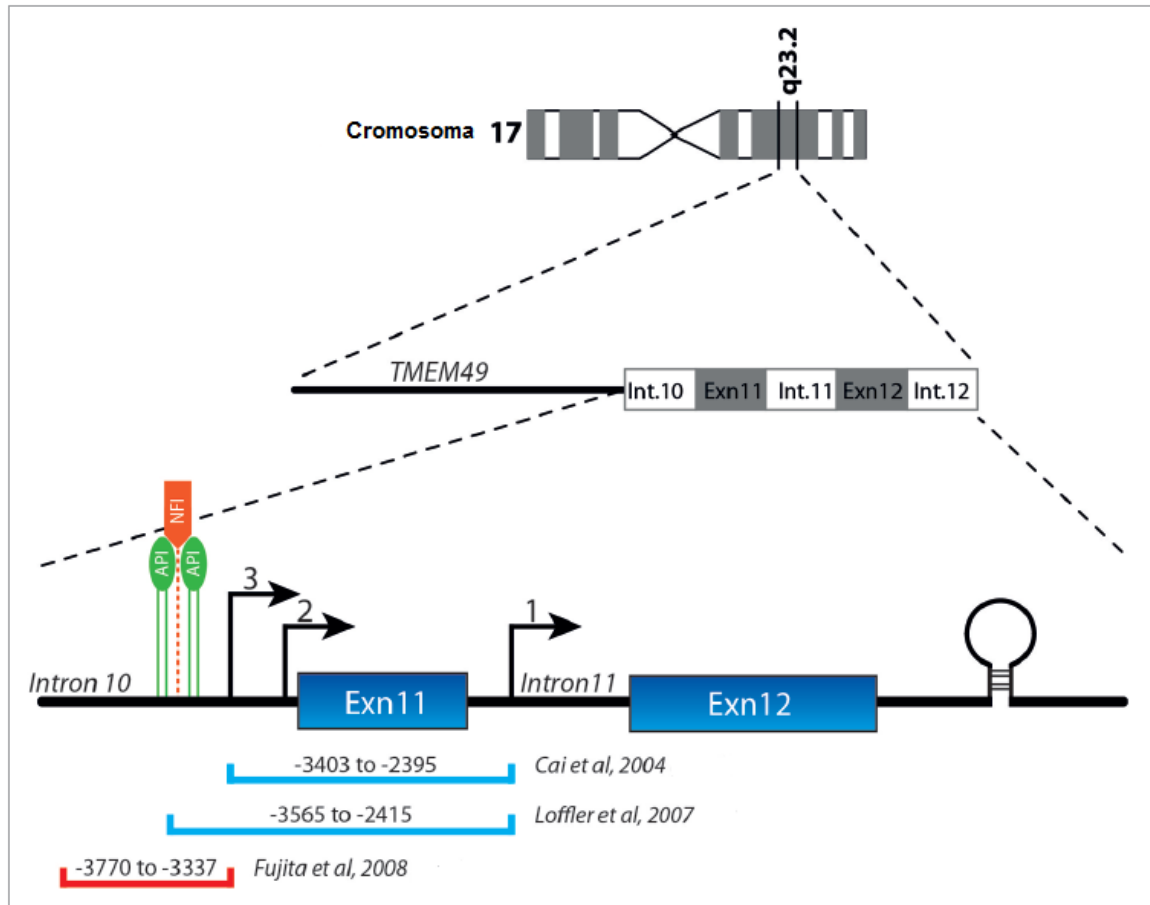


Figura 3. Ubicación del miR-21 en el cromosoma humano 17 (Kumarswamy et al., 2011).

II.IV. Genotoxicidad por MP

Trabajos actuales han evaluado la toxicidad de los metales pesados en distintas células humanas, en los que se ha evidenciado que la exposición a estos xenobióticos provoca fragmentación del ADN, aberraciones cromosómicas y apoptosis (Tabla II).

Tablall. Estudios genotóxicos *in vitro* e *in vivo* con metales pesados.

	CADMIO	CROMO	MANGANESO	NÍQUEL	PLOMO
TIPO DE CÉLULA	Linfocitos periféricos humanos	Células A549, epitelio alveolar y BEAS-2B epitelio bronquial humanas	Linfocitos humanos	Células NRK de riñón de rata	Linfocitos periféricos humanos exposición ambiental
CONCENTRACIONES TÓXICAS	10^{-4} , 10^{-3} y 5×10^{-3} mol/L	0.5, 1 y 10 Mm	25 μ M	500 Mm	
TIEMPO DE EXPOSICIÓN	3 horas	0.5, 1 y 4 horas	3 horas	72 horas	
	CdCl ₂	Na ₂ CrO ₄	MnCl ₂	NiCl ₂	
Daño al ADN (Ensayo cometa)	+	+	+	+	+ Cuando los niveles de Zn eran bajos y los de Pb altos.
VIABILIDAD CELULAR		reducción del 53.9 % y 43.4% con A 10 Mm		Disminuyó al 25 %	
APOPTOSIS		+ A 10 μ M activación de caspasa 3		+ Disminución de la fase S	
MICRONÚCLEOS	+ a 5×10^{-3} mol/L				
ABERRACIONES CROMOSÓMICAS	+ Aumento de fragmentos acéntricos		+ gaps cromatídicos y rompimientos de cromatídicos		
INFORMACIÓN SOBRE TOXICIDAD	Los cromosomas 1 y 16 al ser ricos en AT son más susceptibles al daño ocasionado por el Cd (Tinción de DAPI).	La oxidación de las bases comenzó en bajas concentraciones, se propone que uno de los primeros mecanismos de toxicidad del Cr es el estrés oxidante	El Mn parece bloquear la síntesis y reparación del ADN.	Vía estrés oxidante Haber-Weiss.	Inhíbe la reparación del ADN y desplaza el Zinc en las proteínas.
AUTORES	Rozgaj et al., 2002.	Cavallo et al., 2009.	Lima et al., 2008.	Chen et al., 2010.	Wu et al., 2009.

Tabla II. (Continuación).

	VANADIO	ALUMINIO	COBALTO	COBRE	HIERRO
TIPO DE CÉLULA	Linfocitos periféricos	Linfocitos periféricos humanos	Células de hepatocarcinoma (HepG2)	Linfocitos periféricos humanos	Leucocitos
CONCENTRACIONES TÓXICAS	8 µg/mL.	10 y 25 µg/mL	5, 10, 15 y 25 µg/mL	200 y 400 µM	250-1000 µM
TIEMPO	4 h	72 h	24 Y 48 h	1 h	30 min
MODO DE EXPOSICIÓN	V ₂ O ₃ , V ₂ O ₄ , V ₂ O ₅ ,	AlCl ₃	Nanopartículas de Co ₃ O ₄	Ácido cafeínico	FeSO ₄
Daño al ADN (Ensayo cometa)	+	+	+	Sin neucoproina + Con neucoproina disminuyó el daño	+ Después de 1 hora, el 60% del daño fue reparado.
VIABILIDAD CELULAR	Se mantuvo por arriba del 88%				Se mantuvo por arriba del 88%
APOPTOSIS		+	+ La actividad de la caspasa 3 dependiente de la concentración		
MICRONÚCLEOS		+			
INFORMACIÓN SOBRE TOXICIDAD	La reparación del daño al genoma por el vanadio tetraóxido llevó más tiempo (120 min) que el daño ocasionado por V(III) y V (V) (90 min).	Inhibición de Poli (ADP-Ribosa) polimerasa (proteínas con dedos de Zn) y de la expresión del gen ligasa durante la reparación de bases (BER).	Disminuye la función de la mitocondria y aumentó la liberación de LDH y la producción de EROs.	El Cu es el metal más abundante en el núcleo, en el suero y en tejidos. La movilización del Cu endógeno, puede provocar fragmentación del ADN y desencadenar la apoptosis.	Causa rompimientos del ADN mediante el estrés oxidante al interactuar con el peróxido de hidrógeno.
AUTORES	Rodriguez-Mercado et al., 2011.	Lankoff et al., 2006.	Alarifi et al., 2013	Bhat et al., 2007.	Park y Park, 2011.

II.V. Estudios epigenéticos de MP

La evaluación sobre los cambios en la expresión de los miRNAs por exposición a MP, es una línea de investigación reciente, en la que predominan principalmente los trabajos con plantas (Huang et al., 2009; Shukla et al., 2009; Gielen et al., 2012).

En investigaciones *in vitro* con líneas celulares HELF expuestas a Arsenita (As^{3+}), se observa activación de rutas de señalización de cinasas JNK/c-Jun y ERK/NF- κ B con sobre-expresión del miR-21 y disminución de la expresión de genes SPRY1, PTEN y PDCD4 (Ling et al., 2012; Shen et al., 2013) que regulan la apoptosis. Además, se demostró que el As^{3+} altera la expresión de genes supresores de tumores al fosforilar la subunidad catalítica EZH2, activando las rutas de señalización de JNK y STAT3 a Akt (Chen et al., 2013).

En investigaciones con aplicación del trióxido de arsénico contra la leucemia, al transfectar un antimir-21 en líneas celulares HL60 y K562, se reporta incremento en la susceptibilidad al trióxido de Arsénico y la sobre-expresión el gen supresor tumoral PDCD4 que provoca apoptosis y arresto celular (Gu et al., 2011). También se ha visto que al aumentar la expresión de los microRNAs miR-15a/16-1 ocurre actividad sinérgica con el trióxido de arsénico para provocar la apoptosis (Gao et al., 2010).

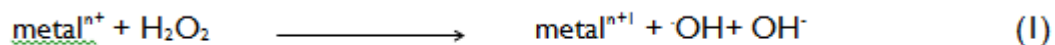
En estudios para entender los mecanismos de enfermedades como el Alzheimer, se encontró que la generación de EROs provocada por sulfatos de magnesio, hierro y aluminio en cultivo de neuronas primarias de humano induce la sobre-expresión de los miRNAs miR-9, miR-125b y miR-128 y activan genes pro-inflamatorios y pro-apoptóticos como NF κ B, interleucina β 1 y precursores de la proteína β -amiloidey la ciclooxigenasa-2 (Lukiw y Pogue, 2007).

Cabe resaltar que los trabajos con biomarcadores epigenéticos en animales de laboratorio (Wang et al., 2013), y en poblaciones humanas expuestas a MP son escasos (Bollati et al., 2010; Kong et al., 2012). Las modificaciones en la expresión de los miRNAs

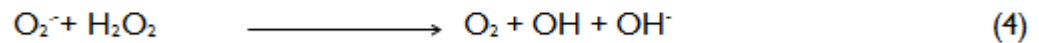
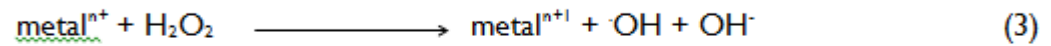
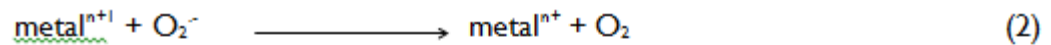
como el miR-21, miR-146 y miR-222 se han observado con exposición a materia particulada. Estos cambios están relacionados con estrés oxidante y con la regulación de los procesos inflamatorios. Debido a que un microRNA puede modular la expresión de cientos de RNAm de distintas rutas metabólicas, su alteración por agentes exógenos como las PM₁₀ ricas en metales se ha asociado con el desarrollo de enfermedades que van desde inflamación de las vías respiratorias y problemas cardiovasculares, hasta cáncer (Bollati et al., 2010).

II.VI. Toxicidad de los MP y su relación con estrés oxidante

Diversos estudios, *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las PM₁₀ y PM_{2.5} provocan diversos efectos adversos a la salud. El potencial oxidante de las partículas suspendidas generalmente se atribuye a su asociación con metales de transición como el Fe (II), los cuales inducen directamente la formación de EROs principalmente del anión superóxido (O₂⁻) y el radical (·OH) por reacciones de Fenton (I).



Los metales como el Cr (III, IV, V, VI), V (IV), y el Co (I, II) también generaran radicales OH[·], o indirectamente como productos de la fagocitosis de estos elementos por medio de la reacción de Haber-Weiss (2, 3, 4).



*La reacción (4) es muy lenta, sin embargo en presencia de un metal se cataliza más rápido (Jeong-Chae et al, 2012).

Además de generar estrés oxidante, los metales se unen a proteínas modificando su estructura y función o reemplazando elementos esenciales como el magnesio, hierro y calcio (Ballatori, 2002; Mena et al., 2008). A pesar de contar con mecanismos de protección y reparación antioxidante como la acción de las enzimas superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), junto con las metalotioneinas y las proteínas de choque térmico, quelan a los metales como el hierro, cobre, cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel y vanadio, no se puede evitar el estrés oxidante en las células y la peroxidación de lípidos, el daño al genoma, alteraciones de grupos sulfhidrilo (SH-) y el rompimiento de la homeostasis del calcio. El daño que ocasionan en el organismo depende de la solubilidad, absorción, tipo de transporte, de su reactividad química y de los compuestos que formen dentro de la célula (Fig. 4 y 5).

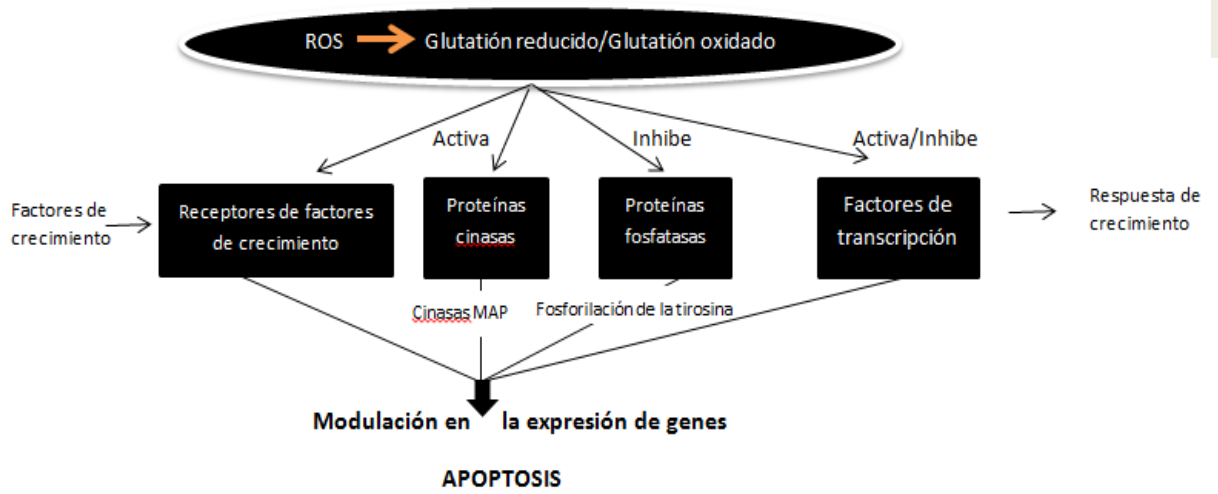


Figura 4. Vías de señalización molecular de las EROs (Kehrer, 2000).

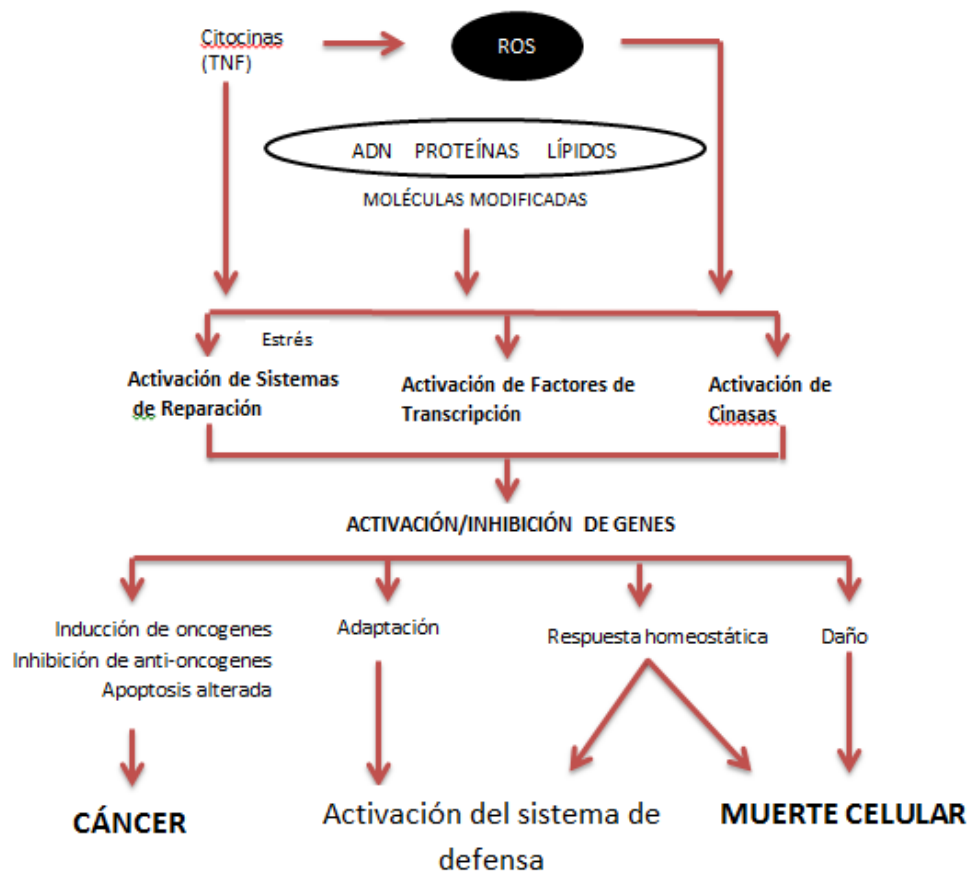


Figura 5. Mecanismos de toxicidad de los MP (Vías de señalización molecular de las EROs (Kehrer, 2000).

II.VI.I. Aluminio (Al)

Es un metal abundante en la corteza terrestre. Se ocupa para el procesamiento de la comida, en algunas medicinas como los antiácidos y para purificar el agua. Las dos vías por las cuales el aluminio puede entrar al cuerpo son a través de los tractos gastrointestinal y respiratorio. Diversos estudios han relacionado al aluminio con problemas neurodegenerativos (Flaten, 2001; Jyoti y Sharma, 2006), daño en huesos y riñones. Éste metal puede competir por los sitios de unión del calcio y romper la homeostasis celular; incrementa la producción de EROs al potenciar la actividad del hierro e interferir con el funcionamiento de la mitocondria, afectando la producción de ATP (Wu et al., 2012; Kumar et al., 2009). Puede inhibir la reparación del ADN y alterar su estructura (Lankoff et al., 2006), también modifica las rutas de señalización NF-kB, p53, JNK para inducir apoptosis, entre otros procesos. Existen evidencias de que puede incrementar la frecuencia de micronúcleos e inducir apoptosis en cultivos de linfocitos (Banasik et al., 2005). Se ha evidenciado, inducción de daño el ADN en LHP de personas expuestas a este metal con disminución de la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo y a exposiciones elevadas de polvo de aluminio provoca déficit cognitivo (Mundy et al., 1997; Celik et al., 2012).

Compite con iones divalentes catiónicos por sus sitios de unión. En enfermedades neurológicas, se une a los sitios de unión del Ca^{2+} en la membrana, interfiere en su difusión en el citosol ocasionando degeneración de la célula (Mundy et al., 1997). Debido a que el Ca^{2+} es un segundo mensajero, los cambios en las concentraciones de éste catión repercuten en las proteínas de unión al Ca^{2+} como en las calmodulinas (CaM) y en las

proteínas cinasas dependientes del Ca^{2+} (CDPKs). La activación de proteínas, provoca la fosforilación de la NADPH oxidasa con inducción de apoptosis (Mundy et al., 1997).

En plantas expuestas al aluminio, se ha visto que éste se acumula en el núcleo, se puede unir al ADN, provoca despolarización de los microtúbulos, inhibe la mitosis, se disminuye el crecimiento de la raíz, hay daño en el ADN y apoptosis. La enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), se activa con el estrés oxidante y el aumento del Ca^{2+} generado por el aluminio, la cual es una enzima clave para regular la apoptosis y reparación del ADN. Tanto en células animales como en las vegetales el mantenimiento de la homeostasis de las EROs y del Ca^{2+} es importante para la integridad del genoma. Tiene una vida media de 15 a 20 años y está relacionado con el cáncer pulmonar (Achary et al., 2013).

II.VI.II. Cadmio (Cd)

Es un metal pesado tóxico distribuido ampliamente en suelo, agua y aire. Las principales fuentes que lo emiten son el humo de cigarro y las actividades industriales. Tiene una vida media de 20 a 35 años y está relacionado con enfermedades como el cáncer, diabetes, artritis, problemas cardiovasculares, entre otras, principalmente por su habilidad para desplazar al zinc. Debido a que el ser humano no cuenta con una ruta para excretar este metal, se acumula principalmente en pulmones, hígado, páncreas, próstata y riñones (Lee et al., 2012). A pesar de ser un potente carcinógeno en estos órganos, el daño directo al ADN ocasionado por este metal es poco, aun cuando se ha visto que

puede unirse a los átomos de residuos de guanina del ADN y desestabilizarlo (Lee et al., 2012).

Aunque no produce radicales libres de forma directa, puede desplazar al hierro y al cobre de sus sitios unión, lo que hace que éstos metales aumenten el estrés oxidante mediante la reacción de Fenton. En macrófagos alveolares pulmonares puede inhibir la respiración mitocondrial y en plantas, inhibe la actividad de los fotosistemas, la fosforilación y el transporte de electrones, ocasionando la apoptosis (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1994).

En células de ovario (CHO) de criceto dorado expuestas a cadmio y a plomo, el cadmio fue dos veces más tóxico que el plomo produciendo orificios en la membrana nuclear en la fase S mientras que el plomo provocó expulsión de la cromatina e incremento de MN (Banfalvi et al., 2012).

La toxicidad del cadmio radica principalmente en que puede unirse a distintos sitios de las enzimas, cambiando su conformación e interrumpiendo su actividad por remplazar al zinc como en la SOD o en las enzimas de reparación XPA y PARP, que reparan los rompimientos de cadena sencilla y la escisión de bases. La polinucleótido cinasa es otra enzima inhibida por el cadmio y el cobre tanto en su actividad tanto cinasa como fosfatasa (Whiteside et al., 2010). En células de mamífero, el cadmio inhibe la remoción de las bases oxidadas, por interferir con la actividad de la enzima 8-oxoguanina DNA glicosilasa (OGG1). Dicha enzima repara el ADN dañado a nivel de los residuos 8-oxoG, cortando los residuos 8-dihidro-8-oxoguanina y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-N- metilforamidapirimidina

(FAPY). Además, detiene la actividad de la β -lialasa, de dos maneras, ocupando el sitio de un metal cofactor de la enzima o uniéndose a un aminoácido importante (cisteína o histidina) que funcione como ligando entre ADN y la OGGI (Zharkov y Rosenquist, 2002). Consecuentemente, aumenta las mutaciones del ADN asociadas con la sobre-expresión de la metiltransferasa y la reducción en la expresión de genes supresores de tumores como el RASSF1A y *p16*, tales desequilibrios pueden estar vinculados al desarrollo del cáncer (Arita y Costa, 2009).

II.VI.III. Cobalto (Co)

Es un elemento esencial para el ser humano. La vitamina B₁₂ tiene 4 % de este metal. Es común encontrarlo en la naturaleza de distintas formas químicas como sales orgánicas e inorgánicas. Es generado principalmente por actividades industriales como la refinación del petróleo, la producción de carburo de tungsteno conocido como el “metal duro”, en aleaciones y en pinturas. La exposición a este metal es por adherencia a la epidermis o por inhalación del polvo o humo industrial, los cuales pueden generar enfermedades como neumonía, fibrosis y asma (Alarifi et al., 2013). Aunque los órganos blancos de este metal son las vías respiratorias, también ocasiona trombosis vascular periférica, atrofia al nervio óptico y puede afectar al hígado por inhibir la producción del grupo hemo y los citocromos P450 (Jomova y Valko, 2011).

Su toxicidad radica en que puede mimetizarse con otros iones como el Mg²⁺ y el Ca²⁺, por lo que su entrada a la célula es fácil (Lloyd y Phillips, 1999). Por tener afinidad con los grupos SH- en los residuos de cisteína, produce radicales con centros SH- vía

reacción de Fenton y aumenta los niveles de las EROs, los cuales a su vez disminuyen los antioxidantes endógenos como el glutatión (GSH), oxidan a lípidos de membrana, inducen aumento de ICH, entrecruzamiento de ADN-proteínas, escisión de bases e interfiere en el proceso de reparación del ADN dañado. El Co (II) más peróxido de hidrógeno induce oxidación en todas las bases, siendo la guanina la de mayor reactividad seguida de la timina, citosina y con menor efecto con la adenina (Lloyd y Phillips, 1999).

Como respuesta al desequilibrio de los niveles de EROs/antioxidantes, se activan las caspasas señalizando dos eventos, la reparación del daño o la apoptosis (Alarifi et al., 2013). Sin embargo, se ha observado que el suministro de cobalto a ratas en condiciones de hipoxia y ayuno, disminuye la formación de radicales libres y EROs, evitando la oxidación de lípidos y de proteínas (Jomova y Valko, 2011).

II.VI.IV. Cromo (Cr)

Es un metal esencial en la dieta diaria, se requiere para potenciar el funcionamiento de la insulina y en el metabolismo de la glucosa. En la industria, se utiliza para la producción de llantas, cromatos y pinturas. La toxicidad de este metal está relacionada con su estado de oxidación, los más comunes son el +3 y el +6 (Zhitkovich et al., 1996). El cromo puede ser inhalado, absorbido o ingerido. El Cr (VI) es el más tóxico, considerado mutagénico y carcinogénico debido a que genera radicales OH^\cdot , O^{-2} y H_2O_2 mediante la reacción de Fenton y el ciclo Haber-Weiss (Figura 6). Sin embargo, para que se desarrolle cáncer de pulmón por este metal, se requieren exposiciones masivas a Cr (VI).

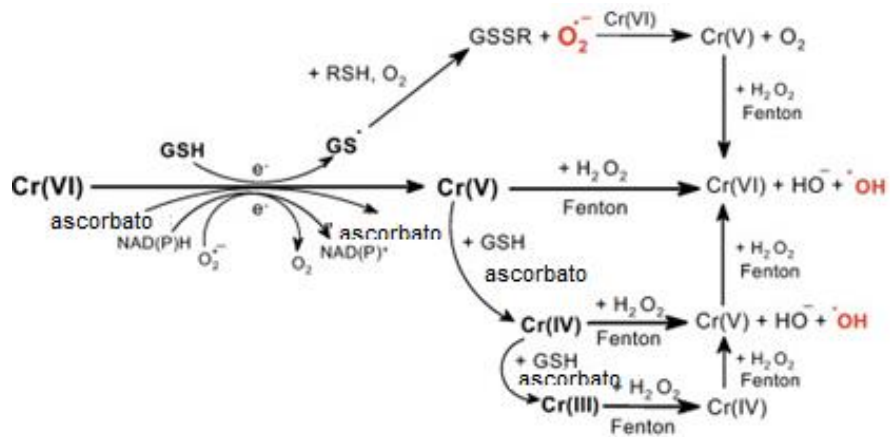


Figura 6. Producción de especies reactivas de oxígeno por reducción de cromo (Morse et al., 2013).

La configuración tetrahédrica del Cr (VI) facilita su entrada a la célula al ocupar los sitios de unión de los iones sulfato y fosfato en los canales de sulfato de membrana. Una vez que entra a la célula, el Cr (VI) se reduce a Cr (III), el cual reacciona con los grupos fosfato del ADN, formando aductos (Cr-ADN) y rompimientos de cadenas sencilla y doble (Salnikow y Zhitkovich, 2008) (Figura 7). Se ha observado que activa las rutas de señalización de las MAP cinasas, factores de NF- κ B, ATF-2 y p53 que participan en la regulación del proceso de la apoptosis.

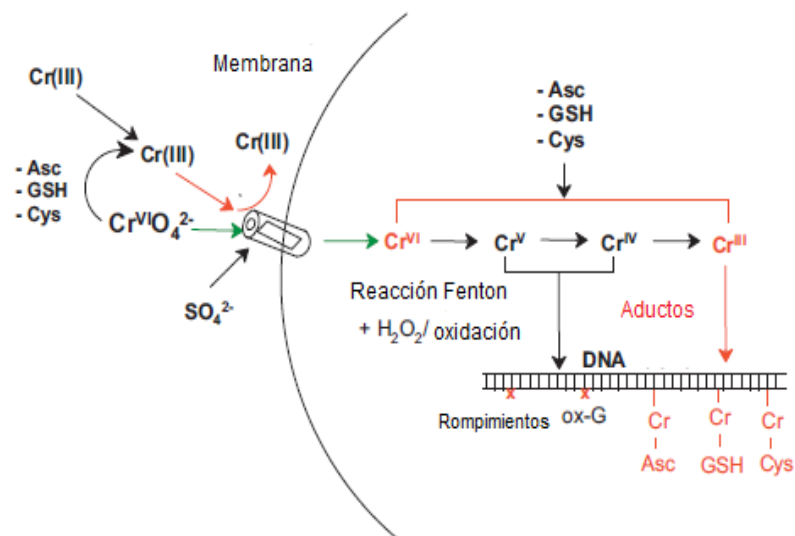


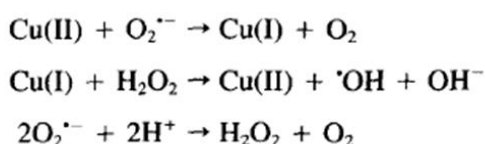
Figura 7. Formación de Aductos-ADN por cromo (Salnikow y Zhitkovich, 2008).

II.VI.V. Cobre (Cu)

Es un elemento traza abundante en las rocas y minerales, esencial para los organismos en muchas funciones como la respiración, el transporte del hierro, pigmentación, como neurotransmisor y está implicado en el crecimiento y desarrollo. El cobre es el principal ion metálico que se encuentra en el núcleo, suero y tejido (Whang et al., 2012). Es cofactor de muchas enzimas: citocromo oxidasa c, ascorbato oxidasa, dopamina β -hidroxilasa, lisil oxidasa, superóxido dismutasa y ceruloplasmina; involucradas en las reacciones de oxido-reducción muy importantes en el transporte de electrones (Jomova y Valko, 2011).

Sin embargo, al provenir de fuentes antropogénicas como fundidoras, refinerías, productos como plaguicidas (insecticidas, fungicidas, alguicidas), fertilizantes y por el desgaste de partes automóviles, los niveles elevados de exposición lo convierten en un metal muy tóxico para los organismos (Querol et al., 2008; Ogunbileje et al., 2013).

Cuando se encuentra en concentraciones elevadas, genera estrés oxidante de dos formas, por reacción de Fenton o por disminución de los niveles de glutatión, siendo éste metal más activo. El Cu (II) es el ion más oxidante. Sin embargo por sí sólo no puede fragmentar al ADN, requiere de la presencia de agentes reductores y/o H₂O₂ para producir radicales hidroxilo y aniones superóxido que provocan los rompimientos de cadena sencilla y doble, al mismo tiempo que oxida al ADN, lípidos, proteínas (Wang et al., 2012). El daño oxidante está relacionado con el desarrollo del cáncer y de tumores como de mama, colon, pulmón, hígado, vesícula y riñón (Whang et al., 2012).



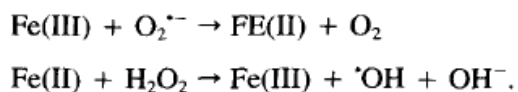
Se ha visto que puede inhibir las enzimas de reparación de cadena sencilla, debido a su afinidad por los grupos SH- de las proteínas o por modificar la estructura y función del sitio de unión de otro ion en la enzima (Letelier et al., 2005). También se ha comprobado que algunos componentes de la cascada de señalización de las MAPK se activan con este metal. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en su genotoxicidad, se ha comprobado que puede alterar los niveles de las proteínas de unión AP-1 y ARE (Jomova y Valko, 2011).

II.VI.VI. Hierro (Fe)

El hierro al igual que el cobre, es un metal esencial para los organismos, que participa en la diferenciación celular y en el desarrollo de animales, plantas y muchos

microorganismos. Es un componente esencial de muchas enzimas, por lo que su homeostasis debe ser regulada. Pero a elevadas concentraciones, los iones se vuelven tóxicos y están asociados al desarrollo de enfermedades coronarias e infartos de miocardio. Su exceso en el cerebro se ha relacionado con enfermedades como Parkinson, Alzheimer y Huntington. El desarrollo de éstas enfermedades puede estar vinculado al estrés oxidante y a la baja capacidad antioxidante, por lo que se vuelve este órgano más susceptible a la toxicidad del ion (Jomova y Valko, 2011).

Muchas proteínas, lípidos y el ADN son susceptibles al daño por el exceso de este metal, por su gran capacidad de generar radicales hidroxilo y aniones superóxido vía reacción de Fenton. Los radicales hidroxilo reaccionan con las purinas y pirimidinas o con la desoxirribosa, generando enlaces dobles por oxidar a las bases o por rompimientos del ADN. Aunado a esto, el exceso de hierro provoca la peroxidación de lípidos, produciendo el malondialdehído (MDA) que puede reaccionar y formar aductos con la guanina, la adenina y la citosina (Jomova y Valko, 2011).



El exceso de este metal desestabiliza al factor de transcripción NF_κB, que se encuentra en el citosol y está involucrado en la respuesta hacia patógenos y en la defensa antioxidante. La presencia excesiva del hierro en los macrófagos activa a las enzimas NAPH oxidasas que a su vez, disminuye la producción de especies NO necesarias para la respuesta inmunológica hacia patógenos (Crichton et al., 2002).

En ratas expuestas a partículas con Fe, la unión de NF κ B al ADN incrementa los niveles de la citosina proinflamatoria IL-1 β y estimula la producción de fibrógeno, lo cual puede ser un factor importante para el desarrollo de enfermedades cardiacas (Zhong et al., 2010).

II.VI.VII. Níquel (Ni)

Es utilizado ampliamente en la industria en forma insoluble como el óxido de níquel (NiO) y solubles como el acetato de níquel, sulfato de níquel (NiSO $_4$) y se origina por emisiones vehiculares. A pesar de ser un nutriente esencial para muchas plantas y animales, se ha demostrado que puede incrementar la producción de EROs y disminuir los niveles de glutatión. Asimismo, puede formar estructuras complejas con los péptidos y proteínas, y generar más estrés oxidante (Kim y Seo, 2011).

Entra al cuerpo por inhalación y ocasiona diversos efectos negativos en la salud desde leves irritaciones hasta bronquitis, fibrosis, asma y edema pulmonar. Debido a que el Ni (II) es similar al Fe(II), se ha sugerido que puede modificar el metabolismo del hierro e incluso remplazarlo por las hidrolasas o interferir en su consumo. También, puede agotar el ascorbato intracelular, ya sea por oxidación o inhibición de su ingestión, lo que repercute en la inactivación de las hidroxilasas y en la activación de genes inductores de hipoxia. La activación constante de la hipoxia puede alterar el metabolismo y el control de crecimiento y/o la resistencia a la apoptosis de células dañadas. Este desequilibrio puede desencadenar el proceso de carcinogénesis (Salnikow et al., 2000).

Asimismo, la presencia de este ion se ha relacionado con la inhibición en la reparación del ADN. Muchas enzimas de reparación tienen en su estructura dominios con residuos de cisteína e histidina que se pliegan alrededor de un ion de zinc, mejor conocidos como “Dedos de Zinc”. Algunos iones de Cd (II), Cu(II), Ni (II) y Co (II) presentan gran afinidad hacia estos dominios, que al unirse inactivan las enzimas de reparación (Hartwig y Schwerdtle, 2002). En células de pulmón en las que se induce la formación de aductos por benzo(a)pireno, se observó que se inhibe la eliminación de estos aductos por la presencia de compuestos de níquel (NiO y NiCl₂) (Salnikow y Zhitkovich, 2008).

El níquel puede ocasionar AC, ICH, entrecruzamientos ADN-proteína, rompimientos de cadena sencilla y la peroxidación de lípidos de membrana. El posible mecanismo por el cual este metal genera oxidación de las bases o de la desoxirribosa, es mediante el ciclo Haber-Weiss, por el cual se producen radicales hidroxilo. Conjuntamente, la oxidación del Ni²⁺ a Ni³⁺ causa radicales de oxígeno que pueden oxidar las bases o peroxidar lípidos (Chen et al., 2010).

Cuando hay daño al ADN por este metal, se activan los genes de las proteínas reguladoras del arresto celular y de las caspasas que señalizan la apoptosis. En este último proceso, parece que el níquel disminuye los niveles de Bcl2 y Bcl-xL e incrementa la expresión de Bad y Bax, los cuales provocan la permeabilidad de la membrana de la mitocondria (Chen et al., 2010).

II.VI.VIII. Plomo (Pb)

Es uno de los metales que tiene diversas aplicaciones en la industria por sus propiedades fisicoquímicas, además de formarse por el desgaste de partes de vehículos. Persiste en el agua, suelo o en el polvo por largos periodos. La mayor exposición a plomo se encuentra en partículas de 2 a 10 μm ya que no se degrada y se encuentra ampliamente distribuido. La ruta principal de entrada al cuerpo es por inhalación y en segundo lugar por consumo de agua (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1994). Cuando es inhalado puede llegar hasta los alveolos donde es absorbido por fagocitosis, mientras que al ser ingerido parece ser que se absorbe por difusión pasiva y activa los transportadores DMT1. Se distribuye principalmente en la sangre, hígado, riñones y en los huesos. En la sangre, la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ o más se considera tóxica, esta concentración desencadena problemas neurológicos, cognitivos, hipertensión y el desplazamiento del calcio de los huesos por la acumulación del plomo en ellos (Schnaas et al., 2004; Jomova y Valko, 2011).

La relación entre los problemas neurológicos y la exposición a este metal, parece ser que radica en la capacidad para inhibir al receptor N-metil-D-aspartato que se une a los sitios reguladores de Zn^{2+} y lo inactiva, el cual es importante para el aprendizaje y la memoria en el hipocampo (Neal y Guilarte, 2012).

Su toxicidad se da por: 1) estrés oxidante, al inducir la formación del oxígeno simple, peróxido de hidrógeno e hidroperóxido y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como el peroxil-nitrito (Lee et al., 2012); 2) disminución de los niveles de glutatión (por afinidad a los grupos sulfhidrilos), además de agotar a la superóxido dismutasa y a la

catalasa; 3) disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes, específicamente a la glutatión reductasa y a la deshidrogenasa del ácido delta-amino-levunílico. A bajas concentraciones puede inhibir algunas ATPasas; 4) inhibición de la absorción de minerales traza. La exposición a plomo puede alterar la composición de los lípidos de membrana y repercutir en su permeabilidad y función (Ercal et al., 2001).

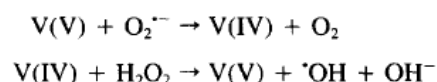
Produce apoptosis, proceso que se desencadena como respuesta al daño al ADN (como MN), al mal funcionamiento de la mitocondria o por desequilibrio entre los niveles de Bax/Bcl2 y a la activación de las caspasas (Banfalvi et al., 2012).

II.VI.IX. Vanadio (V)

El vanadio se genera por la quema de combustibles fósiles (petróleo crudo, combustóleo, carbón), liberándose a la atmósfera como óxidos de vanadio. Es un metal tóxico traza, no es un elemento esencial, ni tiene valor nutricional para el ser humano. Puede entrar al cuerpo principalmente por consumo de alimentos o agua contaminada o por inhalación. Este metal se acumula principalmente en pulmones, hígado, huesos y bazo (Fortoul et al., 2011; Salinas, 2012).

En estudios epidemiológicos, se ha correlacionado la incidencia de cáncer en los habitantes con exposición a partículas del aire con vanadio. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) considera al pentaóxido de vanadio como posible carcinógeno. A exposiciones crónicas se ha asociado con el desarrollado de neoplasmas en la zona bronquio-alveolar (NTP, 2002).

El vanadio y sus derivados (H_2VO_4^- , HVO_4^{2-} , VO_4^{3-}) entran fácilmente a la célula por los canales de fosfato y sulfato. En el espacio intracelular es fácil que ocurra el proceso de reducción del V(V) al V(IV) con formación del superóxido y el NADPH. Posteriormente, la interacción de V(IV) con el peróxido de hidrógeno produce radicales hidroxilo, los cuales se intercalan entre dos bases del surco menor o del surco mayor del ADN, interactuando con los hidrógenos del grupo metilo de la timina o entre los enlaces H-C de la desoxirribosa, dañando al ADN (Andrezálová et al., 2013).



Se ha reportado que cuando hay rompimientos de cadena sencilla, el vanadio provoca aneuploidias y sólo el tetraóxido de vanadio puede inducir rompimientos de cadena doble. También puede formar aductos, los cuales son más difíciles de reparar. No se sabe si puede interactuar directamente con el ADN. Sin embargo, Ouameur y colaboradores (2006) demostraron que el catión V(IV) VO^{2+} puede unirse al ADN en los grupos fosfato (PO_2) y en los átomos N-7 de la guanina y la adenina (Ouameur et al., 2006).

El efecto antiproliferativo que tiene el vanadio en las células, parece que se debe al estrés oxidante que inhibe a las ATPasas, fosfatasas y cinasas. El vanadio pentavalente es más tóxico para las células de mamífero y puede ser carcinógeno como el níquel. Su acción genotóxica se relaciona con la inhibición de la síntesis, de la reparación del ADN y del huso mitótico (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1994).

II.VI. X. Manganese (Mn)

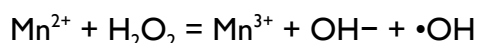
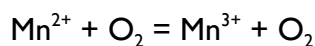
Después del hierro, el manganeso es el segundo metal más abundante en la naturaleza. Se encuentra ampliamente distribuido en rocas, suelo y agua. Se produce en la industria metalúrgica, en la elaboración de productos químicos, en descargas de aguas residuales municipales, en lodos de depuración de aleación, en la producción de acero, hierro, cerámica, en fungicidas y es un componente aditivo para vehículos, por lo que en lugares con mucho tránsito y en carreteras se genera mucho manganeso (Neal y Guilarte, 2012).

Es requerido por los organismos en cantidades mínimas para muchas enzimas oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, ligasas e isomerasas, para la reparación celular, en procesos de replicación y mineralización de los huesos (Pinsino et al., 2010). Sin embargo, puede convertirse en un ion metal tóxico a elevadas concentraciones y ocasionar problemas neurodegenerativos, pulmonares y reproductores (Marrehilados Santos et al., 2010).

Las rutas principales de entrada del manganeso al cuerpo son por consumir alimento y agua contaminada. Como el plomo, el manganeso al ser inhalado, se absorbe en los pulmones o puede llegar al bulbo olfatorio a través de la transferina y por transporte activo por DMTI, se almacena en las neuronas, en oligodendrocitos y astrocitos (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1994). Su neurotoxicidad está relacionada con su capacidad de inhibir a las ATPasas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. En trabajadores expuestos a este metal se eleva la incidencia de Parkinson o el desorden neurológico conocido como manganerismo, en el que se presentan temblores, dificultad para caminar, y espasmos en músculos

faciales. En niños se ha confirmado reducción de la capacidad cognitiva y cambios en el comportamiento por ingesta de agua con niveles elevados de manganeso (Neal y Guilarte, 2012).

Este catión entra fácilmente a las células por los canales de Ca^{2+} y aumenta la producción de las EROs que dañan principalmente a la guanina formando aductos (8-OHdG) o provocando rompimientos de cadena sencilla a nivel del C1 ó C4 de la ribosa (Singh et al., 2013).



Además del estrés oxidante, provoca incremento de MN y AC y daña el ADN mitocondrial. Como otros metales, se puede unir a proteínas o enzimas antioxidantes, con lo que disminuye su función y desencadena apoptosis y necrosis por no repararse el daño (Singh et al., 2013).

II.VII. Inhalación de MP

La entrada y deposición de las partículas atmosféricas en el tracto respiratorio está determinada por el tamaño, la forma, la densidad y la composición química. La mayoría de las partículas inhaladas con un diámetro aerodinámico mayor a 5 μm impactan en las superficies de la faringe y la traqueo-bronquial, mientras que las partículas nanométricas alcanzan el pulmón distal (bronquiolos y alveolos terminales). Las narinas al filtrar el aire inspirado pueden llevar sustancias tóxicas que ponen en riesgo a las placas nasales en las

que se puede desarrollar neoplasia (Smart y Hodgson, 2008). El aire inspirado entra a la nariz por cada fosa nasal, se entibia, humidifica y pasa a la faringe, a la tráquea y llega a los alvéolos, donde tiene lugar el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. Parte del aire inspirado pasa por el neuroepitelio olfativo, a la región inferior del hueso etmoidal donde se encuentran las neuronas receptoras olfatorias (ORNs), las células de sostén y las células de la mucosa. Las ORNs a través de un largo axón penetran a la cavidad craneal y se conectan a los glomérulos del bulbo olfatorio (Sunderman, 2001). A pesar de que las células de la mucosa fungen como barrera física y química, algunos xenobióticos, tales como los MP pasan por el axón de las ORNs hacia el bulbo olfatorio. Aunque dicho mecanismo aún no se conoce muy bien, se ha evidenciado *in vitro*, que la carnosina se une a metales como el Ni(II), Cd(II), Zn(II) y Cu(II) y podría ser el transportador del epitelio nasal al bulbo olfatorio (Sunderman, 2001).

Personas laboralmente expuestas a compuestos de níquel y cadmio han presentado reducción parcial de la capacidad para percibir olores (hiposmia) y pérdida total del olfato (anosmia). Existen casos de cáncer sinonasal en empleados que inhalan compuestos de níquel y cromo. Mientras que las personas que han sido expuestas a compuestos como el cromo hexavalente o el arsénico trivalente han desarrollado ulceraciones en la mucosa y perforación del tabique nasal (Sunderman, 2001). Exposiciones a compuestos de Cr (VI) se han asociado con el desarrollo de cáncer nasal y de pulmón. En este último, la localización de los tumores es en los sitios donde se acumula el cromo. Las partículas de cromato con diámetro de 1-3 μm se depositan con facilidad en las áreas de bifurcación de los bronquios.

Magari y colaboradores en el 2002, encontraron en trabajadores expuestos a una mezcla de materia particulada (carbonos, sulfatos, nitratos, componentes orgánicos y metales), una relación entre el incremento en el ritmo cardiaco de los trabajadores por cada $\mu\text{g}/\text{m}^3$ que aumentaba de plomo y de vanadio.

En exposiciones prolongadas a estos MP, se pierde el equilibrio en el sistema de defensa, ya que el glutatión y otros antioxidantes se agotan. A la par, se bloquean sitios activos de otras proteínas por unión a metales pesados. La exposición al plomo puede afectar el desarrollo del sistema nervioso de fetos expuestos. También se ha publicado que trabajadores expuestos a concentraciones elevadas de dicho metal presentaron alteraciones en la morfología y movilidad de los espermatozoides, así como disminución en la cantidad y volumen del semen (Apostoli et al., 1998).

En roedores expuestos a níquel, cadmio, cromo y cobalto se muestran efectos histopatológicos en la mucosa nasal, con hiperplasias, metaplasia y atrofia del bulbo olfatorio (Sunderman, 2001).

III. ÁREA DE ESTUDIO

Ecatepec de Morelos es un municipio habitacional e industrial del Estado de México y forma parte de la ZMVM. Su nombre proviene del náhuatl y significa Cerro del viento (Ehécatl-viento, tépetl-cerro), haciendo devoción al dios mexica Quetzalcóatl. Se ubica al noreste de la Ciudad de México a 2259 msnm (Figura 8). Su principal elevación orográfica es la Sierra de Guadalupe, no existen ríos ni arroyos permanentes, los cauces de arroyos se forman en las barrancas de esta Sierra (<http://www.ecatepec.gob.mx/>).

El clima que predomina es templado subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 13.8°C con una máxima de 30 °C en los meses de marzo a julio y una mínima de 7.0 °C en diciembre y enero. Las precipitaciones pluviales promedio anual son de 491mm. Con una estimación de 90 días promedio de lluvias. La velocidad del viento promedio es de 2.1 m/s y la dirección que predomina de éste es NNO.

Por la acelerada urbanización, en esta zona se encuentra poca fauna y flora. Existen animales silvestres como patos, chichicuilotos (*Calandris minutilla*) y algunas especies de garza parda y la vegetación dominante es el matorral. Es el municipio más poblado y ocupa el cuarto lugar más industrializado del país (1550 fábricas aproximadamente), principalmente fábricas de hierro, de productos químicos, muebles, textiles y una termoeléctrica.

De acuerdo al informe de calidad del aire de la Ciudad de México del 2011, 13.3 millones de personas viven en zonas donde se supera la concentración anual de PM₁₀ (50

$\mu\text{g}/\text{m}^3$) de las cuales el 57% vive en el Estado de México, siendo Ecatepec una de las zonas que registró mayor cantidad de estas partículas.

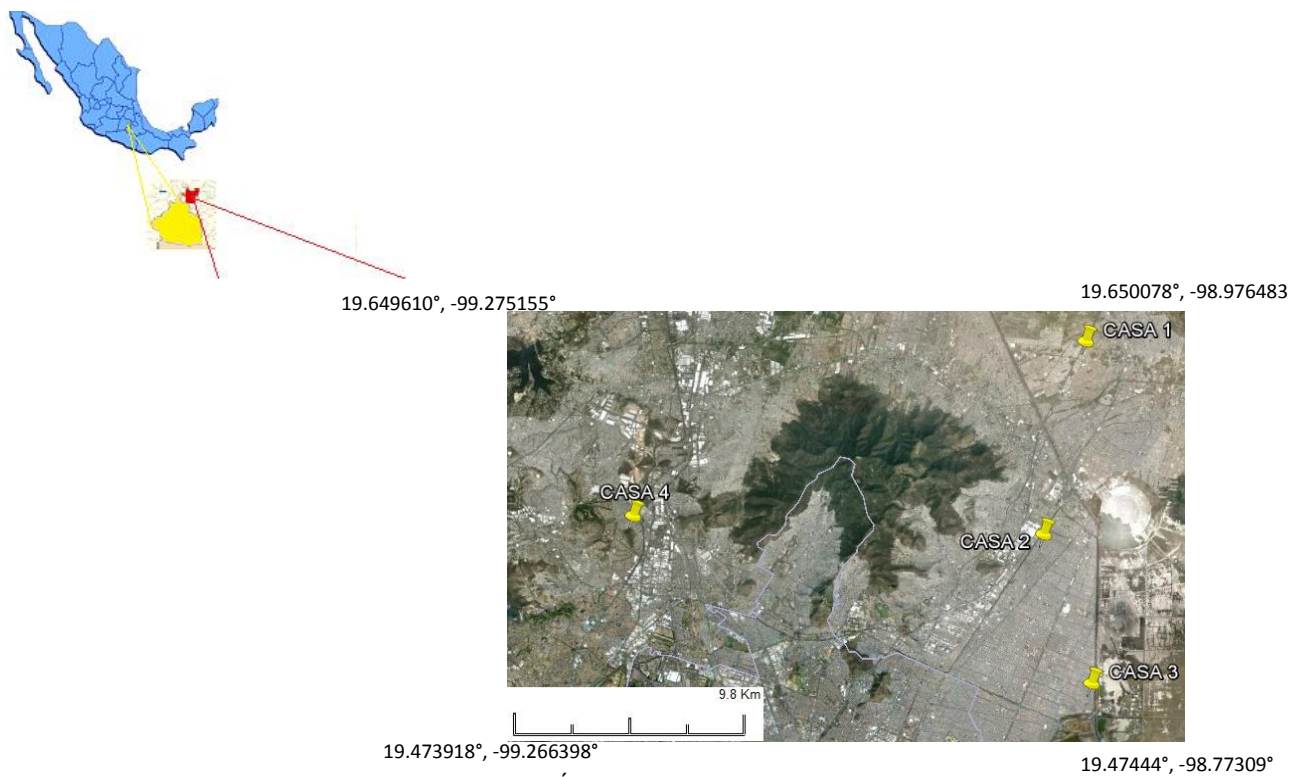


Figura 8. Área de estudio.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México, se han incrementado cada vez más las emisiones de MP al ambiente producidas por el tránsito vehicular y las industrias, lo cual constituye un grave problema de contaminación y de riesgo para la salud de la población del estado así como para la población de las zonas aledañas. A pesar del riesgo que representan los MP para la salud humana, en México se han realizado pocos estudios sobre sus efectos a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Alfaro et al., 2002; Osornio-Vargas 2003; Quintana et al., 2011; Motta et a., 2012). Estudios epidemiológicos han evidenciado que lo MP tales como plomo, níquel, cadmio y cromo del aire urbano están relacionados con modificaciones e inestabilidad de los ácidos nucleicos y con la incidencia de enfermedades respiratorias, cardiovasculares y cáncer (Bolati et al., 2010; Silverman et al., 2010; Quintana et al., 2011; Mota et al., 2012). Por lo anterior, se colectaron muestras de mezclas de metales pesados en filtros para PM_{10} de cuatro sitios de Ecatepec para identificar el tipo y concentración de metales pesados- PM_{10} emitidos a la atmósfera en el periodo de lluvias (2011), donde el lavado pluvial de las partículas es mayor. Dichas muestras se utilizaron para evaluar el daño al ADN y la expresión del miR-21 *in vitro* en los LPH.

V. HIPÓTESIS

La mezcla de MP asociados a las PM_{10} inducirá daño en el ADN y expresión diferencial del miR-21 en los LPH dependiendo de la concentración y tipo de metales, a pesar de que las muestras de MP fueron colectadas en la temporada de lluvia, donde hay mayor lavado de las partículas.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos genotóxico, epigenético y citotóxico en los LPH expuestos *in vitro* a metales pesados asociados a las PM_{10} obtenidas del aire urbano de la zona de Ecatepec, Estado de México durante el periodo de lluvias.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la concentración y tipo de MP asociados a las PM_{10} del periodo de lluvias de las cuatro zonas de Ecatepec.
- Analizar y comparar los efectos genotóxico, epigenético y citotóxico en los LPH expuestos *in vitro* a la fracción de MP de las PM_{10} .

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.I. Obtención de la fracción de MP asociados al aire urbano de Ecatepec, Edo. de México

Durante los meses de julio, agosto y septiembre del 2011, estudiantes del Laboratorio de Química Atmosférica del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM prepararon los filtros y la colocación de los equipos Mili Vol con un flujo de 4 L/min programados por 24 horas en los techos de 4 casas habitacionales ubicadas en Ecatepec, Estado de México (Figura 8). En cada lugar, se realizaron 4 colectas durante la temporada de lluvias. Después de cada muestreo, el filtro se retiró y se colocó en una caja de Petri para su posterior análisis por parte de dicho laboratorio.

VII. II. Digestión de los filtros para la extracción de los MP

Se realizó la digestión de 16 filtros de policarbonato de 47 mm de diámetro, en los cuales se depositaron las partículas de tamaño menor o igual a 10 micrómetros. Los filtros se prepararon de acuerdo a las técnicas de la “U.S.EPA Digestion Procedure for Microwave Extraction for Ambient Filter Samples (1999), Method IO-3.1.”, con control de presión y temperatura. Los filtros se sometieron a una digestión ácida en caliente con ácido nítrico concentrado ultra puro en un horno de microondas marca CEM, modelo MARS 5, con capacidad para 14 vasos (HP-500) de politetrafluoruro de etileno (PTFE). Este horno cuenta con un sensor de presión (ESP-1500 Plus) y un sistema para control de temperatura (EST-300 Plus), que resisten altas presiones y temperaturas, a las cuales son sometidos los filtros en el proceso de digestión.

Los filtros se colocaron en los vasos de PTFE con 15 mL de HNO₃ (3M) durante 45 min de digestión. Una vez digeridas las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada con una acidez final de HNO₃ de 0.45 N. En dicha disolución se obtuvo la fracción insoluble de las muestras de la época de lluvias. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta su análisis.

La ventaja de un sistema cerrado de digestión asistida por horno de microondas, es que se obtiene alta eficiencia de calor con aumento de presión, debido a la evaporación de los ácidos usados para la digestión y los gases involucrados durante la descomposición de la matriz de la muestra (materia orgánica). Esto es benéfico porque el incremento del punto de ebullición de los ácidos involucrados ayuda al rompimiento de la matriz de la muestra (Yang et al., 2012).

Mezcla de fracciones de MP

Se realizaron 4 mezclas de las 16 digestiones obtenidas, cada una compuesta de cuatro fechas de colecta por cada casa. En condiciones estériles, en la campana de extracción se tomaron 250 µL de cada colecta por casa, se filtraron y se mantuvieron a 4°C para su posterior uso en los ensayos de genotoxicidad, evaluación de la expresión del miR-21 y citotoxicidad *in vitro*.

VII.III. Evaluación genotóxica y citotóxica de las mezclas de MP en LPH *in vitro*

Tratamientos *in vitro* de LPH con las mezclas de MP de las PM₁₀

Se coincubaron 100 μ L de sangre total con viabilidad ≥ 96 % con las mezclas de MP de las PM₁₀ de la zona de estudio de los muestreos realizados en 4 casas habitacionales en la temporada de lluvias y medio RPMI-1640 a un volumen final de 1 mL a 37 °C por 2 h (Tabla III), las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Química Atmosférica. Para el testigo negativo se agregaron 100 μ L de sangre total en medio RPMI-1640 y el testigo positivo fue 100 μ L de sangre total más HgCl₂ (1000 μ g/L) en medio RPMI-1640 en las mismas condiciones. Después de los tratamientos, todas las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 20 min para aislar la fase de linfocitos y el botón celular se lavó dos veces con medio RPMI 1640. Finalmente, se tomó parte del botón para analizar la viabilidad celular y el resto fue mantenido en medio RPMI-1640 a 37 °C para realizar el ensayo cometa alcalino y la evaluación de la expresión del miR-21.

Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad de los LPH en todos los grupos experimentales se evaluó antes y después de los tratamientos, mediante el método de exclusión de azul tripano (Altman et al., 1993). El azul tripano penetra en las células muertas a través de la membrana celular dañada, tiñendo el citoplasma. Para tener la cantidad de células muertas como efecto de los tratamientos, se realizó una mezcla con 10 μ L del botón celular más 10 μ L de azul tripano (0.4 %) y después de 3 min se cuantificaron por duplicado 100 células consecutivas

con la cámara de Neubauer. El resto del botón celular se usó para los ensayos de epigenético, genotoxicidad y citotoxicidad (Calderón Segura et al., 2004; 2007).

Tabla III. Esquema de tratamientos *in vitro* de las diferentes mezclas de metales pesados asociados a PM₁₀ de la temporada de lluvias a los linfocitos periféricos humanos^a.

Mezcla de metales pesados			
	FRACCION 1 (μL)	SANGRE (μL)	MEDIO RPMI 1640 (μL)
F1C1	725	100	175
F1C2	750	100	150
F1C3	775	100	125
F1C4	800	100	100
F1C5	825	100	75
FRACCION 2			
	FRACCION (μL)	SANGRE (μL)	MEDIO RPMI 1640 (μL)
F2C1	650	100	250
F2C2	700	100	200
F2C3	750	100	150
F2C4	775	100	125
F2C5	800	100	100
FRACCION 3			
	FRACCION (μL)	SANGRE (μL)	MEDIO RPMI 1640 (μL)
F3C1	700	100	200
F3C2	725	100	175
F3C3	750	100	150
F3C4	775	100	125
F3C5	800	100	100
FRACCION 4			
	FRACCION (μL)	SANGRE (μL)	MEDIO RPMI 1640 (μL)
F4C1	625	100	275
F4C2	650	100	250
F4C3	675	100	225
F4C4	700	100	200
F4C5	725	100	175

^a De dos donadores y para tres experimentos independientes por donador.

Preparación del testigo positivo para los ensayos de genotoxicidad

Debido a que el cloruro de mercurio (HgCl_2) es insoluble en agua y de acuerdo a lo reportado para los ensayos genéticos, se usaron dos vehículos para dos soluciones concentradas de HgCl_2 , la primera con ácido nítrico (HNO_3 al 10%) y la segunda con etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ al 30%) a una concentración final de 500,000 $\mu\text{g/L}$ con agua desionizada (Silva-Pereira et al., 2005).

Para encontrar la concentración que indujera genotoxicidad significativa en los LPH, Se realizaron experimentos preliminares con tres concentraciones de HgCl_2 con ambos vehículos (100, 1000, 10,000 $\mu\text{g/L}$), así como con la exposición de las mezclas o fracciones de metales pesados en dichas células. Los testigos que se utilizaron para posteriores experimentos fueron: a) Los LPH más ácido nítrico al 2.5 % b) Los LPH más etanol al 7.5% (Silva-Pereira et al., 2005) y c) El testigo negativo con los LPH más medio RPMI-1640. En los tratamientos, todos con un volumen final de 1 mL, se agregaron 600 μL del ácido nítrico, quedando en el volumen final una concentración de éste ácido al 0.06% y del etanol al 0.22% al agregar 750 μL de la solución stock.

VII.III.I. Ensayo cometa alcalino

Se realizó el ensayo cometa alcalino de acuerdo a los métodos de Singh et al. (1988) y Calderón Segura et al. (2007). Se mezclaron 25 μL de LPH de cada lote experimental y se mezclaron con 90 μL de agarosa de bajo punto de fusión (LPMA 0.5%) a 37 °C y se colocaron sobre un gel con una monocapa de agarosa de punto de fusión normal (NMA 1%) para hacer dos laminillas por cada concentración de la MMP- PM_{10} y

para los testigos negativo y positivo. Posteriormente, los geles se sumergieron en una solución de lisis final (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, Tritón 1% X-100 y DMSO 10 %, pH 10) a 4 °C por 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (Owl A5, LabSystemInc) con amortiguador de electroforesis alcalino frío (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 13) durante 20 min sin corriente para desenrollar el ADN y por otros 20 min en obscuridad, se realizó la electroforesis a 25 V y 300 mA. A continuación, los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante (0.4 M Tris, pH 7.5) por 5 min. Después de la neutralización, para fijar los geles, se dejaron en etanol absoluto a 4 °C por 10 min. Las laminillas se dejaron secar por completo y se mantuvieron en cajas para su posterior observación.

Para teñir el ADN, a cada laminilla se le agregaron 50 µL de colorante Gel Red (10 %). Las laminillas se examinaron usando un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss modelo Axiostar Plus H-BO-100, equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Para determinar el efecto genotóxico se evaluaron los parámetros: frecuencia de cometas (núcleos con daño al ADN), momento de la cauda, así como la longitud de la cauda (fragmentación del ADN) en 50 núcleos consecutivos de cada lote experimental y cada testigo por duplicado con el programa Comet IV.

VII.III.II. Evaluación de la expresión del miR-21

Extracción de RNA

Se aisló RNA total de LPH expuestos previamente a las mezclas de metales mediante el procedimiento descrito para el uso del reactivo Trizol de la siguiente manera: a cada botón celular se le agregaron 500 μL de Trizol y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm y se agregaron 100 μL de cloroformo, se agitaron y se dejaron reposar por 10 min. Se realizó una segunda centrifugación a 10,000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron 250 μL de isopropanol y 1 μL de glucógeno. Se agitaron y se dejaron reposar por 10 min para centrifugar a 10,000 rpm por 5 min. Se decantó, se agregaron 200 μL de etanol (75%) y se centrifugaron. Por último, se volvió a decantar y las muestras se dejaron secar en baño seco a 40 °C.

Cuantificación de RNA

Una vez aislado el RNA, a cada muestra se le agregaron 20 μL de agua inyectable y se cuantificó en 1 μL la cantidad de RNA por espectrofotometría (absorbancia de 260-280 nm) con el NanoDrop ND-100. Posteriormente, se hicieron los cálculos para tener en cada 3 μL de muestra 50 ng de RNA, como se evidencia a continuación:

Directas

- Una muestra tuvo 20.7 ng/ μL de RNA, entonces para tener 50 ng en 3 μL .

$$50_{\text{ng}} / 20.7_{\text{ng}/\mu\text{L}} = 2.41_{\mu\text{L}} \text{ de RNA} + 0.59_{\mu\text{L}} \text{ de H}_2\text{O libre de RNAasas}$$

Diluciones

- Una muestra tuvo 265.7 ng/ μ L de RNA, entonces se toman 3 μ L de la dilución que se prepara en 50 μ L.

$$[(50_{\text{ng}} / 3_{\mu\text{L}}) \times 50_{\mu\text{L}}] / 265.7_{\text{ng}/\mu\text{L}} = 3.20_{\mu\text{L}} \text{ de RNA} + 46.8_{\mu\text{L}} \text{ de H}_2\text{O libre de RNAasas}$$

Síntesis de cDNA o templado

En un volumen final de 7.5 μ L (4.5 μ L de solución para la síntesis de cDNA más 3 μ L de RNA) se realizó la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del Kit Fermentas en un termociclador “Thermalcycler MJ mini” (Anexo II). Se utilizaron los oligos OligoRT-miR21 y como constitutivo el OligoRT-miR16.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)

Para la amplificación de los fragmentos de interés (miR-21 y miR-16) se trabajó con la cuarta y quinta concentración de cada sitio por donador. El PCR en tiempo real se realizó en un equipo de la marca Stratagen Mx 300 SP, Agilent Technologies y siguiendo el protocolo del Kit SYBR Green en tres segmentos (Figura 9). El SYBR Green es un agente detector o reportero, el cual se intercala en las bases del ADN. En cuanto se genera una molécula nueva de ADN, este agente se incorpora a la molécula y la señal fluorescente que es detectada por los equipos de PCR. Para corroborar que la fluorescencia registrada corresponde al templado de interés, se estableció el tercer segmento para la curva de disociación (Figura 30).

Cada muestra se analizó por triplicado agregando 18 μ L de la mezcla de SYBR Green más 2 μ L del cDNA y un control (NTC), es decir sin el templado para miR-16 y para miR-21 (Anexo II).

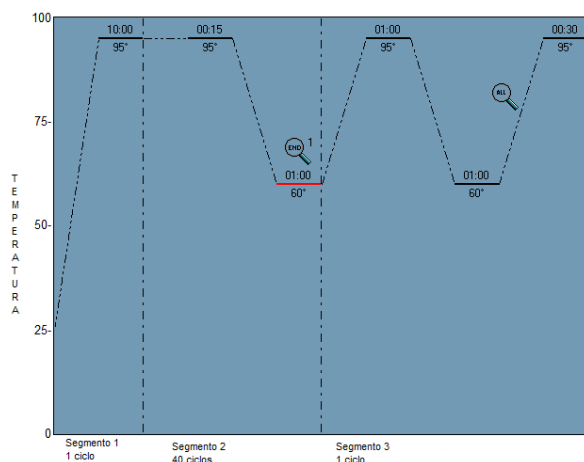


Figura 9. Programa de amplificación en el termociclador en tiempo real para las muestras de estudio.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existen diferencias significativas entre los valores promedio de los parámetros genotóxicos, citotóxicos y epigenéticos de tres experimentos independientes de los grupos experimentales y de los testigos negativo y positivo, se aplicó una prueba estadística de varianza (ANOVA), una prueba múltiple de Bonferroni y regresión lineal.

IX. RESULTADOS

IX.I. Genotoxicidad *in vitro* de las mezclas de MP en los LPH

Los resultados de los tratamientos a los LPH de dos donadores (D1 y D2) expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones de MP de cuatro sitios de Ecatepec Estado de México mostraron que todas las mezclas (F1-F4) de metales-PM₁₀ causaron incremento significativo en los promedios de la frecuencia de cometas, en el momento y en la longitud de la cauda al compararlos con el testigo negativo (LPH+RPMI-1640), (Tabla IV-VI, Figuras 10-15).

En los LPH del D1 expuestos a los cinco tratamientos (C1-C5) de las mezclas por mezcla, el promedio de los parámetros genotóxicos fueron de:

- Frecuencia de cometas. F1) 20.67 ± 10.17 a 82.67 ± 0.33 ; F2) 16.67 ± 2.18 a 90.67 ± 5.04 ; F3) 34.67 ± 1.66 a 71.67 ± 3.18 ; y F4) 18.67 ± 2.33 a 71.33 ± 7.53 .
- Momento de la cauda. F1) 1.55 ± 0.28 a 2.66 ± 0.38 %; F2) 1.03 ± 0.13 a 6.74 ± 0.45 %; F3) 0.72 ± 0.12 a 5.36 ± 0.42 %; y F4) 1.31 ± 0.17 a 3.79 ± 0.51 %.
- Longitud de la cauda. F1) 27.71 ± 1.33 a 30.47 ± 1.05 μm ; F2) 21.43 ± 1.31 a 65.59 ± 2.16 μm ; F3) 21.14 ± 1.04 a 60.75 ± 2.05 μm ; y F4) 24.14 ± 1.48 a 47.17 ± 2.53 μm .

En los LPH del D2 expuestos a los mismos tratamientos, el promedio de los parámetros genotóxicos fueron de:

- Frecuencia de cometas. F1) 25.00 ± 0.57 a 83.33 ± 5.45 ; F2) 20.67 ± 5.36 a 66.00 ± 3.46 ; F3) 29.33 ± 3.48 a 77.67 ± 2.90 ; y F4) 17.00 ± 2.30 a 76.33 ± 2.96 .

- Momento de la cauda. F1) 3.09 ± 0.52 a 6.44 ± 0.19 %; F2) 1.04 ± 0.17 a 5.90 ± 0.64 %; F3) 2.17 ± 0.34 a 5.02 ± 0.54 %; y F4) 0.83 ± 0.10 a 3.42 ± 0.62 %.
- Longitud de la cauda. F1) 35.33 ± 2.49 a 72.62 ± 3.63 μm ; F2) 29.17 ± 1.07 a 62.09 ± 2.99 μm ; F3) 39.13 ± 1.94 a 58.70 ± 2.44 μm ; y F4) 26.64 ± 0.90 a 63.04 ± 2.67 μm .

Con las cuatro mezclas en la C1 y C2, los valores de los tres parámetros genotóxicos no mostraron diferencias significativas con el testigo negativo. Comparando el efecto genotóxico en los LPH expuestos *in vitro* a las mezclas de metales pesados, se observó que la F2 en el D1 fue más genotóxica que la F1, F3 y F4, mientras que en el D2 la F1 fue más genotóxica que la F2, F3 y F4 (Tabla IV-VI, Figuras 10-15).

El los tratamientos *in vitro* con $\text{HgCl}_2 + \text{HNO}_3$ al 0.06% (testigo positivo) a los LPH en los dos donadores produjo aumento significativo en los promedios de la frecuencia de cometas (80 ± 8.0 y 73 ± 1.0), en el momento (2.07 ± 0.18 y 2.55 ± 0.27) y la longitud de la cauda (34.83 ± 1.30 y 37.66 ± 1.35 μm) comparado con el testigo negativo ($p < 0.001$) (Tabla IV-VI, Figuras 10-15). La incubación *in vitro* con $\text{HgCl}_2 + \text{Etanol}$ 0.22 % (testigo positivo 2) a los linfocitos periféricos humanos en los dos donadores (D1 y D2) indujo ascenso significativo en los promedios de la frecuencia de cometas (30.67 ± 2.96 y 56.67 ± 1.85), en el momento (2.55 ± 0.35 y 3.59 ± 0.46) y la longitud de la cauda (36.74 ± 2.34 y 44.87 ± 1.80 μm) comparado con el testigo negativo (Tablas IV-VI.) La frecuencia basal de daño en el ADN de los dos donadores (D1 y D2) estuvo dentro de los rangos normales.

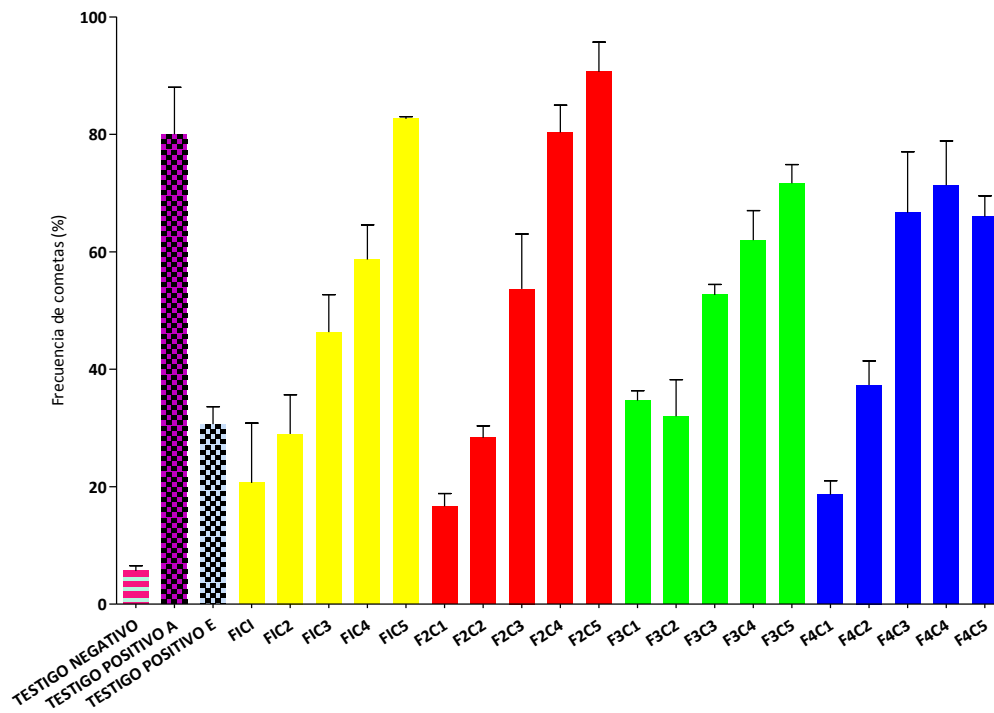


Figura 10. Gráfica de la media de la frecuencia de cometas de los linfocitos periféricos humanos del donador I (D1) expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado de diferentes sitios de Ecatepec Estado de México. Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de los cometas de tres experimentos independientes.

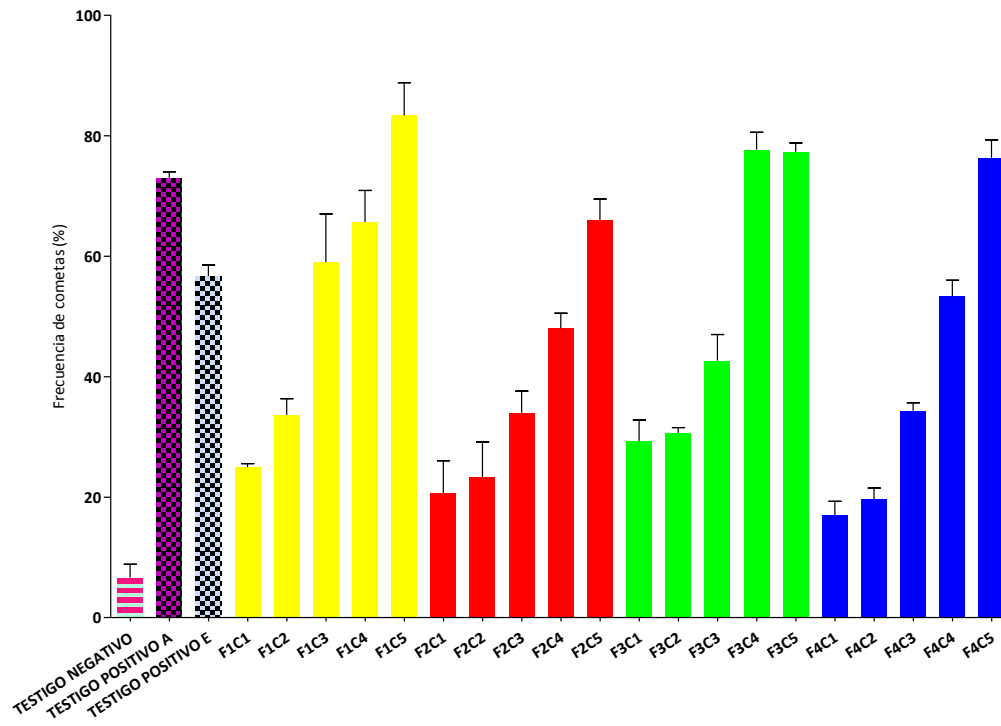


Figura 11. Gráfica de media de la frecuencia de cometas de los linfocitos periféricos humanos del donador 2 (D2) expuestos in vitro a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado de diferentes sitios de Ecatepec Estado de México. Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de los cometas de tres experimentos independientes.

TABLA IV. Frecuencia de cometas inducidos en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> a la fracción de metales pesados de la PM₁₀^a		
$\bar{X} \pm EE$		
TESTIGO NEGATIVO		
	D1	D2
	5.66 ± 0.88	6.66 ± 2.18
TESTIGO POSITIVO (HgCl ₂ + 0.06%HNO ₃)		
	D1	D2
	80 *± 8.0 ***	73 ± 1.0 ***
TESTIGO POSITIVO (HgCl ₂ +0.22%C ₂ H ₆ O)		
	D1	D2
	30.67 ± 2.96	56.67 ± 1.85 ***
F1 (Mezcla de metales pesados del sitio 1)		
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MP	D1	D2
1.47 X 10 ⁻⁴ C1	20.67 ± 10.17	25.00 ± 0.57
1.52 X 10 ⁻⁴ C2	29.00± 6.65	33.67 ± 2.66 ***
1.58 X 10 ⁻⁴ C3	46.33 ± 6.38 **	59.00 ± 8.02 ***
1.63 X10 ⁻⁴ C4	58.67 ± 5.92 ***	65.67 ± 5.23 ***
1.68 X 10 ⁻⁴ C5	82.67 ± 0.33***	83.33 ± 5.45 ***
F2 (Mezcla de metales pesados del sitio 2)		
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MP	D1	D2
1.89 X 10 ⁻⁴ C1	16.67 ± 2.18	20.67 ± 5.36
2.03 x 10 ⁻⁴ C2	28.33 ± 2.02	23.33 ± 5.84
2.18 X 10 ⁻⁴ C3	53.67 ± 9.35 ***	34.00 ± 3.60 ***
2.25 X 10 ⁻⁴ C4	80.33 ± 4.63 ***	48.00 ± 2.51 ***
2.32 X 10 ⁻⁴ C5	90.67 ± 5.04 ***	66.00 ± 3.46 ***
F3 (Mezcla de metales pesados del sitio 3)		
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MP	D1	D2
1.63 x 10 ⁻⁴ C1	34.67 ± 1.66 *	29.33 ± 3.48 *
1.69 X 10 ⁻⁴ C2	32.00 ± 6.24 *	30.67 ± 0.88 **
1.75 X 10 ⁻⁴ C3	52.67 ± 1.76 ***	42.67 ± 4.33 ***
1.81 X 10 ⁻⁴ C4	62.00 ± 5.03 ***	77.67 ± 2.90 ***
1.87 X 10 ⁻⁴ C5	71.67 ± 3.18 ***	77.33 ± 1.45 ***
F4 (Mezcla de metales pesados del sitio 4)		
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MP	D1	D2
8.00 X 10 ⁻⁵ C1	18.67 ± 2.33	17.00 ± 2.30
8.32 X 10 ⁻⁵ C2	37.33 ± 4.09	19.67 ± 1.85
8.64 X 10 ⁻⁵ C3	66.67 ± 10.35 ***	34.33 ± 1.33 ***
8.97 X 10 ⁻⁵ C4	71.33 ± 7.53 ***	53.33 ± 2.66 ***
9.29 X 10 ⁻⁵ C5	66.00 ± 3.51 ***	76.33 ± 2.96 ***

Promedios de experimentos independientes D1=donador 1 y D2=donador 2. Diferencias significativas a $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.

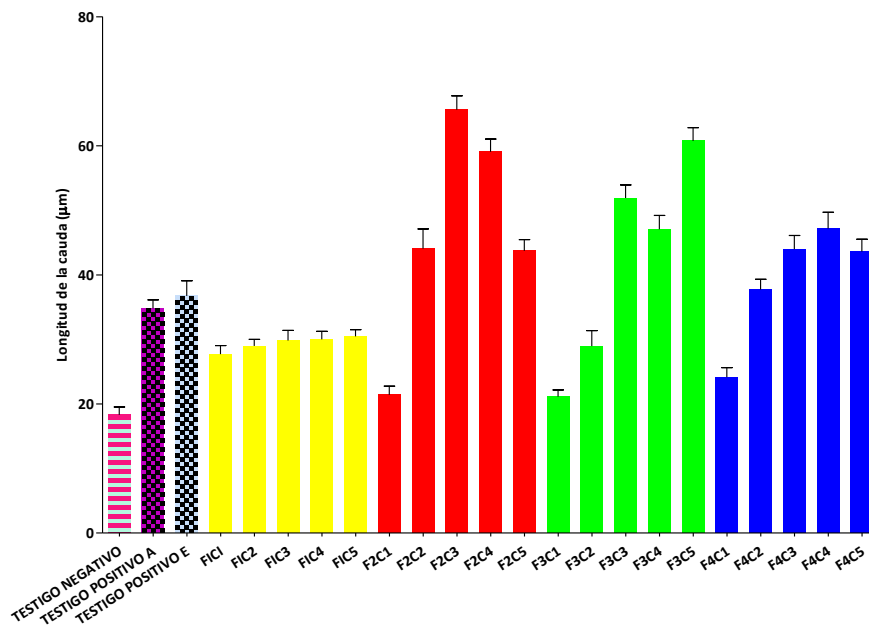


Figura 12. Gráfica de la media de la longitud de la cauda de los linfocitos periféricos humanos del donador 1 (D1) expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado de diferentes sitios de Ecatepec Estado de México. Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de los cometas de tres experimentos independientes.

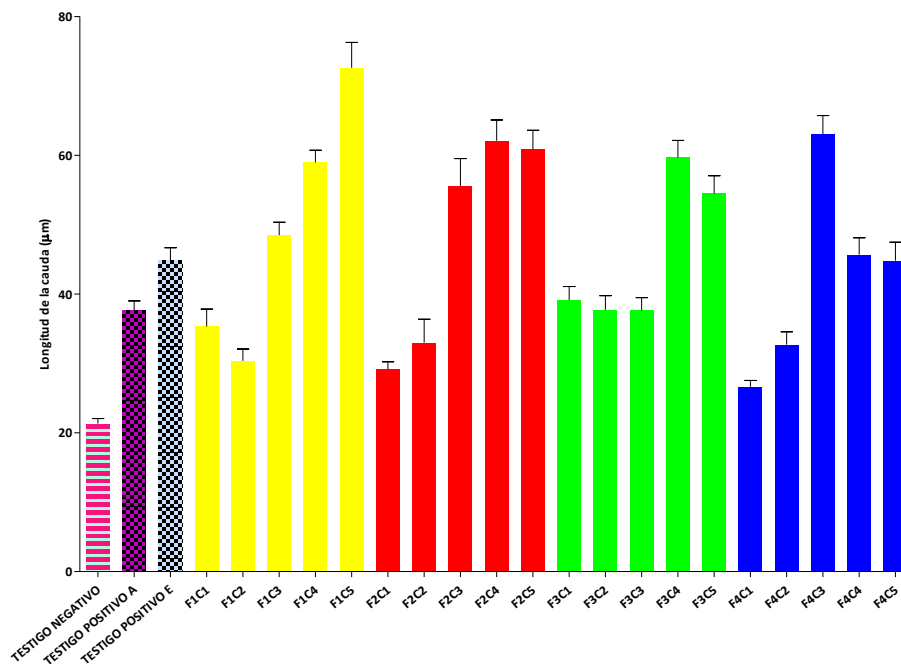


Figura 13. Gráfica de la media de la longitud de la cauda de los linfocitos periféricos humanos del donador 2 (D2) expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado de diferentes sitios de Ecatepec Estado de México. Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de los cometas de tres experimentos independientes.

TABLA V. Longitud de la cauda de linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> a la fracción de metales pesados de la PM₁₀^a			
$\bar{X} \pm EE$			
TESTIGO NEGATIVO			
D1		D2	
18.33 ± 1.21		21.33 ± 1.73	
TESTIGO POSITIVO (HgCl ₂ + 0.06%HNO ₃)			
D1		D2	
34.83± 1.30		37.66 ± 1.35	
TESTIGO POSITIVO (HgCl ₂ + 0.22% C ₂ H ₆ O)			
D1		D2	
36.74 ± 2.34		44.87 ± 1.80*	
F1 (Mezcla de metales pesados del sitio 1)			
μg/μL de MP		D1	D2
1.47 X 10 ⁻⁴	C1	27.71 ± 1.33	35.33 ± 2.49
1.52 X 10 ⁻⁴	C2	28.99± 1.049	30.38 ± 1.69
1.58 X 10 ⁻⁴	C3	29.84 ± 1.56	48.49 ± 1.85***
1.63 X10 ⁻⁴	C4	30.01 ± 1.25	58.98 ± 1.75***
1.68 X 10 ⁻⁴	C5	30.47 ± 1.05	72.62 ± 3.63***
F2 (Mezcla de metales pesados del sitio 2)			
μg/μL de MP		D1	D2
1.89 X 10 ⁻⁴	C1	21.43 ± 1.31	29.17 ± 1.07
2.03 x 10 ⁻⁴	C2	44.09 ± 3.03*	32.99 ± 3.38
2.18 X 10 ⁻⁴	C3	65.59 ± 2.16 ***	55.59 ± 3.94***
2.25 X 10 ⁻⁴	C4	59.06 ± 1.98***	62.09 ± 2.99***
2.32 X 10 ⁻⁴	C5	43.71 ± 1.74**	60.85 ± 2.74***
F3 (Mezcla de metales pesados del sitio 3)			
μg/μL de MP		D1	D2
1.63 x 10 ⁻⁴	C1	21.14 ± 1.04	39.13 ± 1.94
1.69 X 10 ⁻⁴	C2	28.97 ± 2.40	37.70 ± 2.04
1.75 X 10 ⁻⁴	C3	51.92 ± 2.01***	37.64 ± 1.85
1.81 X 10 ⁻⁴	C4	47.06 ± 2.15***	58.70 ± 2.44***
1.87 X 10 ⁻⁴	C5	60.75 ± 2.05***	54.50 ± 2.55***
F4 (Mezcla de metales pesados del sitio 4)			
μg/μL de MP		D1	D2
8.00 X 10 ⁻⁵	C1	18.67 ± 2.33	26.64 ± 0.90
8.32 X 10 ⁻⁵	C2	37.33 ± 4.09	32.71 ± 1.84
8.64 X 10 ⁻⁵	C3	66.67 ± 10.35*	63.04 ± 2.67***
8.97 X 10 ⁻⁵	C4	71.33 ± 7.53***	45.68 ± 2.42**
9.29 X 10 ⁻⁵	C5	43.60 ± 1.94*	44.81 ± 2.65*

D1=donador 1 y D2=donador 2. Los valores de significancia son; p<0.05*, p<0.01** y p<0.001***

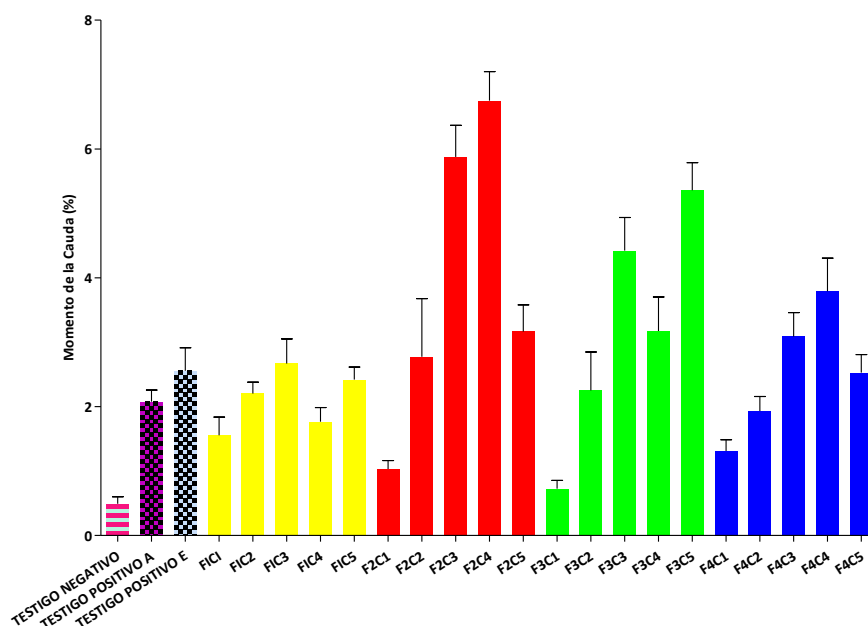


Figura 14. Gráfica de la media del momento de la cauda de los linfocitos periféricos humanos del donador 1 (D1) expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado de diferentes sitios de Ecatepec Estado de México. Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de los cometas de tres experimentos independientes.

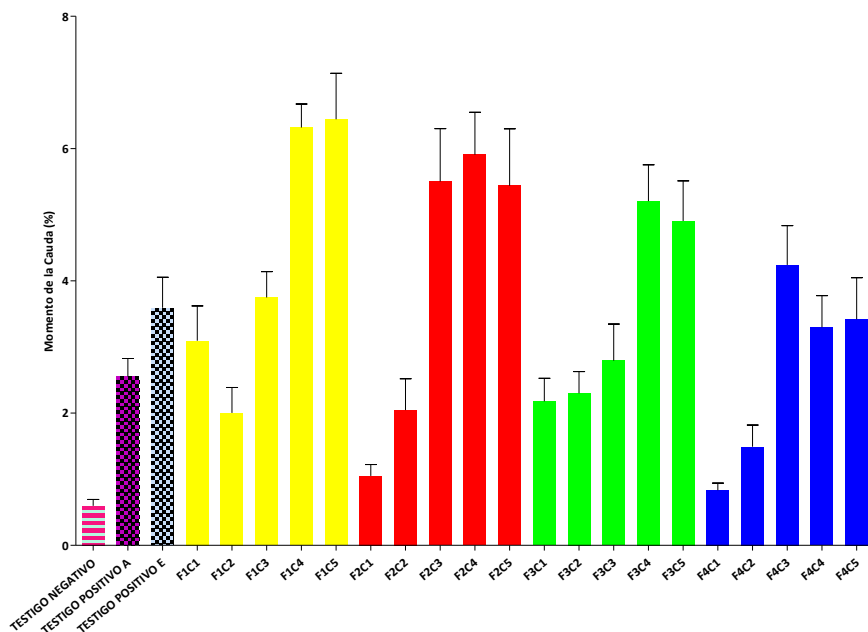


Figura 15. Gráfica de la media del momento de la cauda de los linfocitos periféricos humanos del donador 2 (D2) expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado de diferentes sitios de Ecatepec Estado de México. Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de los cometas de tres experimentos independientes.

TABLA VI. Momento de la cauda de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a la fracción de metales pesados de la PM₁₀^a

$\bar{X} \pm EE$		
TESTIGO NEGATIVO		
	D1	D2
	0.49 ± 0.10	0.59 ± 0.09
TESTIGO POSITIVO (HgCl ₂ + 0.06%HNO ₃)		
	D1	D2
	2.07 ± 0.18	2.55 ± 0.27
TESTIGO POSITIVO (HgCl ₂ + 0.22%C ₂ H ₆ O)		
	D1	D2
	2.55 ± 0.35	3.59 ± 0.46
F1 (Mezcla de metales pesados del sitio 1)		
µg/µL de MP	D1	D2
1.47 X 10 ⁻⁴ C1	1.55 ± 0.28	3.09 ± 0.52
1.52 X 10 ⁻⁴ C2	2.20 ± 0.17	2.00 ± 0.38
1.58 X 10 ⁻⁴ C3	2.66 ± 0.38	3.74 ± 0.38
1.63 X 10 ⁻⁴ C4	1.76 ± 0.21	6.31 ± 0.35**
1.68 X 10 ⁻⁴ C5	2.42 ± 2.19	6.44 ± 0.19***
F2 (Mezcla de metales pesados del sitio 2)		
µg/µL de MP	D1	D2
1.89 X 10 ⁻⁴ C1	1.03 ± 0.13	1.04 ± 0.17
2.03 x 10 ⁻⁴ C2	2.77 ± 0.90	2.04 ± 0.47
2.18 X 10 ⁻⁴ C3	5.87 ± 0.48 **	5.50 ± 0.78
2.25 X 10 ⁻⁴ C4	6.74 ± 0.45***	5.90 ± 0.64**
2.32 X 10 ⁻⁴ C5	3.16 ± 0.41	5.43 ± 0.86
F3 (Mezcla de metales pesados del sitio 3)		
µg/µL de MP	D1	D2
1.63 x 10 ⁻⁴ C1	0.72 ± 0.12	2.17 ± 0.34
1.69 X 10 ⁻⁴ C2	2.25 ± 0.59	2.30 ± 0.32
1.75 X 10 ⁻⁴ C3	4.42 ± 0.51	2.79 ± 0.55
1.81 X 10 ⁻⁴ C4	3.17 ± 0.53	5.02 ± 0.54
1.87 X 10 ⁻⁴ C5	5.36 ± 0.42*	4.90 ± 0.60
F4 (Mezcla de metales pesados del sitio 4)		
µg/µl de MP	D1	D2
8.00 X 10 ⁻⁵ C1	1.31 ± 0.17	0.83 ± 0.10
8.32 X 10 ⁻⁵ C2	1.93 ± 0.22	1.49 ± 0.32
8.64 X 10 ⁻⁵ C3	3.08 ± 0.36	4.24 ± 0.59
8.97 X 10 ⁻⁵ C4	3.79 ± 0.51	3.29 ± 0.47
9.29 X 10 ⁻⁵ C5	2.52 ± 0.28	3.42 ± 0.62

Promedios de experimentos independientes D1=donador 1 y D2=donador 2. Diferencias significativas a p<0.05*, p<0.01** y p<0.001***.

IX.II. Análisis de Regresión Lineal

El análisis de regresión lineal de los valores promedio de la frecuencia de cometas, del momento y la longitud de la cauda de tres experimentos independientes de ambos donadores mostraron correlaciones positivas ($r \geq 0.83$), indicando una relación de concentración-efecto (Figuras 16-27). Excepto, que la longitud de la cauda no mostró correlación positiva en los LHP de ambos donadores expuestos con la mezcla del FI ($r=0.47$) y a la F4 ($r=0.32$), asimismo en el DI con la FI ($r=0.19$), F2 ($r=0.44$) y F4 ($r=0.49$) (Figuras 16-27).

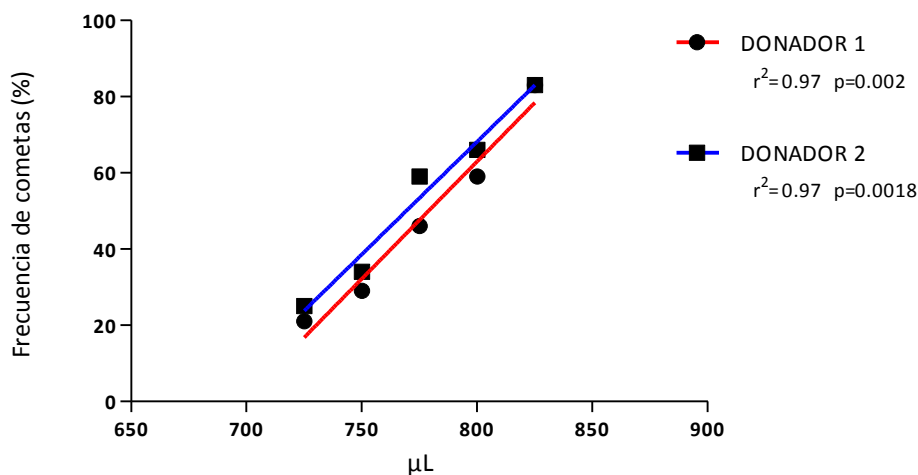


Figura 16. Gráfica de regresión lineal de la media de las frecuencias de cometas de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 1 de Ecatepec Estado de México.

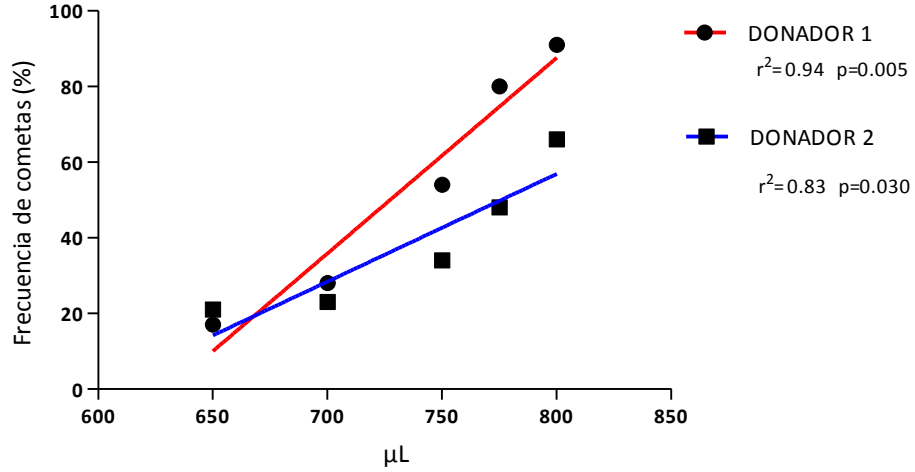


Figura 17. Gráfica de regresión lineal de la media de las frecuencias de cometas de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 2 (F2) de Ecatepec Estado de México.

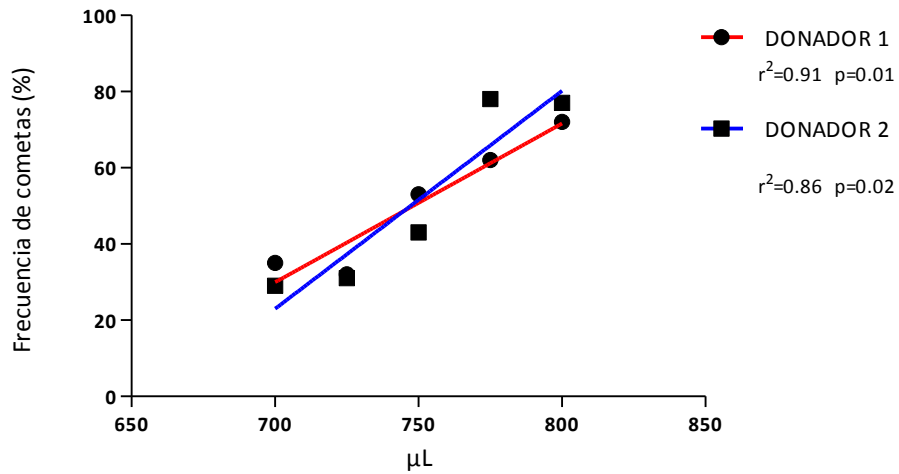


Figura 18. Gráfica de regresión lineal de la media de las frecuencias de cometas de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 3 (F3) de Ecatepec Estado de México.

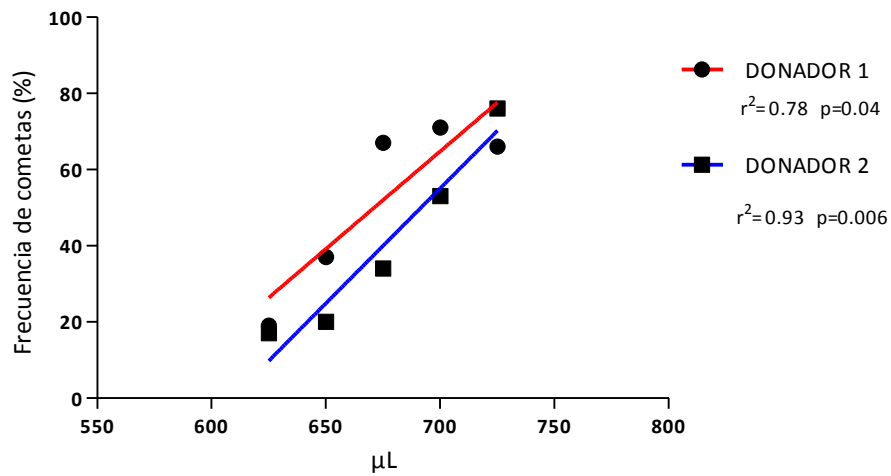


Figura 19. Gráfica de regresión lineal de la media de las frecuencias de cometas de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 4 (F4) de Ecatepec Estado de México.

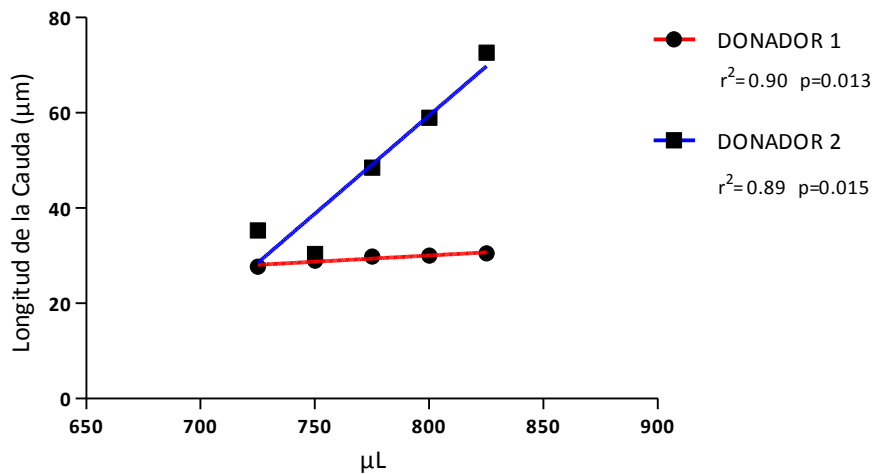


Figura 20. Gráfica de regresión lineal de la media de la longitud de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 1 (F1) de Ecatepec Estado de México.

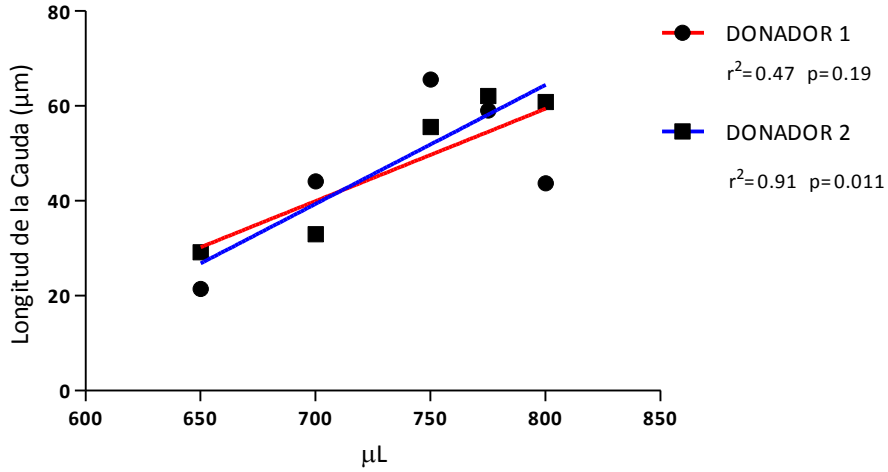


Figura 21. Gráfica de regresión lineal de la media de la longitud de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 2 (F2) de Ecatepec Estado de México.

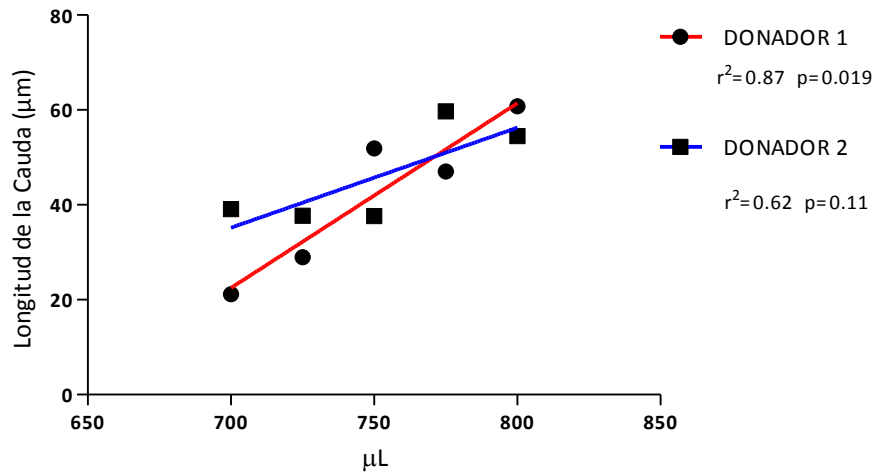


Figura 22. Gráfica de regresión lineal de la media de la longitud de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 3 (F3) de Ecatepec Estado de México.

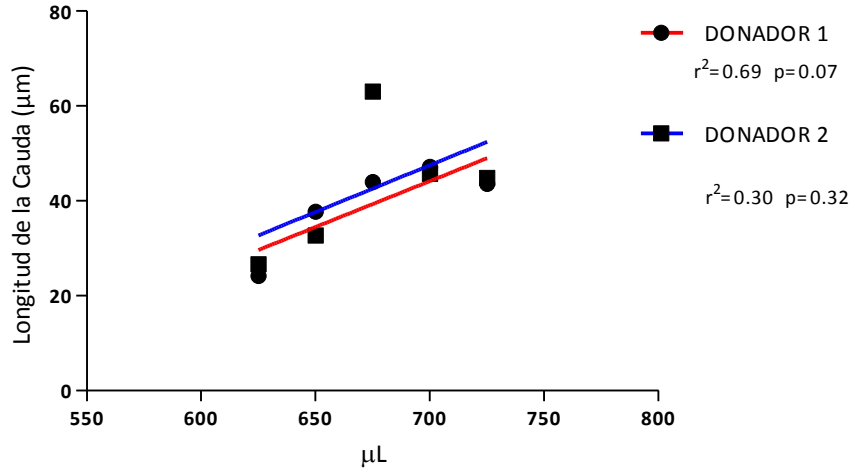


Figura 23. Gráfica de regresión lineal de la media de la longitud de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 4 (F4) de Ecatepec Estado de México.

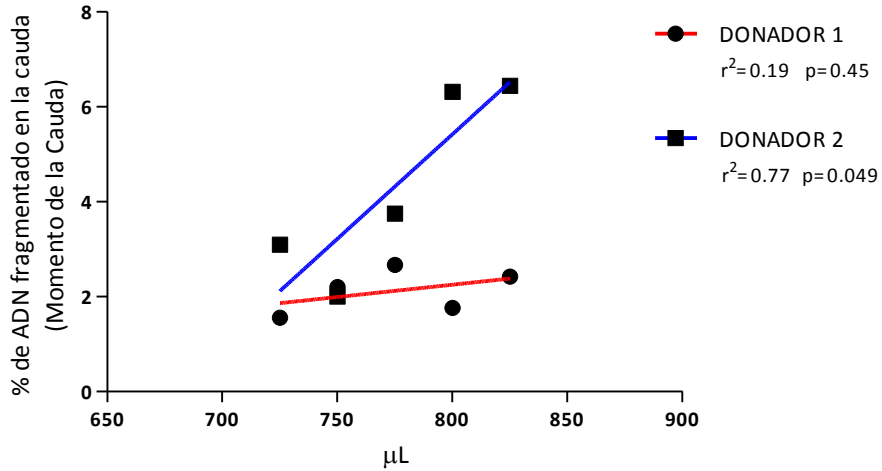


Figura 24. Gráfica de regresión lineal de la media del momento de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 1 (F1) de Ecatepec Estado de México.

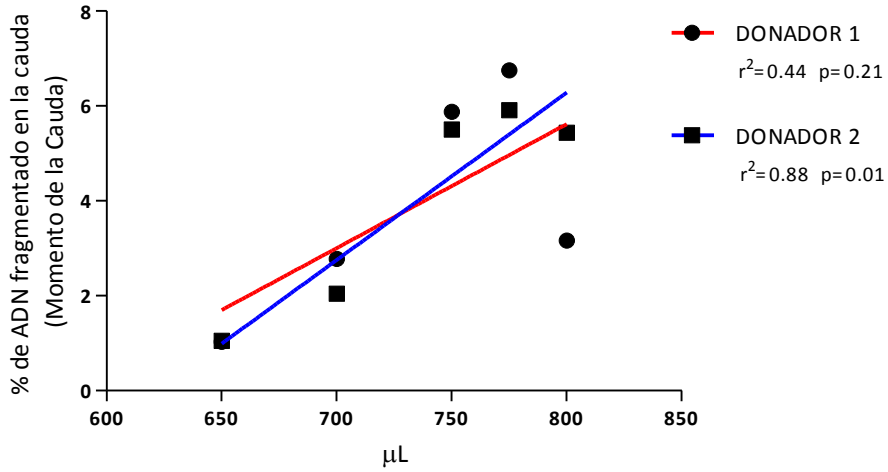


Figura 25. Gráfica de regresión lineal de la media del momento de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 2 (F2) de Ecatepec Estado de México.

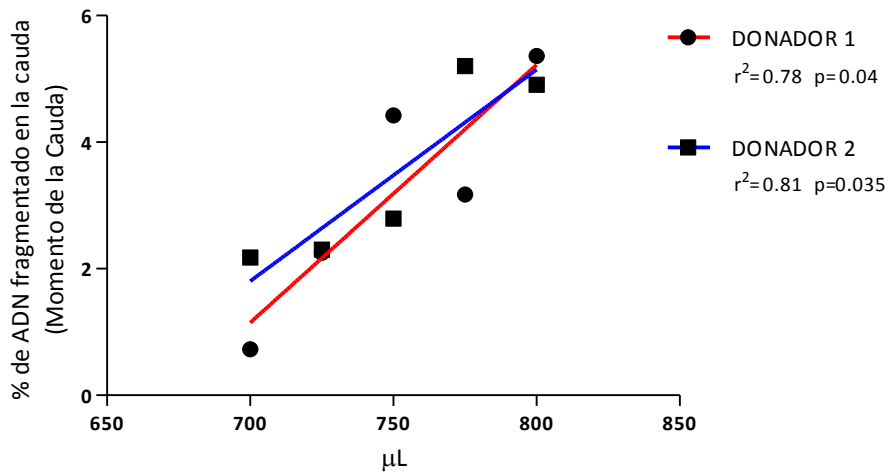


Figura 26. Gráfica de regresión lineal de la media del momento de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 3 (F3) de Ecatepec Estado de México.

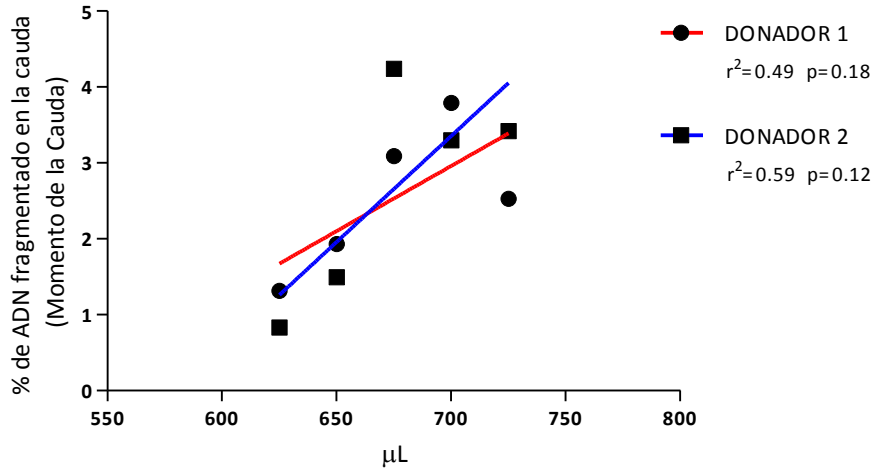


Figura 27. Gráfica de regresión lineal de la media del momento de la cauda de los linfocitos periféricos humanos de los donadores 1 y 2 expuestos *in vitro* a mezclas de metales pesados del aire urbano colectado del sitio 4 (F4) de Ecatepec Estado de México.

IX.III. Evaluación de la expresión del miR-21 en los LPH

A la par se cuantificaron los niveles de expresión del miR-21 por RT-qPCR en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a concentraciones elevadas de las mezclas de metales de los cuatro sitios (F1-F4[C4 y C5]) de Ecatepec usando como constitutivo el miR-16.

Las mezclas de metales de los cuatro sitios analizados a concentraciones elevadas en los LPH *in vitro* en el DI generaron sobre-expresión del miR-21 comparado con su testigo negativo. Para F1C5: 20; F2C4: 105; F2C5: 300; F3C4: 169; F3C5: 3040; F4C4: 122 y F4C5: 962 (Figura 28). Excepto para la mezcla F1C4, la cual no indujo la expresión del miR-21 (Figura 28). Al comparar la acción epigenética de las cuatro mezclas se observó que las mezclas F3C5 (3040) y F4C5 (962) ocasionaron mayor expresión del miR-21 que las mezclas F1C5 y F2C4 (Figura 28).

En el donador 2 (D2), las cuatro mezclas produjeron expresión del miR-21 comparado con su testigo negativo. Para F1C4: 31; F1C5: 5; F2C4: 25; F2C5: 15; F3C4: 9; F4C4: 296 y F4C5: 5 (Figura 29). Excepto la mezcla F3C5, la cual no provocó expresión del miR-21 (Figura 29). Al comparar, el efecto sobre la expresión del miRNA-21 en los LPH incubados con las cuatro mezclas se nota que la mezcla F4C4 (296) produce mayor expresión del miR-21 que las mezclas F1, F2 y F3 (Figura 29).

El testigo positivo, HgCl_2 +0.06% HNO_3 incubado con los linfocitos periféricos humanos en los ambos donadores produce aumento significativo en la expresión del miR-21, D1: 83 y D2: 29 (Figuras 28 y 29). Pero la expresión del miR-21 es mayor en el D1 que en el D2 (Figuras 28 y 29).

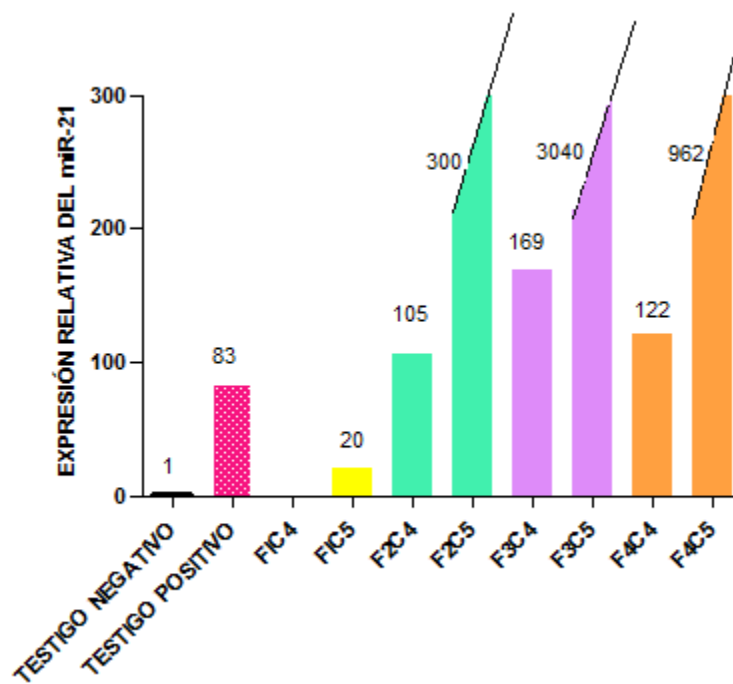


Figura 28. Expresión del miR-21 en los linfocitos periféricos humanos del donador 1, expuestos a diferentes concentraciones de las mezclas de metales- PM_{10} de los cuatro sitios 0 de Ecatepec.

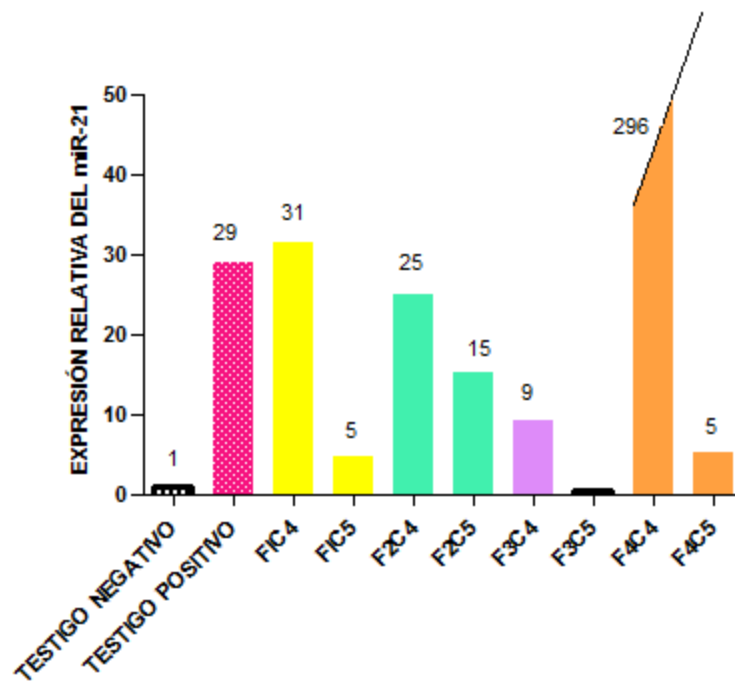


Figura 29. Expresión del miR-21 en los infocitos periféricos humanos del donador 2, expuestos in vitro a diferentes concentraciones de metales de las PM₁₀.

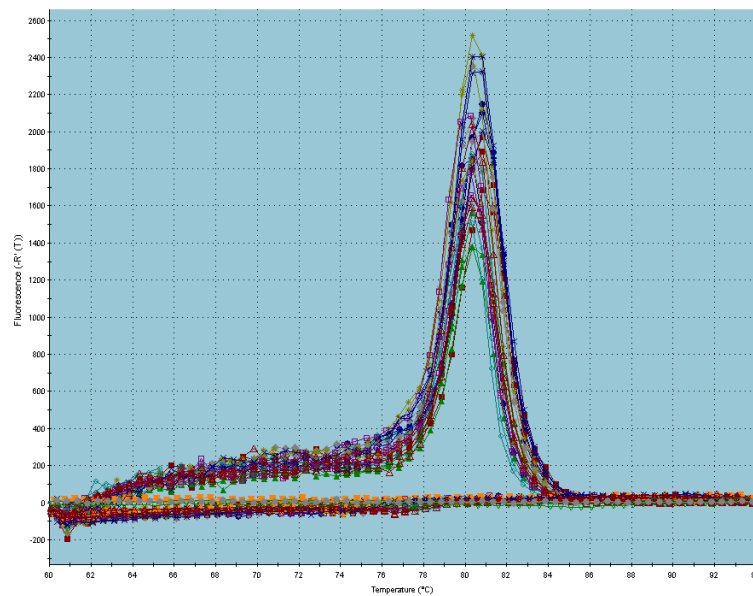


Figura 30. Curva de disociación del miR-21.

IX.IV. Citotoxicidad *in vitro* en los LPH expuestos a las mezclas de MP de las PM₁₀ de cuatro sitios de Ecatepec, Estado de México

En experimentos preliminares, los LPH fueron expuestos a diferentes tiempos (2, 4 y 24 horas) y a distintas diluciones de las mezclas de MP para evaluar su viabilidad mediante la tinción de exclusión con Azul Tripano. Después de varios tratamientos, se obtuvieron las concentraciones adecuadas de las mezcla de MP de los cuatro sitios que no disminuyeran significativamente la viabilidad celular $\geq 80\%$, pero que produjeran significativamente daño al ADN en LPH por 2 horas, concentraciones que fueron aplicadas en tres experimentos independientes (Tabla III).

IX.V. Identificación y cuantificación de MP

El cuadro I, muestra los diez metales cromo (Cr), aluminio (Al), níquel (Ni), cadmio (Cd), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), vanadio (V), cobalto (Co) y plomo (Pb), identificados en las mezclas de MP de las PM₁₀ del aire urbano de las cuatro zonas de colecta por 24 horas y la concentración total e individual de cada uno por sitio. Estos datos representan lo que se respira en 1 m³ de cada metal por μg . En las cuatro mezclas, los metales que de mayor concentración son el aluminio, hierro y vanadio. La concentración más elevada ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de cada metal entre los cuatro sitios es la siguiente: en la mezcla F1: plomo y manganeso; F2: aluminio, vanadio y níquel; F3: hierro, cobalto, y cobre; y F4: cromo y cadmio. La zona del sitio 2 es en la que se respira la mayor cantidad total de metales ($624.04 \mu\text{g}/\text{m}^3$) que los otros sitios (Cuadro I). De acuerdo a los estudios preliminares de citotoxicidad realizados para cada mezcla, se eligieron las concentraciones

($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por mezcla de metales que indujeran daño significativo en el ADN en los LPH *in vitro*. Si bien, los LPH fueron expuestos a cuatro mezclas de MP, se calculó por cada metal y por sitio las concentraciones en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la C1-C5 utilizadas en los tratamientos a las que fueron expuestas los LPH *in vitro* (figuras 31-40).

Cuadro I. Concentraciones promedio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de metales de un periodo de colecta de 24horas.

SITIO/METALES	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb	V	Al	Co	Cu	Fe	TOTAL DE METALES
F1	0.20	3.18	3.05	5.81	9.09	14.20	214.40	6.60	7.33	98.80	362.65
F2	0.21	0.62	1.14	7.09	6.83	19.26	409.38	5.26	10.14	164.12	624.04
F3	0.10	2.39	1.68	4.26	3.58	16.07	318.83	7.13	13.93	171.40	539.38
F4	0.23	3.28	2.90	5.25	7.35	4.34	120.37	5.12	11.07	121.34	281.24

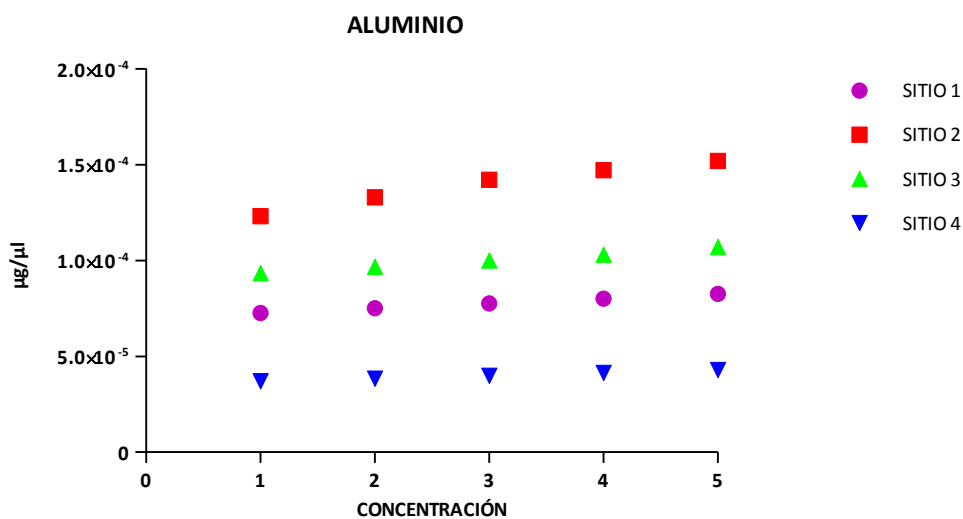


Figura 31. Concentraciones de aluminio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos *in vitro* de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

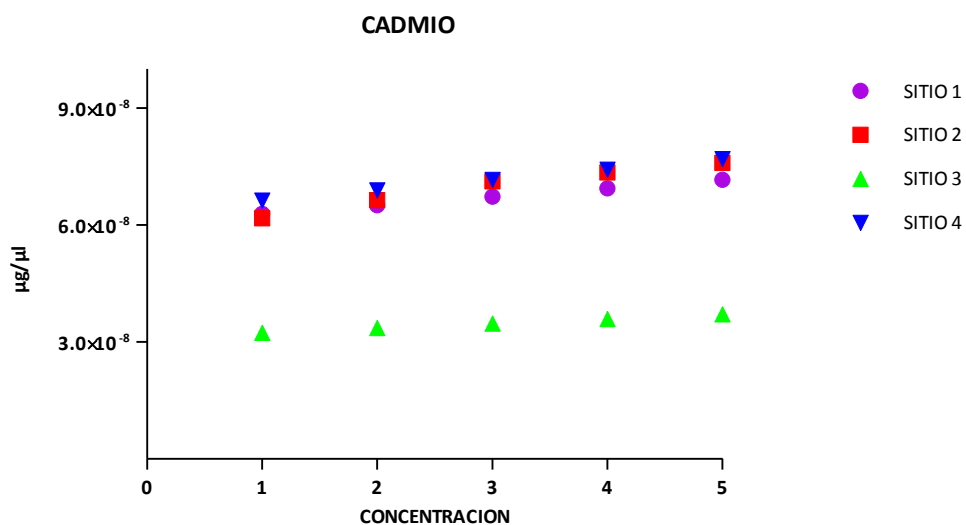


Figura 32. Concentraciones de cadmio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

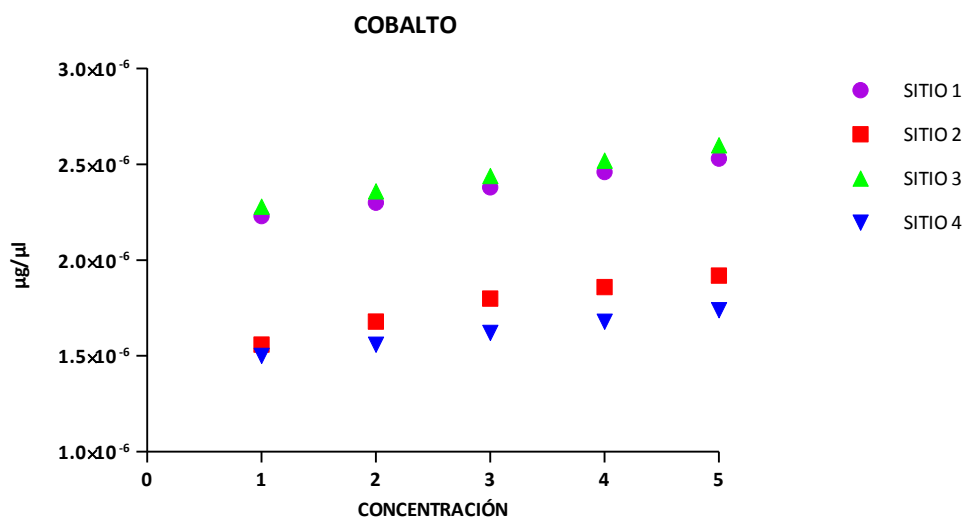


Figura 33. Concentraciones de cobalto ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

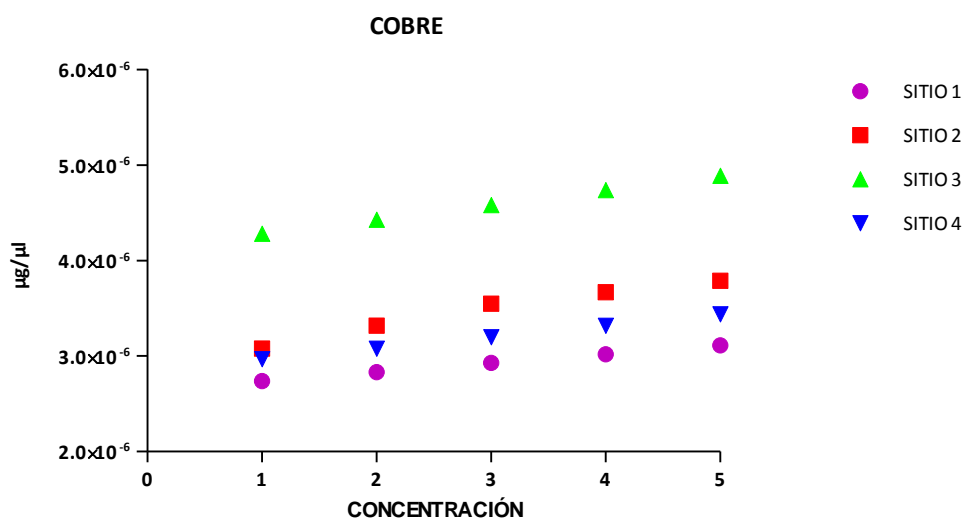


Figura 34. Concentraciones de cobre ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

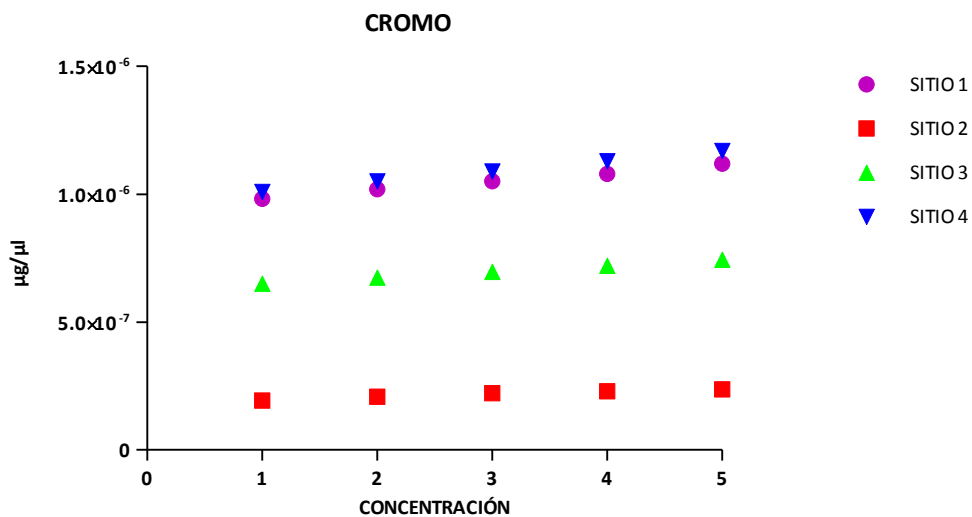


Figura 35. Concentraciones de cromo ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

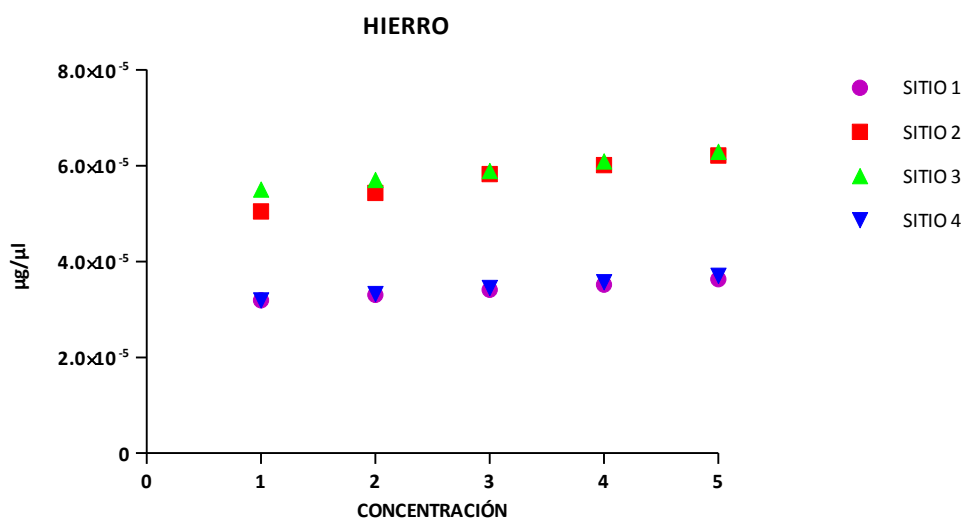


Figura 36. Concentraciones de hierro ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

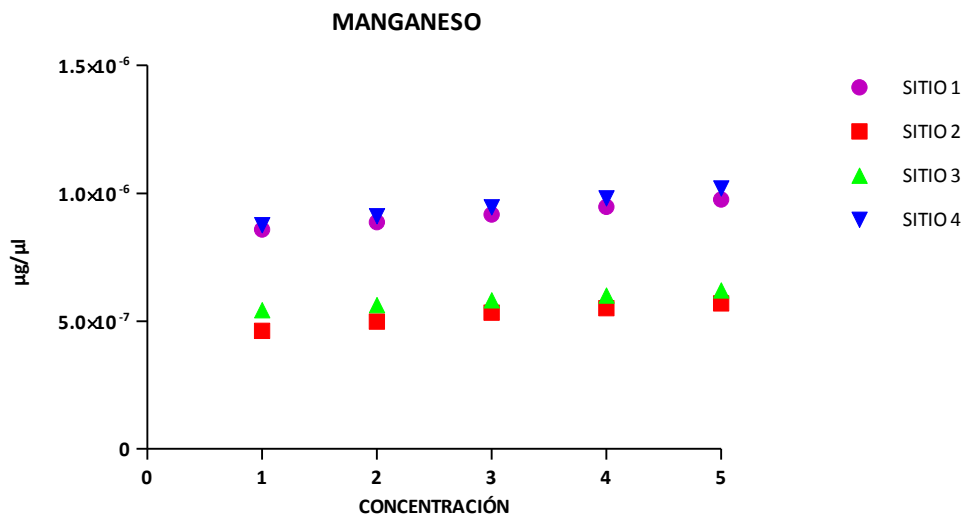


Figura 37. Concentraciones de manganeso ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

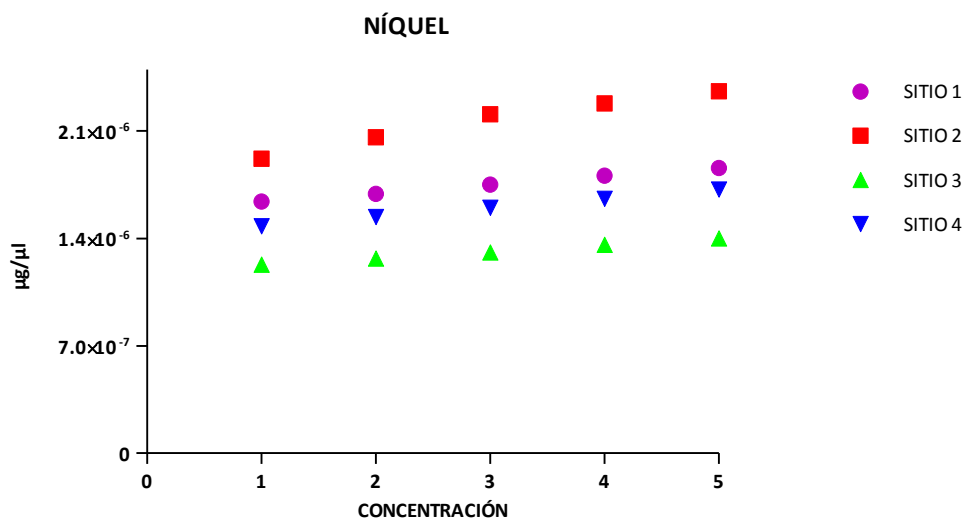


Figura 38. Concentraciones de níquel ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

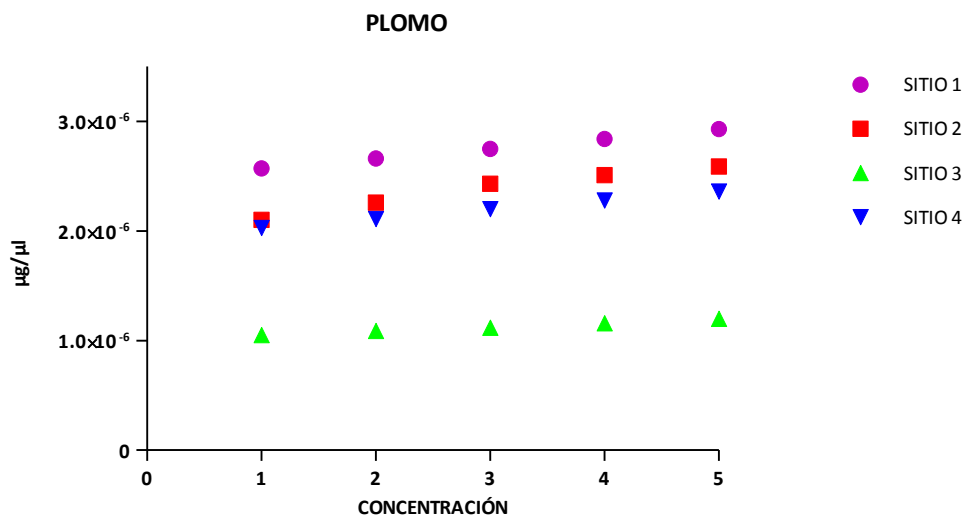


Figura 39. Concentraciones de plomo ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes.

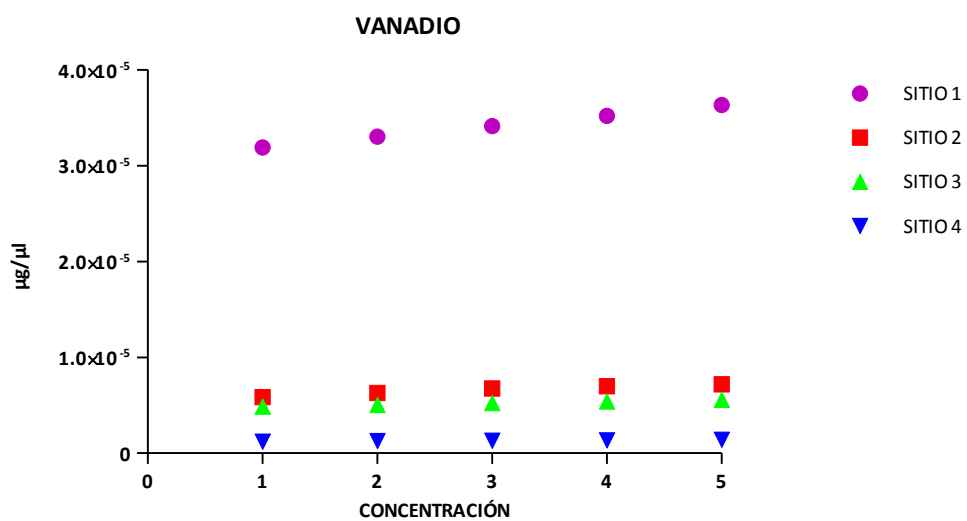


Figura 40. Concentraciones de vanadio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) halladas en los cinco tratamientos in vitro de los cuatro sitios de colecta a las que fueron expuestos los linfocitos periféricos humanos en tres experimentos independientes..

X. DISCUSIÓN

De acuerdo al informe de la Calidad del Aire de la Ciudad de México, la ZMVM, supera los niveles máximos permitidos de las PM_{10} siendo el Estado de México una de las zonas con mayor concentración de aeropartículas. A pesar del efecto negativo que tiene la exposición prolongada de las $PM_{2.5-10}$ en la salud, existen pocos trabajos que evalúen sus efectos genotóxico, citotóxico y epigenético.

Diversas investigaciones han comprobado que las $PM_{2.5-10}$ producen estrés oxidante, fragmentación en el ADN, procesos proinflamatorios y apoptosis en diversas líneas celulares humanas (Alfaro et al., 2002; Osornio-Vargas, 2003; Quintana et al., 2011; Motta et al., 2012). En modelos animales se ha comprobado que la exposición a partículas con hierro, vanadio, níquel, zinc, manganeso, aluminio, silicio, cobre aumenta el estrés oxidante y la formación de edemas en órganos blancos como los pulmones y el corazón (Fortoul et al., 2011; Ahmed et al., 2012; Kamigaito et al., 2012; Zhong et al., 2012). La exposición ambiental y ocupacional en los seres humanos está relacionada con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, respiratorias y cáncer (Gurgueira et al., 2002; Beveridge et al., 2010).

El uso de marcadores biológicos permite saber si existe riesgo a la salud por exposición a genotóxicos ambientales tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), plaguicidas y MP (Calderón-Segura et al., 2004; 2007; Rodríguez-Romero et al., 2012; Carreras et al., 2013). Actualmente están disponibles varios biomarcadores de exposición y de efecto para evaluar los posibles daños genotóxicos y

epigenéticos de los agentes químicos ambientales, los cuales se basan principalmente en pruebas como el ICH, AC, la formación de MN, el ensayo cometa, la metilación del ADN, la metilación de histonas y los microRNAs, entre otros.

El ensayo cometa alcalino es eficaz para detectar fragmentación del ADN y en comparación con otras pruebas citogenéticas como las anteriormente mencionadas, es una prueba muy rápida para evaluar agentes genotóxicos ambientales, ya que no requiere de células en proliferación, es aplicable a cualquier célula eucariota y en poco tiempo se obtienen resultados con gran reproducibilidad (Tice et al., 2000; Speit y Hartmann, 2002).

La evaluación en la expresión de los microRNAs es una prueba que permite evaluar el daño en el genoma a nivel epigenético por agentes ambientales en poblaciones o células expuestas (Sonkoly y Pivarcsi, 2011). Entre los 1000 que se han identificado, el miRNA-21 es conocido como onco-miR, debido a que se ha encontrado sobre-expresado en células humanas de personas laboralmente expuestas a contaminantes ambientales y en tumores de estómago, próstata entre otros (Lu et al., 2009).

En el presente estudio se evaluaron los efectos genotóxicos, epigenético y citotóxico de los metales asociados a PM_{10} del aire de cuatro sitios de colecta (F1-F4), en Ecatepec del Estado de México en los LPH *in vitro* de dos donadores masculinos y de la misma edad. Las mezclas de metales de los cuatro sitios de colecta incubados a los LPH *in vitro* produjeron significativamente daño en el ADN con relación al testigo negativo, reflejado en la formación diferencial de cometas, en la longitud y en momento de la cauda. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Alfaro-Moreno y colaboradores (2002),

quienes evaluaron el potencial genotóxico de muestras de PM_{10} de la zona norte (industrial), centro (comercial) y sur (residencial) de la Ciudad de México colectadas durante un año (1991). En este estudio se observa que todas las muestras de metales- PM_{10} inducen aumento significativo en la fragmentación del ADN en leucocitos *in vitro*. La zona industrial con niveles elevados de metales de transición y sulfuros produjo mayor daño al ADN en leucocitos en cultivo que la zona centro. También evidencian que la zona centro con mayor concentración de endotoxinas aumenta la secreción de citocinas IL-1 β y el TNF- α que las otras zonas de estudio.

Osornio-Vargas y colaboradores (2003) encontraron efectos biológicos diferenciales en las muestras colectadas de PM_{10} y $PM_{2.5}$ en la temporada de secas (marzo a mayo) del 2000 de la zona sureste (Iztapalapa) y norte (Gustavo A. Madero) de la Ciudad de México. Las partículas del norte con elevadas concentraciones de cobre, zinc, níquel y plomo producen mayor incremento de apoptosis que las del sur, mientras que las PM_{10} del sur con gran contenido endotoxinas aumentan la producción de citocinas pro-inflamatorias. En el 2006, Quintana y colaboradores (2011), como parte de la campaña MILAGRO (Megacities Initiative: Local and Global Research Observations), reportaron degradación *in vitro* del ADN en células BALB/c3T3 y lisis de glóbulos rojos con 80 μ g/mL-I de PM_{10} .

X.I. Genotoxicidad

Los resultados genotóxicos obtenidos de los dos donadores jóvenes del mismo sexo y edad muestran que los valores de los parámetros del ensayo cometa están influidos por

la concentración y la acción oxidante de metales pesados de cada mezcla (F1-F4), los cuales intervienen en la expresión diferencial del daño en el ADN de los LPH *in vitro*.

Las mezclas de metales F1-F4 a concentraciones menores en los donadores (D1 y D2) no inducen modificaciones en los tres parámetros genotóxicos comparados con sus testigos negativos (LPH sin metales). En los LPH del donador 1, la mezcla F2 induce mayor frecuencia de cometas, longitud y momento de la cauda que la F1, F3 y F4, mientras que en los LPH del donador 2 fue la F1 la más genotóxica que la F2, F3 y F4. Probablemente, esta variación se deba a la acción aditiva, sinérgica o antagónica de cada metal en la mezcla metales-PM₁₀ y a la sensibilidad diferencial de los LPH de cada donador. En estas mezclas, es notable que los metales con mayor concentración son el aluminio, hierro y el vanadio, sobresaliendo en la C5 de la F2 el contenido doble de aluminio ($1.52 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y de hierro ($6.21 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) comparado con la F1, mientras que en la F1 hay cinco veces más vanadio ($3.63 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) que en la F2.

La F3 y F4 en ambos donadores aumentaron de manera similar en los tres parámetros genotóxicos comparados con el testigo negativo, posiblemente por tener menor contenido de aluminio (1.07×10^{-4} y $4.29 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente), níquel (1.4×10^{-6} y $1.72 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente) y vanadio (5.59×10^{-6} y $1.41 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente), que la F1 y F2.

Como se ha mencionado, la dominancia de aluminio, hierro, vanadio y plomo en cada mezcla, podría ser determinante en su acción genotóxica en las células sanguíneas humanas. De acuerdo a los resultados, el donador 1 tuvo mayor frecuencia de cometas

(91) con la exposición a la mezcla de metales del sitio 2 que el donador 2. Probablemente, los LPH del donador 1 sean más susceptibles a las acciones del aluminio y del níquel. Los LPH de ambos donadores tuvieron respuesta genotóxica similar (83) a los MP del sitio 1 (FIC5), donde hay más plomo y vanadio que en los otros sitios analizados.

Quizás, otro factor adicional está en los mecanismos de producción de EROs y ERNs de cada metal, que revela la acción genotóxica de las mezclas individuales en LPH *in vitro*, así como la inducción diferencial del daño oxidante y la fragmentación del ADN (Cooke et al., 2003) o a la competencia del aluminio, plomo, hierro y níquel por los sitios de unión a los canales de Ca^{2+} , lo que altera la homeostasis del Ca^{2+} y consecuentemente aumenta el influjo de este ion hacia el citosol y al núcleo y los niveles de la EROs, afectando la integridad del genoma (Achary et al., 2013).

Es conocido que el mecanismo general de genotoxicidad de los metales es mediante la producción de EROs y ERNs, que provocan rompimientos de cadena sencilla, doble y oxidaciones de las bases del ADN, principalmente el radical OH- producido por los metales se une a los carbonos C5 y C6 al extraer un átomo de H del grupo metilo de la timina (T) y citosina (C) (Cooke et al., 2003). En ausencia de oxígeno, se adiciona un OH- en el C5-OH de estas bases formando timina y citosina-glicol. En las purinas (adenina y guanina), el OH se une al C4, C5 y C8 de la G, siendo el principal producto el aducto 8-hidroxi-guanina. También, este radical puede unirse al C-H de la 2-desoxirribosa y provocar rompimientos en el ADN (Cooke et al., 2003, Rodríguez-Romero et al., 2012). La mayoría de las bases oxidadas son eliminadas por glucosilasas de ADN, enzimas de reparación por escisión de bases (BER) tales como: NTH1, OOG1, NEIL1 y NEIL2. La

NTHI repara timinas y citosinas oxidadas, NEIL1 y NEIL2 regulan la oxidación de la citosina (5-OH-Ura). Otras enzimas como la glicosilasa 5-hidroximetiluracilo de ADN repara rompimientos de cadena sencilla y doble; la UNG remueve uracilos incorporados erróneamente o citosinas desaminadas en los rompimientos del ADN, mientras que SMUG1 remueve 5-OMPUra por complementariedad con G o A (Cooke et al., 2003).

Algunos metales como el cobalto, cobre y hierro por ser esenciales para el metabolismo celular, entran fácilmente. Sin embargo, a niveles elevados aumentan la producción de EROs (Puig y Thiele, 2002). Los metales catiónicos como el cadmio, el cromo y el manganeso pueden entrar a la célula por el transportador de cationes bivalentes I (DCT1) o en el caso del Cr (VI) por el sistema de transporte de aniones. La presencia de estos transportadores activa su paso intracelular, con lo que se incrementa la generación de $\cdot\text{OH}$, disminuye la actividad de la SOD y la CAT, se rompe la homeostasis celular y es dañado el ADN (Jomova y Valko, 2011). Otros metales no generan directamente EROs, como es el caso del níquel, pero al entrar al citosol y al núcleo ya sea por transportadores de Ca^{2+} por el transportador divalente (Nramp 2), por difusión (compuestos solubles) o por vesículas fagocíticas (compuestos insolubles) forma complejos con diversos ligandos que producen radicales $\cdot\text{OH}$, los cuales interactúan con el ADN y las histonas (Jeong-Chae, 2012).

También el hierro a concentraciones elevadas causa fragmentación del ADN mediante estrés oxidante al interactuar con el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton. Asimismo, el plomo y el hierro pueden oxidar los grupos SH- de diversas proteínas en especial la metalotioneínas, que se encargan de capturar a los

metales pero cuando ya no capturan iones o metales alteran la homeostasis del calcio, lo cual se ve reflejado en el daño en el ADN.

La oxidación de las bases del ADN es una de las consecuencias del aumento en la producción de EROs por exposición a los metales. La producción de EROs como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxidos y peroxilnitritos (ONOO^-) que se producen con el plomo, también rompen el balance pro/antiapoptótico entre los genes Bax/Bcl2, desencadenando la señalización de la apoptosis vía caspasas y alteración funcional de la mitocondria (Banfalvi et al., 2012).

Asimismo, se ha visto que el aluminio actúa de forma sinérgica con el hierro para aumentar la cantidad de EROs. El aluminio interfiere en la cadena de transporte de electrones y genera la acumulación del O^{2-} , el cual se transforma a H_2O_2 e interactúa con el hierro alterando las funciones de la mitocondria y las rutas de los factores NF-kB, p53, JNK provocando apoptosis (Wu et al., 2012).

Tal vez, otro mecanismo de daño en el genoma de las células humanas inducido *in vitro* por los metales (Al, Cu, Mn, Ni, Cd, Cr y Pb), es por alteración estructural de las proteínas que contienen dedos de Zn como la familia de las proteínas poli (adenosindifosfato (ADP)-ribosa) polimerasas (PARP), las cuales intervienen en la reparación de rompimientos de cadena sencilla (SSBR) y por escisión de bases (BER). El cambio de conformación por los metales provoca supresión de la expresión del gen ligasa durante la reparación de las bases (BER), como se ha demostrado en trabajos *in vitro* con aluminio y plomo (Grin et al., 2009). En exposiciones *in vitro* con Al (III), Ni (II), Pb (II), Co

(II), Cd (II), Cu (II) y Fe (II), la actividad de la NEIL1 disminuye notablemente (Grin et al., 2009). También se ha evidenciado que el Al (III), el Cu (II) y el Fe (II/III) pueden cambiar la estructura de las enzimas de reparación como la NEIL1 y NEIL2 e inhibir la eliminación de las bases oxidadas como la 5-hidroxiuracilo (Lankoff et al., 2006; Wu et al., 2009; Hegde et al., 2010).

Otras enzimas como las XPA con dedos de zinc que reparan nucleótidos y las cinasas polinucleotídicas bifuncionales (PNK), reparan rompimientos de cadena doble mediante la unión de extremos no homólogos (tienen actividades de término semi-independientes 5'-cinasa y 3'-fosfatasa), pueden ser inhibidas por cadmio y cromo (Whiteside et al., 2010).

Se ha comprobado que el cadmio interviene de forma reversible en la actividad de otras enzimas de reparación como en el heterodímero MSH2-MSH6, mientras que su inhibición es irreversible en la OGG1, la cual está involucrada en la reparación por escisión de bases de la 8-oxoguanina (Banerjee y Flores-Rozas, 2005). Exposiciones a cobre y hierro no inhiben a la OGG1. Sin embargo, la acción sinérgica del cadmio y del cobre a elevadas concentraciones (>5mM) si la inhiben (Hegde et al., 2010).

Por otra parte, el sistema antioxidante endógeno (superóxido dismutasa, glutatión), de cada donador también juega un papel muy importante en la disminución del estrés oxidante y en la reparación del genoma dañado. Se ha observado que en presencia de níquel, se activa la Tioredoxina reductasa I (Trr1) para controlar el aumento de la

concentración de EROs intracelular. Sin embargo, cuando esta enzima no funciona eficientemente, aumenta la fragmentación del ADN (Kim y Seo, 2011).

La exposición a Co (II) provoca disminución de ascorbato intracelular, el cual es necesario para la quelación de iones de cobre en exceso, por lo que este metal puede contribuir a la pérdida del control oxidante (Jeong-Chae et al., 2012). De igual forma la dieta es determinante para tener buena capacidad antioxidante no enzimática como las vitaminas C y E entre otras, para contrrestar el estrés oxidante (Jomova y Valko, 2011).

La vitamina E es un antioxidante que puede disminuir drásticamente la acumulación del hierro y evitar la formación de EROs. Esta vitamina reduce el efecto oxidante del aluminio al evitar la acción sinérgica entre estos metales para la producción de EROs (Wu et al., 2012). El consumo de antioxidantes como catequinas, flavonoides, polifenoles ayuda a disminuir del daño oxidante por EROs más rápido vía transferencia de electrones (Zheng et al., 2010).

Cabe resaltar que de los tres parámetros evaluados en el presente trabajo, el momento de la cauda es considerado uno de los más adecuados para medir el daño al ADN. Dicho parámetro relaciona la migración y la cantidad relativa del ADN en la cauda (Hellman et al., 1995; Lee et al., 2004). De acuerdo a los resultados, ambos donadores presentaron mayor momento de la cauda inducida por la mezcla de MP, comparado con su testigo negativo, con una respuesta de concentración–efecto. Estos resultados confirman que los LPH del donador 1 fueron más susceptibles al daño causado por la exposición a la mezcla del sitio 2 que los sitios 3 y 4. El donador 2 parece ser más

susceptible a la exposición de la mezcla de metales del sitio I. La variación en este parámetro genotóxico en los linfocitos de ambos donadores hacia la mezcla de metales se ve reflejada en las diferencias en el número y tamaño de los fragmentos de la cauda. Esta respuesta podría indicar que se pueden afectar distintos sitios del ADN y se puede estar acentuando el daño por la acción aditiva o sinérgica de los metales contenidos en las mezclas.

Aunque ambos donadores son sanos, de la misma edad y sexo, y no ingieren bebidas alcohólicas, ni son fumadores, la respuesta genotóxica diferencial a la exposición de la mezcla de metales podría ser a múltiples factores como la dieta, el polimorfismo genético y el estilo de vida.

X.II. Expresión del miR-21 en los LPH expuestos *in vitro* a mezclas de MP

El miR-21 es uno de los factores pos-transcripcionales que se ha asociado al control de proliferación celular, por lo que su sobre-expresión está relacionada a desórdenes como la hipertrofia cardíaca y distintos tipos de cáncer como de mama, colón, pulmón, páncreas, próstata y estómago (Gumireddy et al., 2008).

A pesar de que se ha comprobado que la exposición a metales provocan efectos epigenéticos como la metilación de histonas y del ADN (Arita y Costa, 2009), existen pocos trabajos que evalúen el cambio en la expresión de los miRNAs por los metales asociados a PM_{10} . Exposiciones crónicas al óxido de Arsenio III (As_2O_3) conocido como Arsenita inducen aumento en la producción de EROs y sobre-expresión del miR-21 en

fibroblastos humanos de pulmón embrionario (HELFL) y alteraciones morfológicas (Li et al., 2012; Ling et al., 2012).

Bollati y colaboradores (2010) descubrieron correlación positiva entre la sobre-expresión del miR-21, sobre-producción de EROs y de aductos 8-OHdG en cultivo LPH de trabajadores expuestos a cromo, plomo, cadmio, arsénico, níquel y manganeso. Zhang y colaboradores (2012) encontraron relación entre la sobre-producción de EROs y la sobre-expresión del miR-21, con disminución en la actividad antioxidante de la superóxido dismutasa 3 (SOD de pulmón) e indirectamente a la superóxido dismutasa 2 (SOD de mitocondria) limitando la producción del TNF α .

De acuerdo a los resultados, la expresión relativa del miR-21 en los LPH *in vitro* tuvo relación con el efecto genotóxico ya que a mayor frecuencia de cometas mayor expresión del miR-21 cometa y viceversa. Este biomarcador epigenético también se expresó diferencialmente entre los donadores con relación a la concentración de las mezclas de metales de los cuatro sitios analizados. Los LPH del donador 1 (Fig. 28) tuvieron mayor expresión del miR-21 que el donador 2 (Fig. 29). Al igual en el biomarcador de daño al ADN, estas diferencias entre los donadores podrían deberse a diversos mecanismos moleculares como la respuesta hacia el estrés oxidante y consecuentemente la sobre-expresión del miR-21. Quizás algunas de las señales de dicha respuesta oxidante active en los LPH la producción del TNF-alfa, TGF-beta y NF-k β para modular el daño al genoma y la apoptosis (Wullaert et al., 2006).

Es conocido que la zona promotora del miR-21 tiene sitios de unión a factores como el NF- κ B y cuando hay elevada concentración de EROs, se activa este factor de transcripción disminuyendo los niveles del TGF-beta pero aumentando la sobre-expresión del miR-21 para inhibir la apoptosis (Ando et al., 2013), como se observó en las concentraciones que indujeron mayor daño al ADN por las mezclas de metales. Cuando los LPH se incubaron a concentraciones elevadas de las mezclas de MP, la “aparente” disminución del daño al ADN y la baja en la expresión del miR-21, quizás se deba a la inducción hacia la muerte celular o la apoptosis, evidenciado por el gran el porcentaje de núcleos apoptóticos. Se ha comprobado que la arsenita incrementa la fosforilación y activación de la ruta MEK/ERK, lo cual activa al NF- κ B, provoca la translocación y unión de este factor al ADN y la fragmentación del genoma (Ling et al., 2012). Es probable que otros mecanismos moleculares intervengan en la activación de la transcripción del miR-21 evidenciado con la sobre-expresión de este biomacardor en los LPH *in vitro* inducido por la mezcla de MP o a la inducción en la expresión de la enzima Drosha durante la síntesis del Pre-miRNA o quizás como consecuencia de la metilación de histonas y del ADN (Arita y Costa, 2009; Martínez-Samudio y Chol, 2011).

Los resultados del presente trabajo de investigación demuestran que la mezcla de MP de las PM₁₀ de cuatro sitios de colecta en Ecatepec , Estado de México no sólo inducen daño al ADN de los LPH sino también intervienen en la modulación de la expresión de microRNAs como el miR-21, quizás ambos eventos moleculares podrían estar relacionados con los procesos pro-inflamatorios por el aumento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF-alfa, las interleucinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y la

activación del factor EGFR, los cuales asociados con desarrollo a diversas enfermedades autoinmunes y cáncer (Mathé et al., 2012).

X.III. Concentración y tipos de los metales en las mezclas obtenidas de cuatro sitios en el aire urbano de Ecatepec

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que una cuarta parte de las enfermedades cardiovasculares y respiratorias que se presentan actualmente se deben a la exposición prolongada a los contaminantes del aire urbano (Sonkoly y Pivarcsi, 2011). De acuerdo a los límites recomendados por la OMS y la USEPA las concentraciones de cadmio, cromo, manganeso y plomo de las mezclas de metales de los cuatro sitios de Ecatepec analizadas en el presente trabajo sobrepasan los límites debido a las emisiones del elevado tráfico vehicular y a la gran actividad industrial, ya que se tienen registradas aproximadamente 386 industrias. Cabe destacar que para el aluminio, hierro, vanadio y cobre no se tienen límites máximos establecidos.

WHO (Guidelines for Air Quality), en Ginebra, Suiza (2000), publica que el límite permisible de metales asociados a las partículas totales en peso seco, son para el cadmio: $0.0050 \mu\text{g}/\text{m}^3$, cromo: $0.11 \mu\text{g}/\text{m}^3$; manganeso $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y plomo: $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y de acuerdo a la USEPA (Regulations and Guidelines Applicable, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) (2002) para el cadmio ($0.00637 \mu\text{g}/\text{m}^3$), cromo ($0.10 \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y plomo ($1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Ahumada et al., (2007), reportan para la Ciudad de México concentraciones de cadmio ($1.608 \mu\text{g}/\text{m}^3$), cromo ($0.07 \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0.074 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y plomo ($0.136 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en $\text{PM}_{2.5}$.

Henriquez et al. (2010), publican en promedio $37.97 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ con manganeso ($13.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$), plomo ($23.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y vanadio ($2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en las ciudades de Santiago y en Concepción, Chile $14.14 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ con manganeso ($3.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) plomo ($5.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$), vanadio ($2.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en primavera e invierno (2008). Dongarrá et al. (2010), detectan cromo ($0.0079 \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0.0039 \mu\text{g}/\text{m}^3$), plomo ($0.00101 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y vanadio ($0.001 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en partículas PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ del aire urbano de la Ciudad de Palermo, Italia en Noviembre 2006 a febrero 2008. Nazir et al. (2011), identifican concentraciones de cadmio ($0.02292 \mu\text{g}/\text{m}^3$), cromo ($0.088 \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0.09364 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y plomo ($1.3474 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en $235.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ partículas TSP (Total de partículas en peso seco) de la Ciudad de Wah Cantt, Pakistan en Octubre 2008 a mayo 2009. Hieu y Lee, (2010), en la Ulsan, Korea reportan $50.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ y PM_{10} con cadmio ($0.0011 \mu\text{g}/\text{m}^3$), cromo ($0.0037 \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0.0063 \mu\text{g}/\text{m}^3$), níquel ($0.0109 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y plomo ($0.0495 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en abril y cadmio ($0.0021 \mu\text{g}/\text{m}^3$), cromo ($0.0058 \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0.0182 \mu\text{g}/\text{m}^3$), níquel ($0.0047 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y plomo ($0.098 \mu\text{g}/\text{m}^3$) en agosto 2008. De acuerdo a las Agencias Internacionales de Investigación en Cáncer (IARC)), los niveles permisibles de cadmio y cobalto no deben sobrepasar los $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, sin embargo en el estudio de Hengstler y colaboradores (2003) en trabajadores expuestos a plomo, cadmio y cobalto, a concentraciones mayores a $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ mostraron correlación positiva entre los niveles de metales y el aumento en los rompimientos de cadena sencilla del ADN.

Aún cuando no existen muchas evidencias científicas sobre los mecanismos de regulación de la expresión de microRNAs y su asociación con el daño al genoma humano, muchas investigaciones han mostrado que los LPH podrían responder con diversos

mecanismos moleculares contra la exposición a xenobióticos. Varios mecanismos son propuestos tales como la interferencia en la apoptosis, incremento en la reparación del ADN y del sistema antioxidante endógeno contra las EROS y radicales libres, señalización de factores de traducción, repoblación celular y respuestas inmunológicas, entre otras. Sin embargo, la exposición constante al material particulado podría producir la acumulación de lesiones en el ADN que si no son reparadas puede iniciarse un proceso de carcinogénesis y eventualmente el desarrollo de tumores (Burdick et al., 2003; Briedé et al., 2004; Marczyński et al., 2009). Las implicaciones y consecuencias adversas para la salud dependen de varios factores como la susceptibilidad individual, la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, la activación e inactivación de múltiples proteínas, los niveles antioxidantes endógenos y el estilo de vida (fumar, consumo de alcohol, tipo de dieta, entre otros) (Wiseman et al., 1995; Hsiao et al., 2000).

Finalmente, esta investigación con la aplicación de dos biomarcadores a niveles genético y epigenético demuestra que los metales pesados asociados a PM_{10} alteran el genoma humano, eventos asociados a desarrollar enfermedades en estados iniciales incluyendo el cáncer.

XI. CONCLUSIONES

Con base a los resultados se concluye:

1) Las cuatro mezclas de MP asociados a las PM_{10} de Ecatepec producen efectos genotóxico y epigenético en los LPH *in vitro* de dos donadores (jóvenes sanos y de la misma edad) evidenciados por el aumento significativo de los promedios de la frecuencia de cometas, en la longitud y momento de la cauda, y expresión del miR-21 respectivamente con una respuesta de concentración-efecto.

2) La concentración diferencial de los 10 metales encontrados en las mezcla de los cuatro sitios indujeron distinto daño. La mezcla F2 produce mayor daño al genoma de las células humanas que la F1, F3 y F4 en ambos donadores. Esto demuestra que no sólo la composición sino la cantidad de los MP son determinantes para el daño que pueden ocasionar.

3) La expresión relativa del miR-21 fue mayor con la mezcla F3 en los LPH del donador 1 que $F4 < F2 < F1$. Probablemente porque en dicha mezcla hay más Co, Cu y Fe, metales que aumentan la producción de EROs por reacción de Fentón. Dicha producción puede estar incrementada por el Al, ya que este sitio es el segundo lugar que reportó concentraciones altas de Al.

4) La expresión relativa del miR-21 fue mayor con la mezcla F4 en los LPH del donador 2 que la $F1 < F2 < F3$. Quizás, la cantidad del Cr y Mn que sobresalen en esta mezcla aumenten la producción de EROs por reacción de Fenton. Además, este sitio tuvo la mayor cantidad de Cd, el cual, al no tener una ruta de excreción, incrementa el daño en las células.

5) El ensayo cometa y el microRNA miR-21 son biomarcadores que demuestran las acciones genotóxica y epigenética, respectivamente, en los LHP expuestos *in vitro* a

metales pesados que se encuentran en la atmósfera Ecatepec Estado de México y apoyan que son riesgo potencial para la salud humana, animal y vegetal.

XII. ANEXO I. Abreviaturas utilizadas en el escrito

8-OHdG	Aducto de ADN, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.
AC	Aberraciones cromosómicas
Akt	Proteína cinasa específica serina/treonina, es un oncogen.
ALAD	Deshidrogenasa ácido deltaamino-levunílico.
AP-1	Factor de transcripción heterodimérico formado por c-Fos y c-Jun.
ATF-2	Factor de transcripción activador-2.
ATPasas	Proteínas que hidrolizan el adenosina trifosfato a adenosina difosfato.
BAD	Proteína proapoptótica, “ promotora de la muerte”.
BALB/c3T3	Línea celular de fibroblasto de embrión de ratón.
BAX	Regulador de apoptosis, proteína proapoptótica.
Bcl2	Proteínas antiapoptóticas, regulan la permeabilidad de la mitocondria en células B de linfoma 2.
Bcl-xL	Proteínas de la familia de Bcl2 en células B de linfoma 2.
BER	Reparación por escisión de bases.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario.
DMT1	Transportador I de metales divalentes.
EGFR	Receptor del factor crecimiento epidérmico.
ERK	También conocida como MAPK, proteínas extracelular con un receptor intracelular de ADN. Son proteínas (Serina-treonina) cinasas activadas por mitógenos.
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno.
EROs	Especies Reactivas de oxígeno.
EZH2	Potenciador de zeste homólogo 2.

GR	Enzima antioxidante, glutatión reductasa.
GSH	Enzima antioxidante, glutatión superóxido dismutasa.
HELFL	Células de fibroblasto de pulmón de embrión humano.
HL60	Línea celular de leucemia mieloide aguda.
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IL-1 β	Interleucina 1-beta.
IL-6	Interleucina 6.
JNK	Cinasas que unen y fosforilan a la proteína c-Jun a los residuos de Serina 63 y 73 (dominio de activación transcripcional).
K562	Línea celular de leucemia mieloide crónica.
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos.
MMP-PM10	Mezcla de metales pesados asociados a la materia particulada de igual o menor tamaño de 10 μ m de diámetro.
MN	Micronúcleos
MP	Metales pesados.
MTs	Metalotioneinas.
NF κ B	Factor de transcripción nuclear, potencia la activación de las cadenas ligeras kappa B.
OGG1	Enzima ADN-glicosilasa, 8-Oxoguanina glicosilasa.
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa, proteínas involucradas en la reparación del ADN.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PDCD4	Proteína supresora de muerte celular programada 4.
PGE ₂	Prostaglandina E2.
PM10	Materia particulada de igual o menor tamaño a 10 micrómetros.
PNK	Cinasa polinucleótido bifuncional.

PTEN	Proteína homóloga de fosfatasa y tensina “ fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa”.
RASSF1A	Isoforma A, gen supresor de tumores, Ras-asociación dominio de la familia I.
ROS	Especies reactivas de oxígeno o EROs.
RPMI 1640	Medio de cultivo, RPMI 1640 específico para linfocitos periféricos humanos.
SOD	Enzima antioxidante, Superóxido dismutasa.
SPH	Sangre periférica heparinizada.
SPRY1	Proteína homóloga 1, antagonista de la señalización de FGF (Factor de crecimiento de fibroblasto).
SSBR	Rompimientos de cadena sencilla
STAT3	Factor transductor de señal y activador de la transcripción 3.
TEME49	Proteína transmembranal 49.
TPM1	Tropomiosina I
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
XPA	Gen que codifica proteínas de reparación del ADN en la enfermedad “Xeroderma pigmentosum” complementaria al grupo A.

XIII. ANEXO II

- XIV. Todos los reactivos se mantuvieron en hielo cuando se prepararon las mezclas y el remanente de los reactivos del Kit se mantienen a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior.
- XV. Mezcla para la síntesis de cDNAs de acuerdo al protocolo del Kit First Strand cDNAs FERMENTAS Thermo-Scientific (clave K1612).
- XVI. Se realizaron dos mezclas, una contiene el Oligo RT del miR-16 y otra contiene el Oligo RT del miR-21. Para cada tubo se agregó:

Reactivo	Cantidad (μL)
Buffer 5X	1.5
dNTPs	0.18
Oligo RT	0.75
RT enzima (Reverse Transcript)	0.5
Ribolock (inhibidor de RNAasas)	0.1
Agua DEPC*	1.47

Los tubos con la mezcla (mix) y el ARN se colocaron en el Termociclador “Thermal cycler MJ mini” con la siguientes programación: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min y $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min

*Para preparar 1 litro de agua con dietilpirocarbonato (H_2O DEPC) se agrega 1 mL de DEPC (marca Sigma), se afora a 1 litro con agua desionizada y se agita por 1 hora mínimo y se esteriliza en el autoclave por 1 hora.

Mezcla para la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT) de acuerdo al protocolo del kit Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided (clave K0251).

Se realizaron dos mezclas, una contiene el Forward primer para miR-16 y la otra contiene el Forward primer para miR-21, ambas con Reverse U6. Para cada tubo se agregó:

Reactivo	Cantidad (μL)
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
ROX diluido*	0.04
Agua del Kit	5.96

*El ROX que se utiliza en esta reacción esta previamente diluido. Se toman 2 μL de ROX concentrado y se diluyen en 18 μL de agua inyectable.

XVII. REFERENCIAS

- Achary V. M., Parinandi N. L. y Panda B. B., 2013. Calcium channel blockers protect against aluminium-induced DNA damage and block adaptive response to genotoxic stress in plant cells. *Mutat Res.* 751: 130-138.
- Ahmed Y. F., Eldebaky H. A., Karima G. H., Mahmoud M. y Nawito M., 2012. Effects of Lead Exposure on DNA Damage and Apoptosis in Reproductive and Vital Organs in Female Rabbits. *Global Vet.* 9: 401-408.
- Alarifi S., Ali D., Suliman A. O., Ahamed M., Siddiqui M. A. y Al-Khedhairi A. A., 2013. Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. *InternatJ Nanomed.* 8: 189-199.
- Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Bonner J. C., Murray J. C., Rosas I., Ponce de León S., Osornio-Vargas A. R., 2002. Biologic Effects Induced *in Vitro* by PM₁₀ from three Different Zones Of Mexico City. *Environ Health Perspect.* 7: 715-720.
- Altman S. A., Randers L. y Rao G., 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 9: 671-674.
- Ando Y., Yang G., Kenny T. P., Kawata K., Zhang W., Huang W., Invernizzi P., f, Ridgway W., Lu Q., Gershwin M., Leung P., Lian Z., Okazaki K., Ansari A. y He X., 2013. Overexpression of microRNA-21 is associated with elevated pro-inflammatory cytokines in dominant-negative TGF- β receptor type II mouse. *J. Autoimmunity* 41:111-119.
- Andrezálová L., Gbelcová H. y Duracková Z., 2013. DNA damage induction and antiproliferative activity of vanadium(V) oxide-monoperoxido complex containing two bidentate heteroligands. *J Trace Elements in Med & Biol.* 27: 21– 26.
- Apostoli P., Kiss P., Porru S., Bonde S. P., Vanhoorne M. y ASCLEPIOS group, 1998. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. *Occup Environ Med.* 55: 364-374.
- Arita A. y Costa M., 2009. Epigenetics in metal carcinogénesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics.* 1:222-228.
- Ballatori N., 2002. Transport of Toxic Metals by Molecular Mimicry. *Environ Health Perspect.* 5: 689-694.

- Banasik A., Lankoff A., Piskulak A., Adamowska K., Lisowska H. y Wojcik A., 2005. Aluminum induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. *Environ Toxicol.* 20: 402-406.
- Banerjee S. y Flores-Rozas H., 2005. Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2–MSH6 complex. *Nucleic Acids Res.* 33:1410–1419.
- Banfalvi G., Sarvari A. y Nagy G., 2012. Chromatin changes induced by Pb and Cd in human cells. *Toxicol In vitro.* 26: 1064-1071.
- Barrera W. A., 2012. Estudio de procedencia de PM₁₀ en la zona Metropolitana de la Ciudad de México con análisis elemental con las técnicas de Pixe y Micropixe y desarrollo de modelo de receptor. Tesis de Doctorado. UNAM.
- Bhat S. H., Azmi A. S. y Hadi S. M., 2007. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol & Applied Pharmacol.* 218: 249–255.
- Bérces J., Otos M., Szirmai S., Crane-Uruena C. y Koteles G. J., 1993. Using the Micronucleus Assay to Detect Genotoxic Effects of Metal Ions. *Environ Health Perspec Supplemets.* 10: 11-13.
- Beveridge R., Pintos J., Parent M., Asselin J., y Siemiatycki J., 2010. Lung Cancer Risk Associated With Occupational Exposure to Nickel, Chromium VI, and Cadmium in Two Population-Based Case–Control Studies in Montreal. *American J Industrial Med.* 53:476-485.
- Beyersmann D., 2002. Effects of carcinogenic metal on gene expression. *Toxicol Letters.* 127: 63-68.
- Bollati V., Marinelli B., Apostoli P., Bonzini M., Nordio F., Hoxha M., Pegoraro V., Motta V., Tarantini L., Cantone L., Schwartz J., Bertazzi P. A. y Baccarelli A., 2010. Exposure to Metal-Rich Particulate Matter Modifies the Expression of Candidate MicroRNAs in Peripheral Blood Leukocytes. *Environ Health Perspect.* 118(6): 763-768.
- Bravo-Alvarez H. R. y Torres-Jardón R. J. 2002. Air pollution levels and trends in the Mexico City metropolitan area. In: Fenn M, Bauer L, Hernández T, editors. *Urban air pollution and forests: resources at risk in the Mexico City Air Basin Ecological Studies.* Vol 156. Springer-Verlag; New York: 121-159.
- Briedé J. J., Godschalk R. W., Emans M. T. G., De Kok T. M. C., Van Agen E., Van Maanen J. M. S., Van Schooten F., Kleinjans J. C. S., 2004. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo(a)pyrene metabolism. *Free Radical Res.* 38: 995-1002.

- Burdick A. D., Davis J. W., Liu K. J., Hudson L. G., Shi H., Monske M. L., Burchiel S. W., 2003. Benzo(a)pyrene quinines increase cell proliferation, generate reactive oxygen species and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63: 7825-7833.
- Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Butterworth FM., Amador-Muñoz O., 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat Res.* 558: 7-1.
- Calderón-Segura M. E., López-González L., Zúñiga-Reyes R., Sanchez-Rincón J. M., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., y Calderón-Segura M. C., Corés-Eslava J. y Molina-Alvarez B., 2007. Metabolic activation of herbicides Products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicol In Vitro.* 19: 24-37.
- Carreras H. A., Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Murillo-Tovar M. A. y Amador-Muñoz O. 2013. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. *Environ Pollution* 178: 403-410.
- Cavallo D., Ursini C., Fresegna A. Ciervo A., Maiello R., Rondinone B., D'Agatab V. y Lavicola S., 2009. Direct-oxidative DNA damage and apoptosis induction in different human respiratory cells exposed to low concentrations of sodium chromate. *J Appl Toxicol.* 30: 218–225.
- Celik H., Celik N., Kocyigit A. y Dikilitas M., 2012. The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. *Clinical Biochemistry.* 45: 1629-1633.
- Cervantes C. y Moreno-Sánchez R. (editores), 1994. Contaminación Ambiental por Metales Pesados México ISBN 968-463-093-X, pp.
- Collins A. R., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Mol Biotechnol.* 26: 249-261.
- Cooke M., Evans M. D., Dizdaroglu M. y Lunec J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB J.* 17:1195-1214.
- Chan J. A., Krichevsky M. A. y Kosik K. S., 2005. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic factor in human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* 65: 6029-6033.

- Cheng Y., Liu X., Zhang S., Lin Y., Yang J. y Zhang C., 2009. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardio.* 47: 5-14.
- Chen Y., Lin T., Chang Y., Wang Y. y Shyu H., 2010. Nickel(II)-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, G2/M. *J Toxicol & Environ. Health.* 73: 529–539.
- Chen B., Liu J., Chang Q., Beezhold K., Lu Y. y Chen F., 2013. JNK and STAT3 signaling pathways converge on Akt-mediated phosphorylation of EZH2 in bronchial epithelial cells induced by arsenic. *Cell Cycle.* 12(1): 112–121.
- Crichton R., Wilmet S., Leggsy R. y Ward R. J., 2002. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochemistry.* 91: 9–18.
- Dongarrà G., Manno E., Varrica D., Lombardo M. y Vultaggio M., 2010. Study on ambient concentrations of PM10, PM10e2.5, PM2.5 and gaseous pollutants. Trace elements and chemical speciation of atmospheric particulates. *Atmospheric Environ* 44: 5244-5257.
- Ercal N., Gurer-Orhan H. y Aykin-Burns N., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Curr Top Med Chem.* 1: 529-539.
- Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 399: 37-59.
- Flaten T. P., 2001. Aluminium as a risk factor for Alzheimer's disease with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull.* 55: 187–96.
- Fortoul T. I., Rodríguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutiérrez G., Ustarroz-Cano M., Colin-Barenque L., Montañó L. F., García-Pelez I., Bizarro-Nevarés P., López-Valdez N., Falcón-Rodríguez C. I., Jiménez-Martínez R. S., Ruiz-Guerrero M. L., López-Zepeda L. S., Morales-Rivero A., y Muñoz-Rivera-Cambas A., 2011. Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion. *J Biomed Biotechnol.* 1-11.
- Gao S., Chen C., Wu J., Tan Y., Yu K., Xing C., Ye A., Yin L. y Jiang L., 2010. Synergistic apoptosis induction in leukemic cells by miR-15a/16-1 and arsenic trioxide. *Biochemical & Biophys Res Communications.* 403:203–208.
- Gielen H., Remans T., Vangronsveld J. y Cuypers A., 2012. MicroRNAs in Metal Stress: Specific Roles or Secondary Responses?. *Int J Mol Sci.* 13.

- Grin I. R., Konorovsky P. G., Nevinsky G. A. y Zharkov D. O., 2009. Heavy Metal Ions Affect the Activity of DNA Glycosylases of the Fpg Family. *Biochemistry* 74(11): 1253-1259.
- Gu J., Zhu X., Li Y., Dong D., Yao J., Lin C., Huang K., Hu H. y Fei J., 2011. miRNA-21 regulates arsenic-induced anti-leukemia activity in myelogenous cell lines. *Med Oncol* 28:211–218.
- Gumireddy K., Young D., Xiong X., Hogenesch J. B., Huang Q. y Deiters A., 2008. Small-Molecule Inhibitors of MicroRNA miR-21 Function. *Angew Chem Int Ed.* 47:7482 –7484.
- Gurgueira S., Lawrence J., Coull B., Murthy G. G. K y González-Flecha B., 2002. Rapid Increases in the Steady-State Concentration of Reactive Oxygen Species in the Lungs and Heart after Particulate Air Pollution Inhalation. *Environ Health Perspective.* 110(8): 749-755.
- Hartwig A. y Schwerdtle T., 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol.* 127: 47-54.
- Hegde M. L., Hegde P. M., Holthausen L. M. F., Hazra T. K., Rao K. S. J. y Mitra S., 2010. Specific Inhibition of NEIL-initiated Repair of Oxidized Base Damage in Human Genome by Copper and Iron potential etiological linkage to neurodegenerative diseases. *J BiolChemistry.* 285(37):28812-28825.
- Hellman B., Vaghef H. y Bostrijm B., 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single electrophoresis assay. *Mut Research.* 336, 123-131.
- Hengstler J. G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Götte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S., Bienfait H. G., Schlink K., Dietrich C., Faust D., Epe B. y Oesch F., 2003. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* 24(1): 63-73.
- Henríquez A., Ruiz P., Reyes P., Oyola P. y Hetz C., 2010. Transition Metals in Atmospheric Particulate Matter of Santiago and Concepcion Cities in Chile are Correlated with Elevated Levels of LDH and Protein in Bronchoalveolar Lavages of Instilled Rats. *Air Pollution & Health.* 188.
- Hieu N. y Lee B. K., 2010. Characteristics of particulate matter and metals in the ambient air from a residential area in the largest industrial city in Korea. *Atmospheric Res.* 98: 526–537.
- Hsiao W. L., Mo Z. Y., Fang M., Shi X. M., y Wang F., 2000. Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the comet assays. *Mutat Res.* 471: 45-55.

- Huang S., Peng J., Qiu C. X. y Yang Z. M., 2009. Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. *J Inorg Biochem.* 103: 282–287.
- Jardim M. J., 2011. Mini review microRNAs: Implications for air pollution research. *Mutat Res.* 717: 38-45.
- Jeong-Chae L., Young-Ok S., Poyil Pr. y Xianglin S., 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biol& Med.* 53: 742–757.
- Johnson K. S., Foy B., Zuberi B., Molina L. T., Molina M. J., Xie Y., Laskin A. y Shutthanandan V., 2006. Aerosol composition and source apportionment in the Mexico City Metropolitan Area with PIXE/PESA/STIM and multivariate analysis. *Atmos Chem Phys.* 6: 4591-4600.
- Jomova K. y Valko M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283: 65-87.
- Jyoti A. y Sharma D., 2006. Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain 27. *Neurotoxicol.* 451-457.
- Kamigaito T., Noguchi T., Narumi K., Takashima R., Hamada S., Sanada H., Hasuko M., Hayashi H., Masura K. y NOMPI T., 2012. Evaluation of the in vivo Mutagenicity of Nickel Subsulfide in the Lung of F344 gpt delta Transgenic Rats Exposed by Intratracheal Instillation: A Collaborative Study for the gpt delta Transgenic Rat Mutation Assay. *Genes & Environ.* 34: 34-44.
- Kehrer J., 2000. Cause–Effect of Oxidative Stress and Apoptosis. *Teratology* 62:235–236.
- Kim H. y Seo R., 2011 Synergistic genotoxic effect between gene and environmental pollutant: Oxidative DNA damage induced by thioredoxin reductase I silencing under nickel treatment. *Mol Cell Toxicol.* 7:251-257.
- Kong A., Xiao K., Choi K., Wang G., Chan M., Ho C. H., Chan I., Wong C. K., Chan J. y Szeto Ch., 2012. Associations between microRNA (miR-21, 126, 155 and 221), albuminuria and heavy metals in Hong Kong Chinese adolescents. *Clinica Chimica Acta.* 413: 1053–1057.
- Kumar V., Bal A. y Gill KD., 2009. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminum induced oxidative damage. *Toxicol.* 255: 117-23.

- Kumarswamy R., Volkman I. y Thum T., 2011. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* 8(5): 706-713.
- Lacasaña-Navarro M., Aguilar-Garduño C. y Romieu I., 1999. Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres megaciudades de América Latina. *Salud pública de México.* 41: 203-215.
- Lankoff A., Banasik A., Duma A., Ochniak E., Lisowska H. y Kuszewski T., 2006. A comet assay study reveals that aluminum induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Lett.* 161: 27-36.
- Lee E., Oh E., Lee J., Sul D. y Lee J., 2004. Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Toxicol Sciences.* 81: 121-132.
- Lee J. C., Son Y. O., Pratheeshkumar P. y Shi X., 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biol & Med.* 53: 742-757.
- Lema C. y Cunningham M. J., 2010. Mini review MicroRNAs and their implications in toxicological research. *Toxicol Letters.* 198: 100-105.
- Letelier M. E., Lepe A. M., Faúndez M., Salazar J., Marín R., Aracena P. y Speisky H., 2005. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interact.* 151: 71-82.
- Li X., Shia Y., Wei Y., Mac X., Li Y. y Ronggui L., 2012. Altered expression profiles of microRNAs upon arsenic exposure of human umbilical vein endothelial cells. *Environ. Toxicol & pharmacol.* 34: 381-387.
- Lima P. D. L., Vasconcellos M.C., Bahia M. O., Montenegro R. C., Pessoa C. O., Costa-Lotufo L. V., Moraes M. O. y Burbano R. R., 2008. Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicol in Vitro.* 22: 1032-1037.
- Ling M., Li Y., Xu Y., Pang Y., Shen L., Jiang R., Zhao Y., Yang X., Zhang J., Zhou J., Wang X. y Liu Q., 2012. Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- κ B in arsenite-induced cell transformation. *Free Radical Biol & Med.* 52: 1508-1518.
- Lloyd D. R. y Phillips D. H., 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper_II/, iron_II/ and nickel_II/ Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mut Research.* 424: 23-36.

- Lu Z., Liu M., Stribinskis V., Klinge C. M., Ramos K. S., Colburn N. H. y Li Y., 2008. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 27:4373-4379.
- Lu T. X., Munitz A. y Rothenberg M. E., 2009. MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *J Immunol*. 182: 4994-5002.
- Lukiw W. y Pogue A. I., 2007. Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem*. 101(9): 1265-1269.
- Magari S. R., Schwartz J., Williams P. L., Hauser R., Smith T. J. y Christiani D. C., 2002. The Association of Particulate Air Metal Concentrations with Heart Rate Variability. *Environ Health Perspect*. 110: 775-880.
- Marczynski B., Preuss R., Mensing T., Angerer J., Seidel A., El Mourabit A., Wilhelm M., Brüning T., 2005. Genotoxic risk assessment in white blood cells of occupationally exposed workers before and after alteration of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) profile in the production material: comparison with PAH air and urinary metabolite levels. *Int Arch Occup Environ Health*. 78: 97-108.
- Marreilha dos Santos A. P., Milatovic D., Au C., Yin Z., Batoreu M. C. y Aschner M., 2010. Rat brain endothelial cells are a target of manganese toxicity. *Brain Res*. 1326: 152-161.
- Martinez-Samudio R. y Chol H., 2011. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*. 6: 820-827.
- Mathé E., Nguyen G. H., Funamizu N., He P., Moake M., Croce C. M. y Hussain S. P., 2012. Inflammation regulates microRNA expression in cooperation with p53 y nitric oxide. *Int J Cancer*. 131:760-765.
- Mena S., Ortega A. y Estrela J. M., 2008. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res*. 674: 36-44.
- Moffet R. C., Desyaterik R., Hopkins R. J., Tivanski A., Giles M., Wang Y., Shutthanandan V. S., Molina L. T., González R., Johnson K., Mugica V., Molina M., Laskin A. y Prather K., 2008. Characterization of Aerosols Containing Zn, Pb, and Cl from an Industrial Region of Mexico City. *Environ Sci Technol*. 42: 7091-7097.
- Moller P., 2005. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Pharmacol Toxicol*. 98: 336-345.
- Molina L. T., Madronich S., Gaffney J. S., Apel E., de Foy B., Fast J., Ferrare R., Herndon S., Jimenez J. L., Lamb B., Osornio-Vargas A. R., Russell P., Schauer J. J., Stevens P. S., Volkamer R., Zavala M., 2010. An overview of the MILAGRO 2006 Campaign: Mexico City emissions and their transport and transformation. *Atmos Chem Phys*. 10:8697-8760.

- Monteiro N., Lazaro C., Tavares D. y Cecchi A., 2010. Frequency of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of tannery workers in Brazil. *Environ Pharmacol Toxicol.* 29: 3-6.
- Morse J. L., Luczak M. W. y Zhitkovich A. Chromium (VI) Causes Interstrand DNA Cross-Linking in Vitro but Shows No Hypersensitivity in Cross-Link Repair-Deficient Human Cells *Chem Res. Toxicol.*, 2013, 26 (10), pp 1591–1598.
- Motta V., Angelici L., Nordio F., Bollati V., Fossati S., Frascati F., Tinaglia V., Bertazzi P.A., Battaglia C. y Baccarelli A., 2012. Integrative Analysis of miRNA and Inflammatory Gene Expression After Acute Particulate Matter Exposure. *Toxicol. Sci.* 1-35.
- Mundy W. R., Freudenrich T. M. y Kodavanti P. S., 1997. Aluminum Potentiates Glutamate-Induced Calcium Accumulation and Iron-Induced Oxygen Free Radical Formation in Primary Neuronal Cultures. *Mol & Chemical Neuropathol.* 32: 41-57.
- Muñoz R. y Albores A., 2011. Polimorfismos y exposición a xenobióticos en el asma infantil. *Gaceta Médica de México. Laboratorio de metabolismo de xenobióticos, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., México, D.F.* 147:38-47.
- Nath J., 2013. A Comprehensive Study on Animal miRNAs: A Computational approach to explore its implications in Biological and Chemical environments. *IJACR.* 153-158.
- Nazir R., Shaheen N. y Shah M. H., 2011. Indoor/outdoor relationship of trace metals in the atmospheric particulate matter of an industrial area. *Atmospheric Res* 101: 765–772.
- Neal A. P. y Guilarte T. R., 2012. Mechanisms of Heavy Metal Neurotoxicity: Lead and Manganese. *J Drug Metab Toxicol.* 2-13.
- NTP. National Toxicology Program, 2002. NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 507, 1–343.
- Ouameur A. A., Arakawa H., Tajmir-Riahi H. A., 2006. Binding of oxovanadium ions to the major and minor grooves of DNA duplex: stability and structural models. *Biochem Cell Biol.* 84: 677–683.
- Ogunbileje J. O., Sadagoparamanujam V. M., Anetor J. I., Farombi E. O., Akinosun O. M. y Okorodudu A. O., 2013. Lead, mercury, cadmium, chromium, nickel, copper, zinc, calcium, iron, manganese and chromium (VI) levels in Nigeria and United States of America cement dust. *Chemosphere* 90:2743-2749.
- Osorio-Vargas A. R., Bonner J. C., Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Ponce de León S., Miranda J. y Rosas I., 2003. Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Mexico

City Air Pollution Particulate Matter *in Vitro* Are Dependent on Particle Size and Composition. *Environ Health Perspect.* 10: 1289-1293.

- Park J. H. y Park E., 2011. Influence of iron-overload on DNA damage and its repair in human leukocytes *in vitro*. *Mutat Res* 718: 56-61.
- Pinsino A., Matranga V., Trinchella F. y Roccheri M. C., 2010. Sea urchin embryos as an *in vivo* model for the assessment of manganese toxicity: developmental and stress response effects. *Ecotoxicol.* 19: 555-562.
- Puig S. y Thiele D., 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current opinion in chemical biology.* 6(2):171-180.
- Quintana R., Serrano J., Gómez V., de Foy B., Miranda J., García-Cuellar C., Vega E., Vázquez-López I., Molina L. T., Manzano-León N., Rosas I., Osornio-Vargas A. R., 2011. The oxidative potential and biological effects induced by PM₁₀ obtained in Mexico City and at a receptor site during the MILAGRO Campaign. *Environ Pollut.* 159: 3446-3454.
- Rodríguez-Mercado J. J., Mateos-Nava R. A. y Altamirano-Lozano M. A., 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol in Vitro.* 25: 1996-2002.
- Rodríguez-Romero I., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Martínez-Valenzuela, Calderón-Ezquerro M., Cortés-Eslava J., Arenas-Huertero F. y Calderón-Segura M. E., 2012. Evaluation of 8-hidroxy-2'-deoxiguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral lymphocytes *in vitro* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol Mech Methods.* 11: 1-27.
- Rozgaj R., Kasuba V. y Fucic A., 2002. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. *J Trace Elem Med Biol.* 16: 187-192.
- Salinas L., 2012. Tesis de Licenciatura Detección del daño al ADN en epitelio de la mucosa bucal y en orina en la población infantil de El Fraile en Taxco de Alarcón Guerrero. Facultad de Ciencias, UAEM. 94 pp.
- Salnikow K., Su W., Blagosklonny M. V., y Costa M., 2000. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species independent mechanism. *Cancer Res.* 60:3375-3378.
- Salnikow K. y Zhitkovich A., 2008. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium. *Chem Res Toxicol.* 21: 28-44.

- SMA-GDF. Secretaría de Medio Ambiente-Gobierno del Distrito Federal. Informe de la calidad del aire en la Ciudad de México 2009.
- SMA-GDF, 2012. Calidad del Aire en la Ciudad de México. Informe 2011. 25 Años de Monitoreo Atmosférico. 1986-2011. Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. México. 160p.
- Schnaas L., Rothenberg S. J., Flores M. F., Martinez S., Hernandez C., Osorio E. y Perroni E., 2004. Blood Lead Secular Trend in a Cohort of Children in Mexico City (1987-2002). *Environ Health Perspect.* 112: 1110–1115.
- Shen L., Ling M., Li Y., Xu Y., Zhou Y., Ye J., Pang Y., Zhao Y., Jiang R., Zhang J. y Liu Q., 2013. Feedback Regulations of miR-21 and MAPKs via Pcd4 and Spry1 Are Involved in Arsenite-Induced Cell Malignant Transformation. *PLoS ONE* 8(3): e57652. doi:10.1371/journal.pone.0057652.
- Shukla L. I., Chinnusamy V. y Sunkara R., 2009. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. *Biochem. Biophys Acta Gene Regulatory Mechanisms*, i:10.1016/j.bbagr.2008.04.004.
- Silva-Pereira L. C., Cardoso P. C. S., Leite D. S., Bahia M. O., Bastos W. R., Smith M. A. C. y Burbano R. R., 2005. Citotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 38: 901-907.
- Silverman R. A., Ito K., Freese J., Kaufman B. J., De Claro D., Braun J. y Prezant D. J., 2010. Association of Ambient Fine Particles With Out-of-Hospital Cardiac Arrests in New York City. *Am J Epidemiol.* 172:917–923.
- Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E., 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.
- Singh S. P., Kumaria M., Kumaria S. I., Rahmana M. F., Kamalb S. K., Mahbooba M. y Grovera P., 2013. Genotoxicity of nano- and micron-sized manganese oxide in rats after acute oral treatment. *Mutat Res.* 754: 39-50.
- Smart R. C. y Hodgson E., 2008. *Molecular and Biochemical Toxicology*. 4a edition. John Wiley. 901 pp.
- Speit G. y Hartmann A., 2002. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: *Methods in molecular*

biology. DNA repair protocols: Eukariotic systems. Humana Press Inc Totowa, New Jersey. 113: 203-212.

- Sonkoly E. y Pivarcsi A., 2011. MicroRNAs in inflammation and response to injuries induced by environmental pollution. *Mutat Res.* 717: 46– 53.
- Sudha S., Kripa S. K., Shibily P., Joseph S. y Balachandar V., 2011. Biomonitoring of Genotoxic Effects Among Shielded Manual Metal Arc Welders. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 12: 1041-1044.
- Sunderman F. W., 2001. Review: Nasal Toxicity, Carcinogenicity and Olfactory Uptake of Metals. *Ann Clin Lab Sci.* 1: 3-24.
- Tétreault N. y De Guire V., 2013. miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochem.* 46: 842–845.
- Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. y Sasaki Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35: 206-221.
- Tsuchiya S., Okuno Y. y Tsujimoto I. G., 2006. MicroRNA: Biogenetic and Functional Mechanisms and Involvements in Cell Differentiation and Cancer. *J Pharmacol Sci.* 101: 267 – 270.
- Tsuchiya Y., Nakajima M., Takagi S., Taniya T. y Yokoi T., 2006. MicroRNA Regulates the Expression of Human Cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.* 66(18): 9090-9098.
- Turkeza H., Geyikoglu F., Tatarb A., Kelesc M. S. y Kaplanc I., 2012. The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *J Exp Toxicol Pathol.* 64: 93-101.
- Vega E., Reyes E., Ruiz H., Garcia J., Sanchez G., Martinez-Villa G., Gonzalez U., Chow J.C. y Watson J.G., 2004. Analysis of PM2.5 and PM10 in the atmosphere of Mexico City during 2000-2002. *J Air Waste Manag Assoc.* 54:786-798.
- Wan G., Mathur R., Hu X., Zhang X. y Lu X., 2011. miRNA response to DNA damage. *Trends in Biochemical Scie.* 36(9): 478-484.
- Wang L., Bammler T. K., Beyer R. P. y Gallagher E. P., 2013. Copper-Induced Deregulation of microRNA Expression in the Zebrafish Olfactory System. *Environ Sci Technol.* 47: 7466–7474.
- Whang X., Wooi-Loon Ng., Wang P., Tian L., Werner E., Wang H. y Doetsch P., 2012. MicroRNA-21 Modulates the Levels of Reactive Oxygen Species by Targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Res.* 72: 4707-4713.

- Whiteside J. R., Box C. L., McMillan T. J. y Allinson S. L., 2010. Cadmium and copper inhibit both DNA repair activities of polynucleotide kinase DNA Repair. 9: 83–89.
- Wiseman H., Kaur H. y Halliwell B., 1995. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* 93: 113-120.
- Wu W-T., Liou S-H., Lin K-J., Liu T-S, Liu S-H., Chen C-Y., Sung F-C. y Wu T-N., 2009. Changing blood lead levels and DNA damage (comet assay) among immigrant women in Taiwan. *Sci Total Environ.* 407: 5931–5936.
- Wu Z., Dua Y., Xuea H., Wua Y. y Zhoua B. 2012. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol Aging.* 33, 199.e1-199.e12.
- Wullaert A., Heyninck K. y Beyaert R., 2006. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- κ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochemical pharmacol.* 72: 1090 – 1101.
- Yang X. J., Wan P. y Fole R., 2012. Effect of Sample Digestion, Air Filter Contamination, and Post-adsorption on the Analysis of Trace Elements in Air Particulate Matter. *Clean – Soil, Air, Water.* 40 (11): 1217–1221.
- Yu Y., Wang Y. y Ren X., 2010. Context-dependent bidirectional regulation of the MutS homolog 2 by transforming growth factor beta contributes to chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 8: 1633–1642.
- Zapata-Pérez O., 2002. CYP1A en tilapia *Oreochromis niloticus*. Caracterización y regulación por xenobióticos. Tesis de Doctorado. Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV-IPN, 118 p.
- Zhang X., Ng W-L, Wang P., Tian L., Werner E., Wang H., Doetsch P. y Wang Y. Zharkov D. O., 2012. MicroRNA-21 Modulates the Levels of Reactive Oxygen Species by Targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Res.* 72:4707-4713.
- Zharkov D. O. y Rosenquist T. A., 2002. Inactivation of mammalian 8-oxoguanine-DNA glycosylase by cadmium(II): implications for cadmium genotoxicity. *DNA Repair.* 1: 661-670.
- Zheng R., Shi Y., Jia Z. Zhao C. Zhanga Q. y Tanad X., 2010. Fast repair of DNA radicals. *Chem Soc Rev.* 39:2827-2834.
- Zhitkovich A., Voitkun V. y Costa M., 1996. Formation of the Amino Acid-DNA Complexes by Hexavalent and Trivalent Chromium in Vitro: Importance of Trivalent Chromium and the Phosphate Group. *Biochemistry.* 35: 7275-7282.

- Zhong C. Y., Zhou Y. M., Smith K. R., Kennedy I. M., Chen C. Y., Aust A. E. y Pinkerton K. E., 2010. Oxidative injury in the lungs of neonatal rats following short-term exposure to ultrafine iron and soot particles. *J Toxicol Environ Health A*.73(12):837-47.