



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE MICRORNAS EN CULTIVO DE CÉLULAS DE PULMÓN EXPUESTAS
A MATERIAL PARTICULADO DEL AIRE PM₁₀**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QUEZADA MALDONADO ERICKA MAREL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. FELIPE VACA PANIAGUA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 07 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **QUEZADA MALDONADO ERICKA MAREL** con número de cuenta **307210210**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE MICRORNAS EN CULTIVO DE CÉLULAS DE PULMÓN EXPUESTAS A MATERIAL PARTICULADO DEL AIRE PM₁₀"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR**:

Presidente: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ
Vocal: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
Secretario: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Suplente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Suplente: DRA. SAÉ MUÑOZ HERNÁNDEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria Cd. Mx., a 14 de diciembre de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca con número de registro 628260 y por el apoyo financiero para la realización de éste proyecto mediante el Fondo SEP-CONACYT 180471.

A mi Tutora principal: Dra. Claudia María García Cuellar y a los miembros del comité tutor: Dra. Yolanda Irasema Chirino López y Dr. Felipe Vaca Paniagua.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la UNAM, por brindarme la oportunidad de superarme y avanzar en mi vida profesional mediante el posgrado en ciencia biológicas.

Al Instituto Nacional de Cancerología, en específico a la Dirección de Investigación Básica, por la oportunidad de desarrollar el proyecto de maestría dentro sus instalaciones.

A los miembros de mi jurado: Dra. Yesennia Sánchez Pérez, Dr. Felipe Vaca Paniagua, Dra. Irma Rosas Pérez, Dra. Saé Muñiz Hernández y Dr. Federico Ávila Moreno, por aceptar formar parte del comité y por su valiosa participación en la revisión de la tesis.

A todos los miembros del laboratorio de “Carcinogénesis y medio ambiente” del INCAN por brindarme su ayuda y compartir sus conocimientos teóricos y prácticos con lo cual fue posible concluir ésta tesis. En especial quiero agradecer a mi tutora la Dra. Claudia García Cuellar por aceptarme como miembro de su grupo de trabajo, por su asesoría y disposición. A la Dra. Yesennia Sánchez Pérez por su apoyo, tiempo e impulso en esta etapa. Al Dr. Miguel Santibañez, a la futura Bióloga Yanueh Bautista y al Biólogo Carlos García por su amistad, por su ayuda en los momentos en que me enfrente con problemas o dificultades y por cada momento de alegría que compartimos.

A mis papás por apoyar y secundar mis decisiones personales y profesionales. Gracias por estar presentes en cada etapa y no dejarme sola. Gracias por su comprensión y por permitirme continuar con mis sueños. Mamá por enseñarnos una vez más que sin importar las dificultades de la vida, debemos ser felices, luchar y no darnos por vencidos, gracias por ser la mujer fuerte y valerosa que nos guía en este camino. Papá por ser un ejemplo de superación y constancia profesional y personal, por brindarnos tu amor y compañía.

A mi hermano por ser una persona amorosa, divertida y leal, por tu forma de sacarme una sonrisa aún en los momentos difíciles y estar siempre a mi lado. Sigue adelante, no te detengas en ningún aspecto de tu vida, eres grandioso, eres el mejor.

A ti Diego por formar parte de nuestra familia, estoy orgullosa de cada paso que hemos dado juntos, gracias por brindarme tu amor, apoyo y comprensión día con día. Por tu optimismo y por impulsarme a seguir adelante en el camino de la investigación.

A mis abuelos, tíos y primos por creer en mí, por darme su cariño, y valorar el esfuerzo que he puesto a lo largo de estos años de estudio. Por ser y estar presentes en mi vida.

A mis amigos por compartir buenos y malos momentos, por comprender mi ausencia y cansancio a lo largo de éstos dos años, siempre los llevo en mi mente y corazón.

A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Contaminación del aire	5
1.1.1 Partículas Suspendidas	6
1.2 Contaminación por PM en la Ciudad de México	7
1.3 Efectos de las PM en la salud humana	7
1.3.1 Estudios epidemiológicos	7
1.3.2 Estudios toxicológicos.....	8
1.4 Los microRNAs	9
1.4.1 Biogénesis de miRNAs	9
1.4.2 Mecanismos de acción de los miRNAs	11
1.5 Efecto de las PM en la expresión de los miRNAs	12
2 JUSTIFICACIÓN	15
3 HIPÓTESIS	15
4 OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos Particulares.....	15
5 METODOLOGÍA.....	16
5.1 Recolección de PM ₁₀	16
5.2 Cultivo celular	16
5.3 Exposición a PM ₁₀	16
5.4 Ensayo de viabilidad celular	16
5.5 Extracción de RNA	17
5.6 Cuantificación, análisis de calidad e integridad del RNA.....	17
5.7 Hibridación en microarreglos de miRNAs	18
5.8 Análisis de microRNAs	18
5.9 Identificación de genes blanco de microRNAs.....	18
5.10 Análisis de vías funcionales y procesos biológicos.....	19
5.11 Validación de miRNAs candidatos a través de qRT-PCR.....	19
6 RESULTADOS	21
6.1 Viabilidad de células A549 expuestas a PM ₁₀	21
6.1 Obtención de RNA de células A549.....	22

6.2	Hibridación y análisis de calidad de los microarreglos.....	23
6.4	Cambios de expresión en miRNAs inducidos por PM ₁₀	24
6.5	Genes blanco potenciales de los miRNAs subexpresados obtenidos en los análisis bioinformáticos	27
6.6	Genes blanco potenciales de los miRNAs sobreexpresados obtenidos en los análisis bioinformáticos	30
6.7	Validación de resultados a través de qRT-PCR.....	33
7	DISCUSIÓN.....	34
8	CONCLUSIONES.....	41
9	APORTACIONES	42
10	PERSPECTIVAS	43
11	LITERATURA CITADA	44
12	ANEXOS	53
12.1	Anexo I. Límites de contaminantes criterio	53
12.2	Anexo II. Vías de señalización de los miRNAs desregulados	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación por diámetro aerodinámico de las PM	6
Figura 2. Biogénesis de los miRNAs.....	10
Figura 3. Mecanismos de acción de los miRNAs	12
Figura 4. Microarreglo de miRNAs	19
Figura 5. Evaluación de la viabilidad celular	21
Figura 6. Análisis de calidad del RNA	22
Figura 7. Análisis de control de calidad de microarreglos	23
Figura 8. Cambios en la expresión de miRNAs inducidos por PM ₁₀	24
Figura 9. Vías funcionales asociadas a los miRNAs subexpresados	28
Figura 10. Red de conectividad entre miRNAs-mRNAs.	29
Figura 11. Vías funcionales asociadas a los miRNAs sobreexpresados	31
Figura 12. Red de conectividad entre miRNAs-mRNAs	32
Figura 13. Evaluación de la expresión de miRNAs mediante microarreglos y qRT-PCR..	33
Figura 14. Esquema de alteraciones en miRNAs por exposición a PM ₁₀	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Aluminio
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipos de Cultivo)
ANOVA	Analysis Of Variance (Análisis de Varianza)
Cd	Cadmio
cDNA	Complementary DNA (ADN complementario)
CDMX	Ciudad de México
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
Cr	Cromo
CT	Células sin exposición a PM ₁₀
Cu	Cobre
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FC	Fold Change (Razón de cambio)
HAP's	Hidrocarburo aromáticos policíclicos
IARC	Interational Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer)
IncRNAs	Long non-coding RNA (ARNs largos no codificantes)
mRNA	Messenger RNA (ARN mensajero)
miRNA	MicroRNA
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NOM	Norma Oficial Mexicana
O₃	Ozono
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Plomo
PBS	Phosphate Buffered Saline (Buffer salino de fosfatos)
PM	Particulate Matter (Material Particulado)
PM₁₀	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤ a 10µm
PM_{2.5}	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤ a 2.5µm
PM_{1-0.1}	Material particulado con diámetro aerodinámico entre 1 y 0.1µm
qRT-PCR	Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la polimerasa, transcriptasa reversa, tiempo real, cuantitativa)
RIN	RNA Integrity Number (Número de integridad de ARN)
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)
SFB	Suero Fetal Bovino
SO₂	Dióxido de azufre
UTR	Untranslated region (Región no traducible del gen)
ZUR	Zona Urbana Residencial
µg/cm²	Microgramos por centímetro cuadrado
µg/cm³	Microgramos por centímetro cúbico
µl	Microlitro
µm	Micrómetros
m³/min	Metro cúbico por minuto
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados

RESUMEN

La contaminación del aire fue clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) como un carcinógeno para los humanos de acuerdo a las evidencias epidemiológicas y toxicológicas de su asociación con el desarrollo de cáncer de pulmón. Dentro de los contaminantes del aire clasificados como carcinógenos se encuentran las Partículas Suspendidas (PM), las cuales son una mezcla compleja que contienen materiales orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, inorgánicos como los metales y biológicos como el polen y las endotoxinas. Las PM por su diámetro aerodinámico se clasifican en PM₁₀, PM_{2.5} y PM_{0.1}. Éstas PM son conocidas como la fracción inhalable ya que ingresan al organismo a través de las vías respiratorias altas y se depositan a lo largo de los conductos del aparato respiratorio hasta los alveolos.

Los estudios epidemiológicos han reportado que las PM son un factor de riesgo para la salud e incrementan la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiopulmonares entre las que se encuentra el cáncer de pulmón. Los estudios toxicológicos han aportado evidencia del potencial carcinogénico de las PM, entre los efectos se encuentran la producción de citocinas, daño oxidante, daño genotóxico, remodelación de citoesqueleto de actina y modificaciones epigenéticas; sin embargo, los mecanismos a través de los cuales las PM pueden conducir al desarrollo de cáncer no han sido totalmente entendidos y es necesario profundizar en su estudio.

Por esta razón en este trabajo se decidió evaluar el efecto de las PM en la expresión de microRNAs (miRNAs), ya que éstas son moléculas que pueden regular a nivel postranscripcional la expresión de los genes, incluyendo oncogenes y genes supresores de tumores, participando en diferentes procesos biológicos como proliferación, diferenciación, apoptosis, crecimiento y ciclo celular.

Mediante el uso de una plataforma de microarreglos para miRNAs (Affymetrix GeneChip) analizamos la expresión de 2,578 miRNAs en células de pulmón (A549) expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas. La normalización y análisis estadístico de los datos se realizó en el programa Partek Genomics y posteriormente se determinaron *in silico* los posibles genes blanco y las posibles vías en las que participan los miRNAs desregulados empleando el software miRpath 3.0 y TargetScan.

Nuestro análisis logró identificar que la exposición a PM₁₀ induce la desregulación de 74 miRNAs (Fold Change 1.5, p≤0.05), de los cuales 45 miRNAs se encontraron subexpresados y 29 miRNAs sobreexpresados en comparación con células sin exponer.

Las evaluaciones bioinformáticas indicaron que los miRNAs subexpresados entre los que destacan: miR-181a, miR-615-5p, miR-663, miR-762, miR-4516, miR-4763-3p, miR-4758-3p, miR-5001-5p participando en la regulación de vías asociadas a proliferación celular, ciclo celular, autofagia, modificaciones de citoesqueleto de actina, respuesta ante daño a DNA y reparación de DNA mediante el mecanismo de escisión de bases.

Por otra parte los miRNAs sobreexpresados como el miR-30c-5p, miR-125a-3p, miR-193b-5p, miR-320e, miR-324-3p, miR-1298-3p, miR-6510-5p, miR-6808-5p pueden inducir la disminución o bloqueo de la expresión de genes involucrados en señales antiproliferativas y pro-apoptóticas, la vía de reparación del DNA a través de reparación de doble cadena e inducen modificaciones en el metabolismo de xenobióticos de acuerdo a los análisis *in silico*.

Con base en los análisis de enriquecimiento determinamos que los miRNAs desregulados por las PM₁₀ participan en las vías MAPK, Wnt, mTOR, AMPc, p53 y TGF- β , además de metabolismo central del carbón, gluconeogénesis, citoesqueleto de actina, uniones adherentes y moléculas de adhesión (CAMs).

Basado en lo anterior, concluimos que las PM₁₀ inducen cambios en la expresión de diferentes miRNAs que participan en la regulación de vías relacionadas con los procesos carcinogénicos, por lo que la desregulación de miRNAs podría ser uno de los mecanismos que expliquen la asociación entre exposición a PM y el inicio o desarrollo de cáncer de pulmón.

ABSTRACT

The air pollution was classified by the IARC as a human carcinogen based in the epidemiological and toxicological evidence related to the impact on health and its association with the development of lung cancer. Within air pollutants that are classified as carcinogenic, the particulate matter (PM) are a complex mixture that contain organic materials such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, inorganic compounds such as metals and biologicals components such as pollen and endotoxins.

The PM are classified into PM₁₀, PM_{2.5} and PM_{0.1} by their aerodynamic diameter and are known as inhalable fraction, since they can enter through the upper respiratory tract and be deposited along the ducts of the respiratory system until reach the alveoli.

Epidemiological studies have reported that PM increases the risk of morbidity and mortality of cardiopulmonary diseases, including lung cancer and toxicological studies have demonstrated the carcinogenic potential of the PM. In this regard, it is known that the PM induces the production of cytokines, generate oxidative damage, genotoxicity, cytoskeleton remodeling and epigenetic modifications. However the mechanisms through which the PM can lead to cancer development have not been fully understood and need to be further described.

For this reason, in this work we decided to evaluate the effect of PM on the expression of microRNAs (miRNAs), since these molecules are responsible for the regulating gene expression at post-transcriptional level, including oncogenes and tumor suppressor genes and are involved in the control of different biological processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, growth, development, cell cycle.

We analyzed through microarray (Affymetrix GeneChip) the expression of 2,578 miRNAs in human lung epithelial cells (A549) exposed to 10 µg/cm² of PM₁₀ for 72 hours. Data normalization and statistical analysis were performed using Partek Genomics suite. DIANA-mirPathv.3 and TargetScan were used to predict *in silico* the gene targets and the pathways in which deregulated miRNAs can participate.

Exposure to PM₁₀ induced deregulation of 74 miRNAs (Fold Change 1.5, p ≤0.05), in which 45 miRNAs were found down-regulated and 29 miRNAs were up-regulated compared to cells without exposure to PM₁₀.

The bioinformatics analysis indicated that down-regulated miRNAs among them miR-181a, miR-615-5p, miR-663, miR-762, miR-4516, miR-4763-3p, miR-4758-3p, miR 5001-5p are involved in cell proliferation, cell cycle, autophagy, cytoskeletal changes, response to DNA damage and DNA repair by base excision mechanism.

Moreover overexpressed miRNAs such as miR-30c-5p, miR-125a-3p, miR-193b-5p, miR-320e, miR-324-3p, miR-1298-3p, miR-6510-5p, miR-6808-5p induce the blocking of antiproliferative and pro-apoptotic signals, block DNA repair pathway through double stranded repair and induce changes in xenobiotic metabolism.

In general the deregulated miRNAs participated in MAPK, Wnt, mTOR signaling cAMP, p53 and TGF- β pathways, control the central metabolism coal, gluconeogenesis, and changes in cytoskeleton through adherent junctions and adhesion molecules (CAMs) pathways.

We conclude that the PM₁₀ exposure deregulates the expression of some miRNAs involved in carcinogenesis in the A549 cells, the deregulation of miRNAs could be one of the mechanisms that explain the association between exposure to PM and initiation or development of lung cancer.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación del aire

El aire es una capa de gases que rodea al planeta y está compuesta por una mezcla de nitrógeno (78%), oxígeno (21%), vapor de agua y otros gases traza en menor proporción tal como el dióxido de carbono, el helio y el argón (1%) (Centro Mario Molina., 2015). La contaminación del aire se genera cuando se modifica la composición química natural de la atmósfera por la presencia de compuestos o materiales en fase sólida, líquida o gaseosa y que están presentes en cantidades suficientes y por un tiempo de permanencia prolongado, ocasionando un desequilibrio en la atmósfera (INECC., 2014; SIMAT., 2014).

Se sabe que los contaminantes del aire provocan diversos efectos en la salud de los humanos, específicamente el dióxido de nitrógeno (NO₂), el ozono (O₃), el monóxido de carbono (CO), el dióxido de azufre (SO₂), el plomo (Pb) y las partículas suspendidas con un diámetro aerodinámico menor o igual a 10 y 2.5 µm (PM₁₀ y PM_{2.5}), los cuales han sido clasificados como contaminantes criterio. Los seis compuestos mencionados son perjudiciales para la salud, han sido utilizados para evaluar la calidad del aire y se han dictaminado normas que establecen las concentraciones máximas de exposición a los contaminantes durante un periodo definido, con el fin de reducir los riesgos en la salud o proteger de efectos nocivos a los humanos. Los límites establecidos para los contaminantes criterio, tanto a nivel nacional como internacional, se encuentran en la tabla 1 en la sección de anexos (EPA., 2015; INECC., 2013).

Dentro de los contaminantes criterio, el estudio de las PM ha sido de interés durante la última década, debido a que son consideradas como uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y pulmonares (Cohen et al., 1997; Loomis et al., 2013; Hamra et al., 2014; Badyda et al. (2016)).

En el año 2013 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer clasificó a la contaminación del aire extramuros incluyendo las PM como un carcinógeno para los humanos (grupo I), ya que se contó con evidencia suficiente para considerar el impacto de la contaminación en la salud del ser humano, esto basado en la revisión de más de 1000 artículos científicos tanto de estudios epidemiológicos como de pruebas experimentales. Estos esfuerzos aportan evidencia suficiente para considerar el impacto de la contaminación en la salud del ser humano, específicamente con el desarrollo de cáncer pulmonar (Reymao et al., 1997; Turner et al., 2011; Loomis et al., 2013; Loomis et al., 2014).

1.1.1 Partículas Suspendingas

Las PM son un contaminante complejo por su origen y composición. Las PM son una mezcla heterogénea de compuestos que están constituidas por diferentes materiales orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); siendo los más comunes el naftaleno, el fenantreno, el pireno y benzo[a]pireno. También contienen materiales biológico como endotoxinas, polen, bacterias, hongos y compuestos inorgánicos, entre los que destacan metales como aluminio, sílice, fósforo, titanio, manganeso, entre otros (Chirino et al., 2015; Morakinyo et al., 2016).

Por otra parte las PM están clasificadas de acuerdo a su diámetro aerodinámico en PM_{10} (diámetro aerodinámico es $\leq 10 \mu m$), $PM_{2.5}$ (diámetro aerodinámico es $\leq 2.5 \mu m$) y $PM_{0.1}$ (diámetro aerodinámico es $\leq 0.1 \mu m$) (figura 1).

Las fracciones equivalentes o menores a PM_{10} son conocidas como la “fracción inhalable”, ya que pueden ingresar al organismo a través de las vías respiratorias altas, posteriormente pueden depositarse y acumularse a lo largo de las ramificaciones del árbol bronquial, hasta alcanzar de esta forma las regiones profundas de aparato respiratorio incluyendo los alvéolos, por lo que generan diversos efectos pulmonares y sistémicos, entre los que destaca el cáncer de pulmón (Brauer et al., 2001; Englert, 2004; Pope and Dockery, 2006; Valavanidis et al., 2008 ; UNEP., 2009).

Las PM son emitidas a la atmósfera a partir de fuentes naturales como el vulcanismo, los incendios forestales, las tormentas de arena, la erosión de suelos; sin embargo la mayor parte de las partículas se emiten a través de fuentes antropogénicas, entre las que destacan la quema de carbón, leña, productos derivados de la combustión interna de vehículos y de diversos procesos industriales (Dockery et al., 1993; Englert, 2004; Pope and Dockery, 2006).

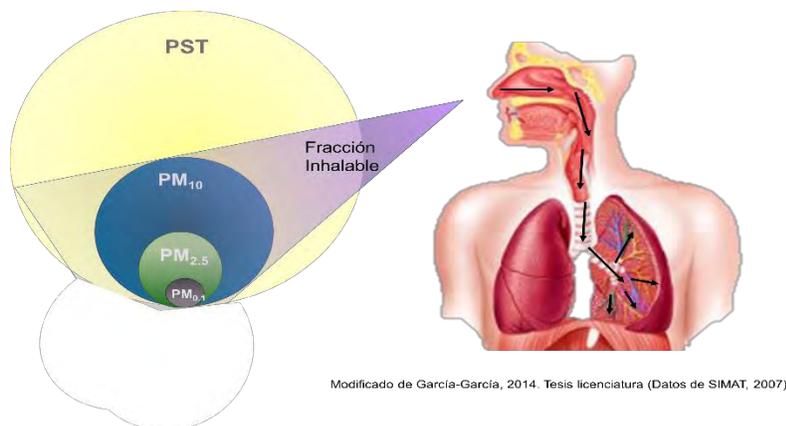


Figura 1. Clasificación por diámetro aerodinámico de las PM

Las Partículas Suspendidas se dividen en Partículas suspendidas totales (**PST**) dentro de las cuales se encuentran las partículas **PM_{10}** , **$PM_{2.5}$** y **$PM_{0.1}$** , que se clasifican como fracción inhalable ya que pueden ingresar y distribuirse hasta las vías respiratorias profundas como los alveolos. El tamaño de los círculos representa aproximadamente el porcentaje de concentración de las respectivas fracciones en relación a las PST en la Ciudad de México.

1.2 Contaminación por PM en la Ciudad de México

Por lo general, los altos índices de contaminación del aire se presentan en áreas urbanas mejor conocidas como mega-ciudades entre las que destaca la Ciudad de México (CDMX) (Molina and Molina, 2004; Cheng et al., 2016). La CDMX es una urbe que está ubicada a 2,240 metros sobre el nivel del mar, lo cual disminuye la concentración de oxígeno disponible en la atmósfera, además está rodeada de cadenas montañosas, que en conjunto con las intensas radiaciones solares y las actividades antropogénicas favorecen la formación y permanencia de diversos contaminantes en el aire, entre los que destacan las PM (Sedema., 2012; SIMAT., 2014).

Actualmente en México los límites de exposición a PM se encuentran señalados en la Norma Oficial Mexicana (NOM) NOM-025-SSA-1-2014, la cual establece para PM₁₀ 75 µg/m³ como límite máximo de exposición en un periodo de 24 horas y 40 µg/m³ como promedio anual. Para las PM_{2.5} se encuentra establecido 45 µg/m³ de exposición en 24 horas y 12 µg/m³ como promedio anual. Con frecuencia las concentraciones de PM exceden las recomendaciones de la NOM, generando efectos importantes en la salud de la población (Riojas-Rodriguez et al., 2014). En la CDMX, en el año 2014, se registraron niveles de hasta 44 µg/m³ y 23 µg/m³ como promedio anual de PM₁₀ y PM_{2.5} respectivamente (Semarnat., 2014; SIMAT., 2014; Sedema., 2012).

1.3 Efectos de las PM en la salud humana

1.3.1 Estudios epidemiológicos

En la actualidad existe suficiente evidencia epidemiológica sobre los efectos adversos inducidos por las PM en la salud de los seres humanos. Los estudios epidemiológicos han reportado que posterior a la exposición aguda a PM, aumentan los padecimientos oftálmicos, las cefaleas y se registra un incremento en el riesgo de hospitalización, hasta del 12.8% por enfermedades cardiorrespiratorias por cada 10 µg/m³ que aumenta la concentración de PM₁₀ (Pope et al., 1995; Bourcier et al., 2003; Lai et al., 2013; Ferreira et al., 2016; Huang et al., 2016).

Los estudios basados en el seguimiento de cohortes de personas expuestas de forma prolongada a las PM, han demostrado que este contaminante constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como el asma, la enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), así como cáncer en especial de pulmón y vejiga (Pope et al., 1995; Cohen et al., 1997; Guillerm and Cesari, 2015; Zheng et al., 2015; Chen et al., 2016a).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se estima que cada año mueren en promedio 3.7 millones de personas por efecto directo de la contaminación y de éste total de muertes el 6% está atribuido a cáncer de pulmón (OMS., 2014).

En relación al cáncer de pulmón es importante señalar que hace algunas décadas esta neoplasia estaba relacionada casi en su totalidad con el hábito del tabaquismo;

sin embargo, actualmente se ha presentado un incremento en el desarrollo de dicha patología en personas no fumadoras. De hecho, a nivel mundial se calcula que hasta el 25% de los casos de cáncer de pulmón se presentan en personas no fumadores y en México hasta el 44% de los pacientes con cáncer pulmonar no cuentan con antecedentes de tabaquismo, pero si con antecedentes de exposición a altos índices de contaminantes del aire (Sun et al., 2007; Arrieta et al., 2013).

Los tipos histológicos de cáncer de pulmón difieren entre personas fumadoras y no fumadoras. El carcinoma de células no pequeñas de tipo epidermoide es el más común asociado al hábito tabáquico. El carcinoma epidermoide representaba en décadas anteriores la mayoría de los casos reportados. Actualmente el adenocarcinoma ocupa gran porcentaje del total de casos y éste se encuentra relacionado con factores independientes al tabaquismo, tal como la exposición a contaminantes del aire incluyendo el humo de leña y las PM (Turner et al., 2011; Arrieta et al., 2013; Hamra et al., 2014; Gharibvand et al., 2016).

Diversos trabajos reportan que un incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la concentración de $\text{PM}_{2.5}$ y PM_{10} aumentan en promedio hasta un 8% y 6% respectivamente el riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón (Pope et al., 2002; Pope and Dockery, 2006; Song et al., 2014; Badyda et al., 2016; Chen et al., 2016a; Gharibvand et al., 2016).

1.3.2 Estudios toxicológicos

Si bien a través de los estudios epidemiológicos se ha determinado la asociación entre la exposición a contaminantes y el desarrollo de diferentes enfermedades como el cáncer, es necesario entender los mecanismos a través de los cuales se desarrolla una neoplasia asociada a la contaminación. Los estudios toxicológicos han aportado evidencias sobre el hecho de que las PM inducen efectos a nivel celular, genómico y epigenético; sin embargo, aún no se han definido en su totalidad los mecanismos mediante los cuales pueden conducir a un proceso carcinogénico.

Está demostrado que las PM pueden generar diferentes respuestas asociadas a la mezcla compleja de compuestos por los que están constituida, los trabajos previos han reportado que las PM no inducen cambios en la viabilidad de las células de pulmón; la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ha sido identificada como una concentración sub-letal, con la cual se han encontrado modificaciones importantes a nivel celular y molecular (Chirino et al., 2010; Ferecatu et al., 2010; Sanchez-Perez et al., 2014; Reyes-Zarate et al., 2016).

Entre los efectos de las PM se encuentran la producción de citocinas e infiltrado inflamatorio, daño oxidante a través de la acumulación de ROS y daño genotóxico por rompimiento de la doble cadena del DNA (Alfaro-Moreno et al., 2002; Li et al., 2003; Bonetta et al., 2009; Sanchez-Perez et al., 2009; Chirino et al., 2010; Danielsen et al., 2010; Motta et al., 2013; Li et al., 2015a; Li et al., 2015b).

También se ha demostrado que las PM inducen la remodelación del citoesqueleto de actina, alteran las interacciones célula-célula y confieren ganancia de potencial

invasivo (Hartsock and Nelson, 2008; Sanchez-Perez et al., 2014; Morales-Barcenas et al., 2015).

A nivel epigenético las PM generan cambios en la metilación del DNA; en específico inducen la metilación del gen p16, hipometilación de elementos repetidos LINE-1 y cambios en los patrones de metilación de la región promotora del gen iNOS (NOS2) (Baccarelli et al., 2009; Tarantini et al., 2009; Soberanes et al., 2012; Kile et al., 2013). Además las PM₁₀ incrementan la acetilación de la histona H4 de la región promotora del gen IL8 e inducen incremento en los niveles de la 5'-hidroximetilcitosina (Gilmour et al., 2003; Sanchez-Guerra et al., 2015).

Trabajos recientes señalan que las PM pueden inducir cambios en la expresión de algunas moléculas que se encargan de la regulación génica, por ejemplo se ha reportado que personas expuestas a altas concentraciones de PM presentan modificaciones en la expresión de algunos microRNAs entre éstos el miR-222, miR-21, miR-146 (Bollati et al., 2010; Fossati et al., 2014; Karlsson and Baccarelli, 2016).

1.4 Los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA no codificante de longitud corta (20 nucleótidos aproximadamente), que se encuentran evolutivamente conservados. Están encargados de regular a nivel postranscripcional la expresión de una variedad de RNA mensajeros (mRNA). Participan en diferentes procesos celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, crecimiento, metabolismo celular, entre otros (Lee et al., 1993; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Bartel, 2004).

1.4.1 Biogénesis de miRNAs

La síntesis de los miRNAs abarca una serie de procesos que comienzan en el núcleo y concluyen en el citoplasma. Los miRNAs pueden estar codificados tanto en exones como en intrones y la transcripción se lleva a cabo por la RNA Polimerasa II o III originando transcritos largos (80 nucleótidos aproximadamente) conocidos como pri-miRNAs, los cuales contienen una Cap (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'; mediante complementariedad de bases los precursores forman estructuras tallo-bucle, las cuales son procesadas por un complejo formado por la RNAsa Drosha y la proteína DGCR8 (figura 2) (Bartel, 2004; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004; Zeng, 2006; Carthew and Sontheimer, 2009).

Este complejo genera un pre-miRNA (65 nucleótidos aproximadamente) que es exportado al citoplasma a través de un segundo complejo constituido por exportina-5, Ran y GTP. En el citoplasma la RNAsa Dicer en conjunto con la proteína TRPB se encargan de realizar cortes en la estructura de tallo-bucle, lo cual produce un RNA de doble cadena; finalmente es separado generando una cadena funcional y una cadena sin función aparente que es degradada. La cadena funcional se une con la proteína Ago2 y al complejo RISC formando un miRNA maduro (figura 2) (Lee

et al., 2003; Bartel, 2004; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004; Zeng, 2006; Carthew and Sontheimer, 2009; Winter et al., 2009).

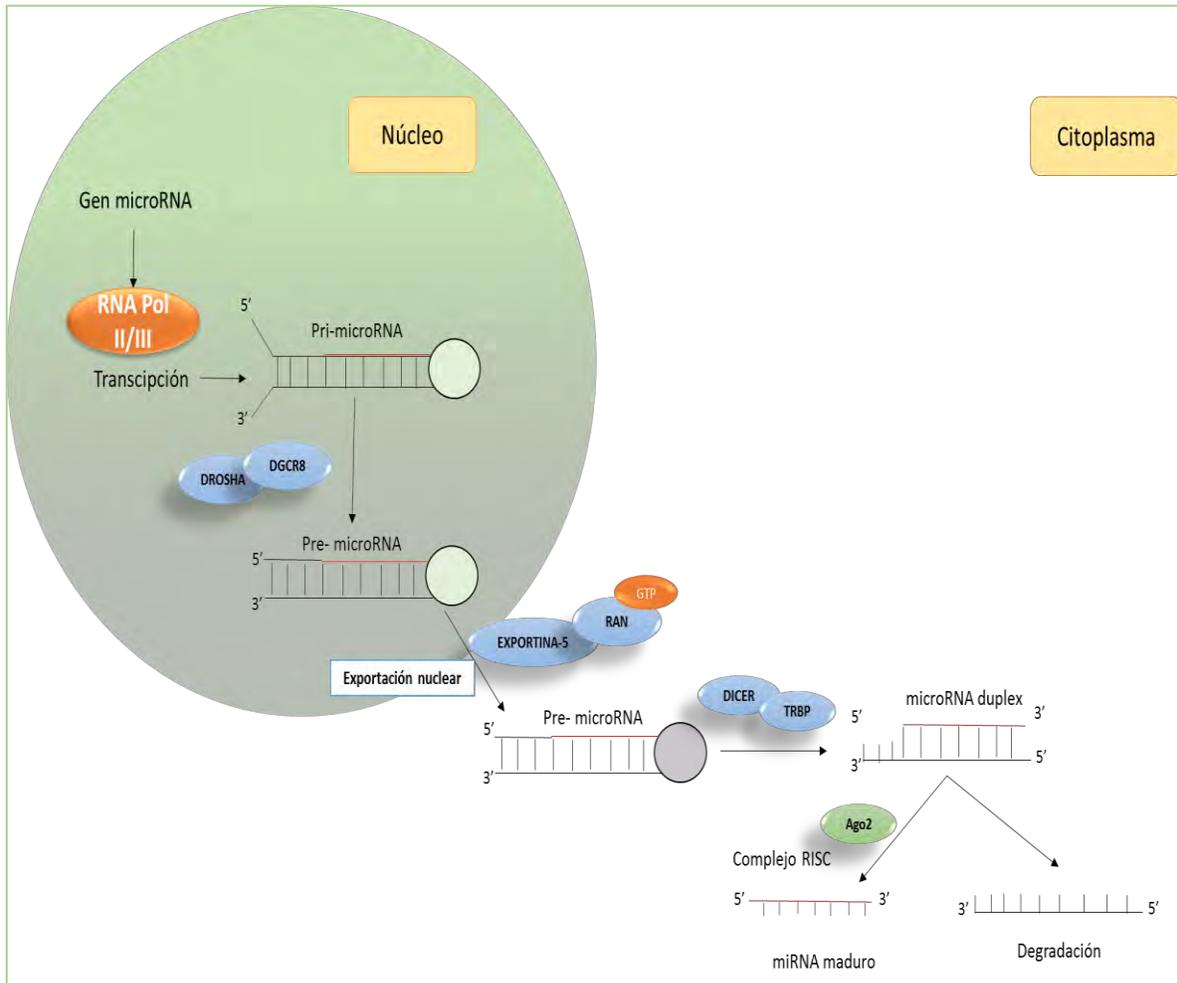


Figura 2. Biogénesis de los miRNAs

La RNA polimerasa II ó III genera un transcrito llamado pri-miRNA que posteriormente forma una estructura tallo-bucle, el complejo Drosha-DGCR8 realiza cortes en el transcrito generando un pre-miRNA, el cual es exportado a citoplasma a través de la exportina-5. Posteriormente Dicer-TRPB realiza cortes en el tallo-bucle formando un RNA de doble cadena, el cual es separado posteriormente, una de las cadenas es degradada y la otra se une a la proteína Ago2 y RISC dando paso a la formación de un miRNA maduro y funcional.

1.4.2 Mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs participan en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional a través de la unión por complementariedad de bases con diferentes mRNA blanco. Frecuentemente la unión ocurre entre la región 3'-UTR del mRNA y la región 5'-UTR del miRNA, que es una región denominada "semilla", la cual abarca entre 7 y 8 bases. La complementariedad de bases le confiere a los miRNAs el potencial de regular múltiple mRNAs, además los mecanismos a través de los cuales se produce el control de la expresión génica varían de acuerdo al grado de complementariedad de bases entre las regiones mencionadas anteriormente (Doench and Sharp, 2004; Saetrom et al., 2007; Carthew and Sontheimer, 2009).

Los miRNAs por una parte pueden promover la degradación del mRNA cuando la complementariedad de bases es total. En este proceso el complejo miRNA-RISC (miRISC) induce en el mRNA la desadenilación en el extremo 3'-UTR o la pérdida de la cap (7-metilguanosina) en el extremo 5'-UTR (figura 3A). Dichas modificaciones desestabilizan al mRNA, haciéndolo susceptible a la actividad de exonucleasas (Wu et al., 2006; Wu and Belasco, 2008).

Por el contrario, cuando la complementariedad de bases es parcial, el miRNA puede bloquear la traducción sin degradar al mRNA. Esta modificación puede ocurrir en etapas tempranas del proceso de traducción. El complejo miRISC interfiere entre la unión del factor de Iniciación eIF4E y la Cap del extremo 5'-UTR del mRNA (Humphreys et al., 2005; Kiriakidou et al., 2007). Por otra parte miRISC puede bloquear el ensamblaje del ribosoma (subunidad grande con la pequeña) o inducir la salida del ribosoma antes del codón de término (Petersen et al., 2006; Wang et al., 2008).

Lo procesos mencionados y representados en la figura 3B, sólo limitan la obtención de productos proteicos, pero no inducen la degradación de los mRNAs. Es importante mencionar que el bloqueo de la traducción es el tipo de regulación postranscripcional ejercida por los miRNAs más común en los humanos (Petersen et al., 2006; Wang et al., 2008).

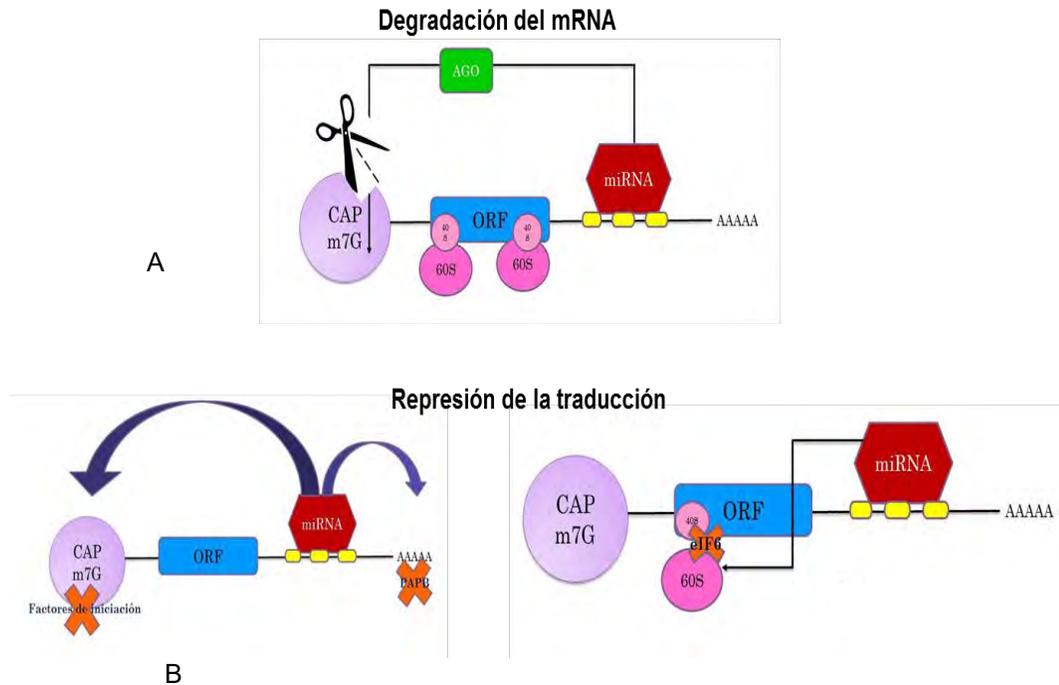


Figura 3. Mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs ejercen distintos tipos de regulación de la expresión génica dependiendo de la complementariedad de bases entre el miRNA y el mRNA. (A) Inducción de la degradación del mRNA a través de la complementariedad completa de bases. (B) Represión de la traducción dada la complementariedad incompleta de las bases.

1.5 Efecto de las PM en la expresión de los miRNAs

A través de un análisis de qRT-PCR, Bollati y colaboradores determinaron que las PM inducen incremento en la expresión de los miRNAs miR-222 y miR-21, en muestras de sangre periférica de personas laboralmente expuestas a altos índices de contaminación por PM₁₀ y PM_{2.5}; además encontraron correlación entre la expresión del miR-21 y el aumento de la 8-hidroxiguanina, por lo que este miRNA fue considerado como un regulador del estrés oxidante. Mediante las evaluaciones bioinformáticas identificaron que ambos miRNAs participan en procesos inflamatorios y del sistema inmune (Bollati et al., 2010).

Las muestras de la misma cohorte fueron analizadas posteriormente mediante microarreglos, de los 847 miRNAs analizados reportaron la sobreexpresión de los miRNAs let-7g, miR-29a, miR-146 y miR-421 con un FC>2. De manera general los autores encontraron correlación entre el cambio de expresión del miR-421 y los genes NOS2, PDGFRB, el miR-146 con la quimiocina CCL5, con la ciclina CDKN1C y con TGFB1, por el contrario el miR-29a correlacionó negativamente con PTEN y let-7g con Nf-kB1, con base en la literatura y en los análisis *in silico* concluyeron de

manera general que los miRNAs desregulados participan en procesos inflamatorios, respuesta a tóxicos y estrés oxidante (Motta et al., 2013).

Se reportó que la exposición a ambientes con alto contenido de PM_{2.5} en diferentes ventanas de tiempos (4, 24, 48 horas, 7, 14 y 28 días) generan la subexpresión de los miRNAs miR-1, miR-126, miR-135a, miR-146a, miR-155, miR-21, miR-222 y miR-9 a los 7 días de exposición; la expresión de los miRNAs fue medida en sangre periférica de adultos mayores, posteriormente realizaron análisis *in silico* de los miRNAs desregulados y determinaron relación con genes de procesos inflamatorios, disfunción endotelial y coagulación, en específico involucrados en la vía de señalización de HMGB1/RAGE (Fossati et al., 2014).

Estudios *in vitro* han demostrado que las PM inducen la sobreexpresión del miR-375 en células epiteliales (pHBEC) que fueron expuestas a 3 µg/cm² de PM_{2.5}, este miRNA tiene como blanco de regulación al receptor de aril-hidrocarburos (AhR) con lo cual modifica su expresión (Bleck et al., 2013). En células A549 expuestas a 100 µg/mL de PM_{2.5} se reportó la subexpresión del miR-1228-5p, el cual puede modular la apoptosis a través de la vía dependiente de la mitocondria (Li, 2016) y la subexpresión del miR-802 se encontró tanto en cultivos de células epiteliales de pulmón A549 expuestas a 500 µg/mL de PM_{2.5} como en el suero de ratones que fueron expuestos a 0.3 mg/m³ de PM_{2.5} y en el suero de habitantes de ciudades con niveles moderados de contaminación (29.51-78.34 µg/m³) (Li, 2016b).

En otro de los estudios realizados *in vitro*, se analizó el efecto de la fracción orgánica y la fracción inorgánica extraídas de las PM_{2.5} sobre la expresión de miRNAs en células de pulmón. En este trabajo reportaron cambios de en la expresión de 62 miRNAs por la fracción orgánica y 37 miRNAs en la inorgánica; del total de miRNAs solo el miR-545 y el miR-1268a resultaron desregulados en ambas fracciones. En relación a los blancos de regulación se determinaron de acuerdo a análisis bioinformáticos de los miRNAs desregulados cambios en vías de metabolismo celular, genes de replicación de DNA y ciclo celular (Jeong et al., 2016).

En la tabla 2 se resume la información sobre los trabajos previos reportados. A pesar de que en cada uno de los estudios se evalúan modelos y concentraciones distintas, observamos en general que las PM son capaces de inducir alteraciones a nivel de miRNAs.

Tabla 2. Estudios en los que se ha evaluado el efecto de las PM en los miRNAs

Autor	Exposición	Método	miRNAs	Vías funcionales
<i>Bollati et al. 2010</i>	Ocupacional (planta de producción de acero) -PM con alto contenido de metales. -Medición en leucocitos	qRT-PCR	Sobreexpresión miR-222, miR-21	-Estrés oxidante -Procesos inflamatorios
<i>Motta et al. 2013</i>	Ocupacional (planta de producción de acero) -PM con alto contenido de metales. -Medición en leucocitos	Microarreglos Affymetrix	Sobreexpresión let-7g, miR-29a, miR-146 y miR-421 miR-302c, miR-128	-Procesos inflamatorios -Respuesta a tóxicos
<i>Fossati et al. 2014</i>	Ambiental -Cohorte -PM _{2.5} con alto contenido de metales. -Medición en leucocitos	qRT-PCR	Sub-expresión miR-1, miR-126, miR-135a, miR-146a, miR-155, miR-21, miR-222 y miR-9	-Respuesta inmune -Función endotelial -Inflamación
<i>Pan et al. 2015</i>	Ambiental -Comparación de la expresión en tumores de pulmón	qRT-PCR	Sub-expresión miR-144	-Transición epitelio mesénquima
<i>Bleck et al. 2013</i>	In vitro -PM _{2.5} (3 µg/cm ²) -Células bronquio-epiteliales (pHBEC).	qRT-PCR	Sobreexpresión del miR-375	-AhR como posible blanco
<i>Li et al. 2016</i>	In vitro -PM _{2.5} (500 µg/mL) -Células A549	Microarreglos (Exiqon) qRT-PCR	Subexpresión del miR-802	-Rnd3 Desregulación del citoesqueleto de actina
<i>Li et al. 2016</i>	In vitro -PM _{2.5} (100 µg/mL) -Células A549	Microarreglos (Exiqon)	Subexpresión del miR-1228	-Inducción de apoptosis vía mitocondrial
<i>Jeong et al. 2016</i>	In vitro -Célula A549 -PM _{2.5} (IL20) (fracción orgánica e inorgánica) -24h de exposición	Microarreglos (Agilent Technologies)	Fracción Orgánica Sobreexpresión-32 Subexpresión-30 Fracción Inorgánica Sobreexpresión-11 Subexpresión-26 miR-545, miR-1268a en ambas fracciones.	Orgánica -Replicación de DNA -Regulación del ciclo celular Inorgánica -ROS -Respuesta a metales -Procesos metabólicos

2 JUSTIFICACIÓN

Las PM están asociadas al desarrollo de cáncer pulmonar, en este contexto, los estudios toxicológicos previos han descrito alteraciones importantes a nivel celular y genético, sin embargo no se han encontrado efectos de tipo mutagénicos que expliquen estos cambios, por lo que es necesario profundizar en el estudio de otros mecanismos celulares y moleculares que podrían estar implicados en la carcinogénesis pulmonar.

Los miRNAs son candidatos importantes a ser estudiados ya que regulan la expresión génica de gran parte del genoma manteniendo la homeostasis celular, además se ha reportado en tejido pulmonar que los cambios en los patrones de expresión conllevan al desarrollo de neoplasias por la alteración de diferentes genes.

Por lo anterior es importante estudiar los cambios que las PM₁₀ inducen en la expresión de miRNAs con el fin de determinar su participación en la alteración de vías funcionales que podrían tener como consecuencia un proceso carcinogénico derivado de la exposición a partículas suspendidas.

3 HIPÓTESIS

Las PM₁₀ inducirán cambios en los perfiles de expresión de miRNAs encargados de regular genes implicados en el ciclo celular, vías de proliferación, apoptosis y respuesta ante daño a DNA en células epiteliales de pulmón.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar los cambios de expresión en los miRNAs de células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas y realizar la asociación de los miRNAs desregulados con sus posibles genes blancos.

4.2 Objetivos Particulares

- Realizar una curva de viabilidad en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24, 48 y 72 horas para determinar las condiciones del cultivo en condiciones de exposición prolongada.
- Determinar la expresión de miRNAs en células expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas.
- Analizar las vías en las que participan los miRNAs desregulados a través de programas bioinformáticos.
- Asociar la participación de los miRNAs desregulados con el posible desarrollo de cáncer a través de los mRNAs blancos que regulan.

5 METODOLOGÍA

5.1 Recolección de PM₁₀

Las PM₁₀ utilizadas en este trabajo se colectaron en la Zona Urbana Residencial (ZUR) de la CDMX (ubicada en Ciudad Universitaria, UNAM, Instituto de Ciencias de la Atmósfera) en el año 2007 utilizando un colector de partículas de grandes volúmenes con un flujo de 1.13 m³/min (GMW modelo 1200 VFCHVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA) equipado con filtros de nitrocelulosa (Sartorius AG, Goettingen, Germany). Después de las colectas, los filtros de nitrocelulosa se mantuvieron en un desecador a 4°C en obscuridad y las PM se recuperaron por medio del raspado de las membranas con ayuda de una navaja de bisturí estéril. Las PM se guardaron en viales de vidrio libres de contaminantes y se mantuvieron en obscuridad a 4°C hasta su uso.

5.2 Cultivo celular

Se utilizaron células A549 (células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de pulmón humano) obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection, No. CCL-185) las cuales fueron descongeladas y cultivadas según recomendaciones de la ATCC con medio de cultivo F12K (Gibco, No. 21127-022), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, No.: 160000) a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO₂.

5.3 Exposición a PM₁₀

Se sembraron 95,000 células en pozos de 3.8 cm². Después de 24 horas de la siembra se realizó cambio de medio de cultivo. Las PM₁₀ fueron esterilizadas y se resuspendieron en medio de cultivo F12K+10% de SFB (1 mg/ml), antes de la exposición se sometieron a agitación en vórtex por dos minutos y se adicionaron al pozo de cultivo en las células A549 (10 µg/cm² de PM₁₀) las cuales se dejaron incubar por 24, 48 y 72 horas. De forma paralela se mantuvieron células sin exponer a partículas (CT) cultivadas bajo las mismas condiciones.

5.4 Ensayo de viabilidad celular

Posterior a la exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24, 48 y 72 horas, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de cristal violeta (Feoktistova et al., 2016). En esta técnica se consideran células vivas aquellas que se encuentren adheridas a la placa y que retengan el colorante cristal violeta, el cual puede unirse a proteínas y DNA. En este ensayo el exceso de colorante es lavado de la placa y sólo el cristal violeta que fue absorbido por las células se extrae mediante el ácido acético, posteriormente se evalúa la absorbancia a 570 nm ya que existe una relación entre la densidad óptica del colorante que se encontraba en las células y el número de células adheridas (Feoktistova et al., 2016).

Para este ensayo transcurridas las horas de exposición, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con 100 µL de paraformaldehído al 4% (por pozo) durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente se retiró el paraformaldehído y se añadieron 100 µL de cristal violeta al 0.1% (por pozo), manteniendo la placa en agitación durante 10

minutos. Pasado este tiempo la placa se lavó con agua corriente para retirar el exceso de colorante. Por último se colocaron 50 µL de ácido acético al 33% (por pozo) y se mantuvo en agitación por 10 minutos, para finalizar el ensayo se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro Infinite 200 Pro NanoQuant (Tecan Trading AG, Switzerland).

La viabilidad celular fue reportada en porcentaje y se calculó tomando como 100% la densidad óptica de las células sin exposición (CT), con este dato se comparó la lectura obtenida en las células expuestas (PM₁₀). Con los resultados obtenidos en este ensayo se determinó realizar la exposición a 72 horas para la posterior evaluación de miRNAs.

5.5 Extracción de RNA

Las células A549 se expusieron a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas y se realizó la extracción de RNA total utilizando TRIZOL (Ambion, No. 15596018) bajo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y siguiendo el protocolo que se menciona a continuación.

Se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos de la placa, las células se lavaron con 1 ml de PBS el cual se retiró para colocar 1 ml de trizol con el fin de lisar las células. El contenido (lisis) se colocó en microtubos de 1.5 ml y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma, No, 2006638) a cada tubo, se taparon y agitaron vigorosamente por 20 segundos, se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Después la mezcla se separó en 3 fases (orgánica, interfase y acuosa), con una punta se recuperó la fase acuosa y se procedió a precipitar el RNA utilizando 500 µl de Isopropanol (Sigma, No. I9516), la mezcla se incubo por 10 minutos a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue decantado y el botón formado que se observó en el fondo del tubo se lavó con 1 ml de etanol al 75%, sometiendo cada tubo a la agitación en el Vórtex, los tubos se centrifugaron a 7000 rpm por 8 minutos a 4°C. Para finalizar el procedimiento se retiró el sobrenadante y se dejó secar el botón, posteriormente se resuspendió en 40 µl de agua libre de RNAsas.

5.6 Cuantificación, análisis de calidad e integridad del RNA

Posterior a la extracción de RNA total se realizó la cuantificación y se determinó la pureza del RNA a través de la relación A260/280 (nucleótidos/proteínas) mediante la lectura de 1 µl de la muestra de RNA en el espectrofotómetro (Nanodrop Thermo Scientific Wilmington, DE, USA). Se estableció que solo las muestras con un valor A260/280 mayor a 1.8 serían utilizarían para la hibridación en los microarreglos.

Para determinar la integridad del RNA se realizaron dos pruebas, la primera fue la corrida electroforética en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (0.01µg/ml) a 100 V por 1 hora, para lo cual se utilizaron 500 ng de RNA de cada muestra. Los geles fueron visualizados en el sistema de imágenes GEL LOGIC200 (ImagingSystem, KODAK).

Como segunda prueba, las muestras de RNA se sometieron al análisis de integridad (RIN) mediante electroforesis capilar en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, USA), considerando como muestras con alta calidad aquellas con un Número de Integridad del RNA (RIN) mayor a 8. Tanto la prueba de corrida electroforética en gel de agarosa como el RIN se basan en la relación 2 a 1 entre los RNAs 28S y 18S (Schroeder et al., 2006).

5.7 Hibridación en microarreglos de miRNAs

El análisis de expresión de microRNAs posterior a la exposición a PM₁₀ se realizó a través del uso de la plataforma de microarreglos Affymetrix (GeneChip miRNA Arrays 4.0). El microarreglo incluye las secuencias de 2,578 miRNAs maduros descritos en el registro Sanger miRNA (miRBASe 20).

Las muestras obtenidas en la extracción de RNA total fueron marcadas, lavadas e hibridadas en los arreglos de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Affymetrix). Posterior a la hibridación de los arreglos se utilizó el escáner GeneChip para obtener las imágenes fluorescentes y utilizarlas para cuantificar la expresión de los miRNAs.

5.8 Análisis de microRNAs

Las imágenes escaneadas de los microarreglos fueron examinadas para comprobar que presentaban hibridación uniforme y no tuvieran defectos físicos, tal como partículas de polvo o regiones sin señal. Posteriormente los archivos de imagen fueron importados al software Partek Genomics Suite 6.6 (Partek Inc, St. Louis, MO, USA), en el cual se realizó el análisis de control de calidad basado en la medición de la intensidad de las sondas spike (bio-C, bio-D, bio-E) y las sondas background incluidas en el microarreglo, como se señala en la figura 4.

Se utilizó el método RMA (robust multi-array average) para la normalización de datos y la suma de las señales de las sondas con el método median polish. Posteriormente se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar los miRNAs expresados diferencialmente entre las muestras expuestas a PM₁₀ y sin exposición.

Los parámetros utilizados fueron un Fold Change (el cual se refiere al número de veces que cambia el valor de la expresión respecto al control) de 1.5 y un valor de $p \leq 0.05$. El análisis de miRNAs incluyó 3 réplicas internas con las que se hizo una mezcla (pull) y 3 réplicas técnicas.

5.9 Identificación de genes blanco de microRNAs

Para predecir los blanco de los miRNAs que resultaron desregulados, se realizaron análisis bioinformáticos en el software mirPath v.3, disponible en <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/dianauniverse/index.php?r=mirpath>, en el cual se utilizó el algoritmo Diana-microT-CDS y TargetScan. En este análisis se consideró la presencia de 7-8 sitios conservados correspondientes a la región “semilla” de cada miRNA, este análisis permitió obtener los blancos biológicos (mRNA) tanto de interacciones predichas como validadas previamente entre mRNA-miRNA.

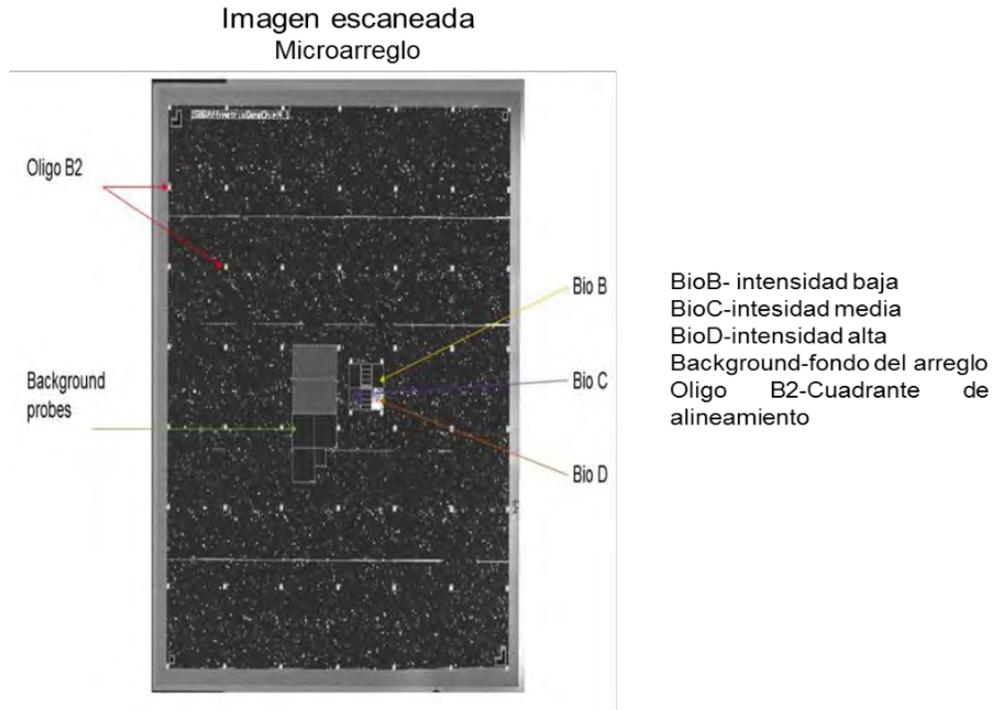


Figura 4. Microarreglo de miRNAs

Imagen escaneada de un microarreglo de miRNAs (Affymetrix gene chip 4.0) en el que se señalan las sondas control. En la imagen se puede observar hibridación uniforme en todo el arreglo.

5.10 Análisis de vías funcionales y procesos biológicos

Con la finalidad de determinar las vías en las que podrían tener impacto los miRNAs desregulados realizamos un análisis de enriquecimiento y anotación en el que fueron representadas las vías funcionales en las que participan el conjunto de genes blanco utilizando, la base y algoritmo DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov/>).

De cada lista de miRNAs (subexpresados y sobreexpresados), se realizó la construcción de redes de conectividad, con el fin de mostrar de forma esquemática las interacciones entre los miRNAs desregulados y los genes blanco mRNAs y señalar los procesos biológicos en los que tienen mayor impacto los miRNAs desregulados. Las redes fueron construidas utilizando el software Cytoscape 3.4.0 (<http://www.cytoscape.org/>).

5.11 Validación de miRNAs candidatos a través de qRT-PCR

Se seleccionaron 5 miRNAs subexpresados y 5 miRNAs sobreexpresados para ser analizarlos a través de qRT-PCR, y así validar los cambios de expresión encontrados en los microarreglos, posteriormente se realizó el diseño de los oligos de los 10 miRNAs a validar, procurando que todos tuvieran una temperatura de alineación de 60°C. En la siguiente tabla se muestran las secuencias de los oligos de miRNAs utilizadas.

miRNA	Secuencia del oligonucleótido
hsa-miR-27b-5p	AGAGCTTAGCTGATTGGTGAAC
hsa-miR-28-3p	ACTAGATTGTGAGCTCCTGGAA
hsa-miR-30c-5p	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
hsa-miR-181a-5p	CATTCAACGCTGTCGGTGAG
hsa-miR-1227-3p	GCCACCCTTTTCCCCAGAAA
hsa-miR-3149	GGTTTGTATGGATATGTGTGTGUAT
hsa-miR-4274	GCAGTCCCTCCCCCTGAA
hsa-miR-4763-3p	CTGGTGCTGGGCGGGAAA
hsa-miR-6808-5p	CAGGGAGGUGGGACCAUG
hsa-miR-8063	CAAATCAGGAGTCGGGGCT

Para el qRT-PCR se utilizó el kit Mir-X miRNA First-Strand Synthesis (Takara, Clontech, No. 638313) and SYBR Advantage qRT-PCR Premix (Takara, Clontech, No. 639676). Se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de 500 ng de RNA en un solo ciclo con una etapa de 37°C por una hora y una etapa de 85°C por cinco minutos, obteniendo un volumen final de 100 µL de cDNA.

Para el PCR se preparó un volumen final de 20 µL por reacción, para lo cual se combinaron 2 µL de cDNA, 12.5 µL de SYBR advantage premix (2x), 0.5 µL del oligo sentido 10 µM, 0.5 µL del oligo mRQ 3' (incluido en el kit), 0.5 µL de ROX Dye (50x) y 4 µL de ddH₂O. De cada muestra se realizó la corrida por triplicado.

En el termociclador StepOne plus (Applied biosystems, No. 4376600) se siguió el programa descrito a continuación:

- Desnaturalización: 1 ciclo de 95°C por 10 segundos.
- Amplificación: 40 ciclos con una etapa de 95°C por 5 segundos y una segunda etapa de 60°C por 20 segundos.
- Disociación: 1 ciclo dividido en una etapa de 95°C por 60 segundos, segunda etapa de 55°C por 30 segundos y tercera etapa de 95°C por 30 segundos.

La expresión de cada miRNA fue calculada por el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta}$), para el que se utilizó la amplificación del gen endógeno snRNAU6 como parámetro de normalización.

6 RESULTADOS

6.1 Viabilidad de células A549 expuestas a PM₁₀

Con el fin de determinar que la concentración y tiempos a los que fueron expuestas las células A549 no comprometieran la viabilidad celular, se determinó la viabilidad posterior a la exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24, 48 y 72 horas mediante el método de cristal violeta.

Se encontró que la exposición a PM₁₀ no genera cambios en la viabilidad celular en ninguno de los tiempos de exposición, como se puede observar en la figura 5. De acuerdo a estos resultados se decidió realizar la exposición a PM₁₀ por 72 horas, ya que al considerar 10 µg/cm² como una concentración subletal fue posible evaluar las alteraciones en los miRNAs simulando una exposición prolongada.

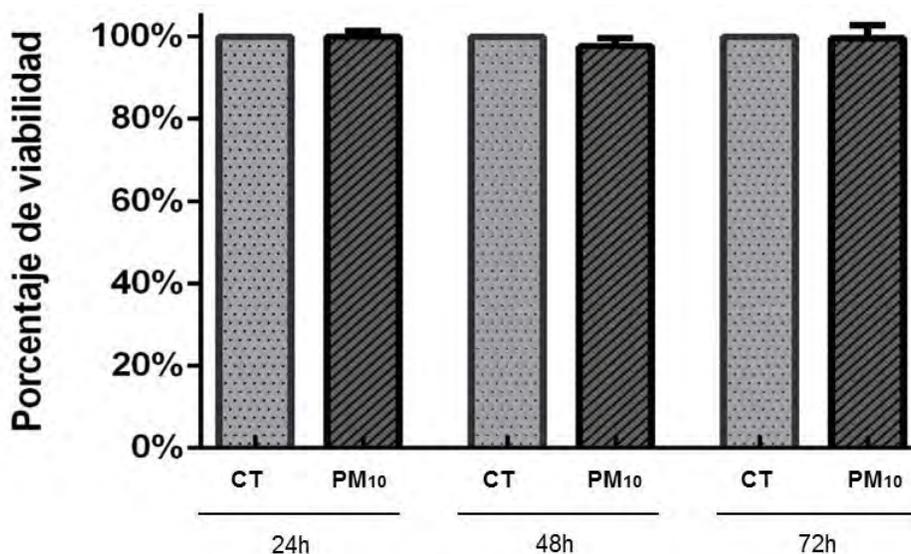


Figura 5. Evaluación de la viabilidad celular

La exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24, 48 y 72 horas no induce cambios en la viabilidad celular en A549 en ninguno de los tiempos. CT- células sin exposición, PM₁₀-células expuestas a PM₁₀.

6.1 Obtención de RNA de células A549

Posterior a la exposición de las células A549 a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , se realizó la extracción de RNA total con trizol, tanto de células sin exponer como de células expuestas. Para verificar que las muestras pudieran ser utilizadas para la hibridación en microarreglos, se determinaron los siguientes parámetros: un índice $\text{A260}/\text{280} \geq 1.8$, relación 2:1 entre las bandas ribosomales 28S:18S y un $\text{RIN} \geq 8$.

En todas las muestras se obtuvo un índice $\text{A260}/\text{280}$ igual o mayor a los valores establecidos como se muestra en la tabla 3. Por otra parte observamos en los geles de agarosa que todas las muestras se encontraban íntegras, lo cual fue confirmado mediante el bioanalizador con el RIN. En la figura 6A se muestran un gel representativo de las muestras de RNA obtenidas y en la figura 6B los electroferogramas correspondientes.

Tabla 3. Resultados de análisis de calidad de muestras de RNA

Muestra	A260/280	RIN
72hCT-1	1.81	9.3
72hCT-2	1.88	9.1
72hCT-3	1.82	9
72h PM_{10} -1	1.8	9.1
72h PM_{10} -2	1.82	9.3
72h PM_{10} -3	1.9	9.2

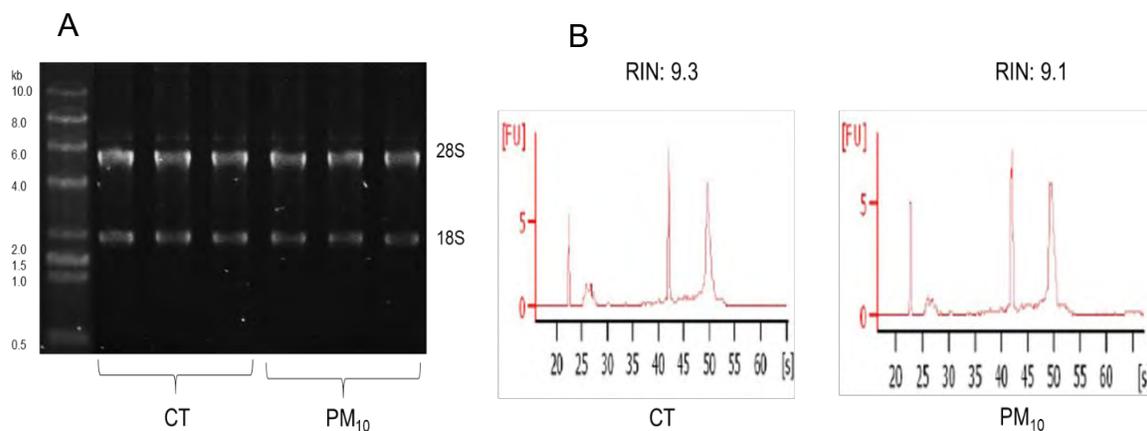


Figura 6. Análisis de calidad del RNA

Resultados de integridad de 6 muestras de RNA (A) Gel de agarosa en el que se observa la relación 2 a 1 entre las bandas 28S y 18S (B) Electroferogramas representativos del RIN. Ambos análisis confirma que el RNA se encuentra íntegro y puede ser utilizado para la hibridación en los microarreglos. CT- células sin exposición, PM_{10} -células expuestas a PM_{10} ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

6.2 Hibridación y análisis de calidad de los microarreglos

Posterior a la hibridación de las muestras de RNA en los microarreglos se llevó a cabo el análisis de control de calidad. Esta etapa es fundamental cuando se trabaja con esta técnica, ya que nos permite verificar que no existan artefactos técnicos como burbujas, raspones o zona con hibridación fallida que pudieran afectar los datos de expresión de los miRNAs. La prueba de control de calidad mostró que los 6 microarreglos se encontraban en condiciones óptimas para su posterior análisis comparativo.

En la figura 7A se muestran dos imágenes escaneadas representativas de los microarreglos analizados. En la imagen del lado izquierdo se encuentra un microarreglo de 72 horas sin exposición (CT) y del lado derecho un microarreglo de 72 horas de exposición a PM₁₀. En ambos arreglos se puede observar una hibridación uniforme, indicando que el microarreglo se encuentra hibridado y lavado correctamente. En la figura 7B se presenta la gráfica del análisis de calidad de los 6 microarreglos analizados en el software Partek Genomics. Observamos que todas las sondas tuvieron valores consistentes y correspondientes para cada intensidad de fluorescencia (baja, media y alta). Todos los arreglos fueron de alta calidad.

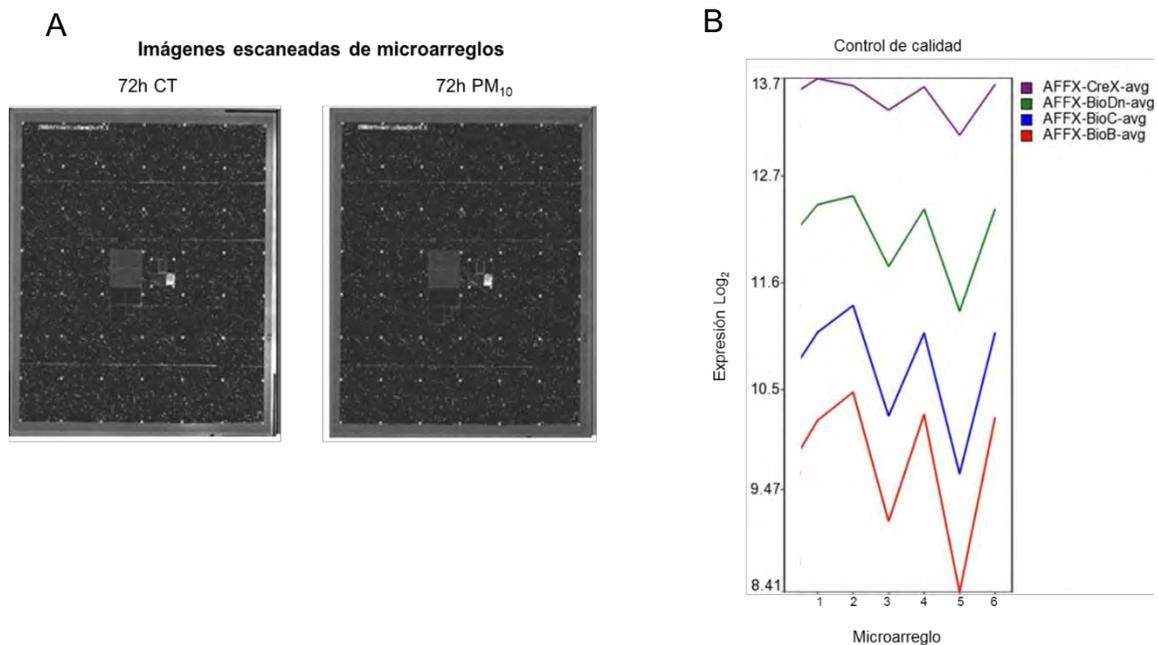


Figura 7. Análisis de control de calidad de microarreglos

Se realizó la hibridación en los microarreglos de miRNAs. (A) Dos imágenes representativas de los 6 arreglos analizados, en ambas se observa hibridación uniforme y ningún artefacto técnico (B) Gráfica de valores de fluorescencia de las sondas control en cada uno de los arreglos. CT-células sin exposición, PM₁₀-células expuestas a PM₁₀ (10 µg/cm²).

6.4 Cambios de expresión en miRNAs inducidos por PM₁₀

Para determinar los cambios que las PM₁₀ inducen en la expresión de los miRNAs, se analizó por medio de microarreglos, el nivel de expresión de 2,578 miRNAs posterior a la exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas. La figura 8A muestra los resultados del análisis estadístico ANOVA mediante una gráfica de volcán, en la cual cada punto representa un miRNA individual; en el eje “x” se encuentra el nivel de cambio o fold change (FC 1.5) y en el eje “y” el valor de p (≤0.05). En la figura 8B se encuentra el número de miRNAs que presentan cambios significativos de expresión. En total 45 se encuentran subexpresados y 29 se encuentran sobreexpresados. En la tabla 4 y 5 se encuentran los miRNAs expresados diferencialmente posterior a la exposición a PM₁₀.

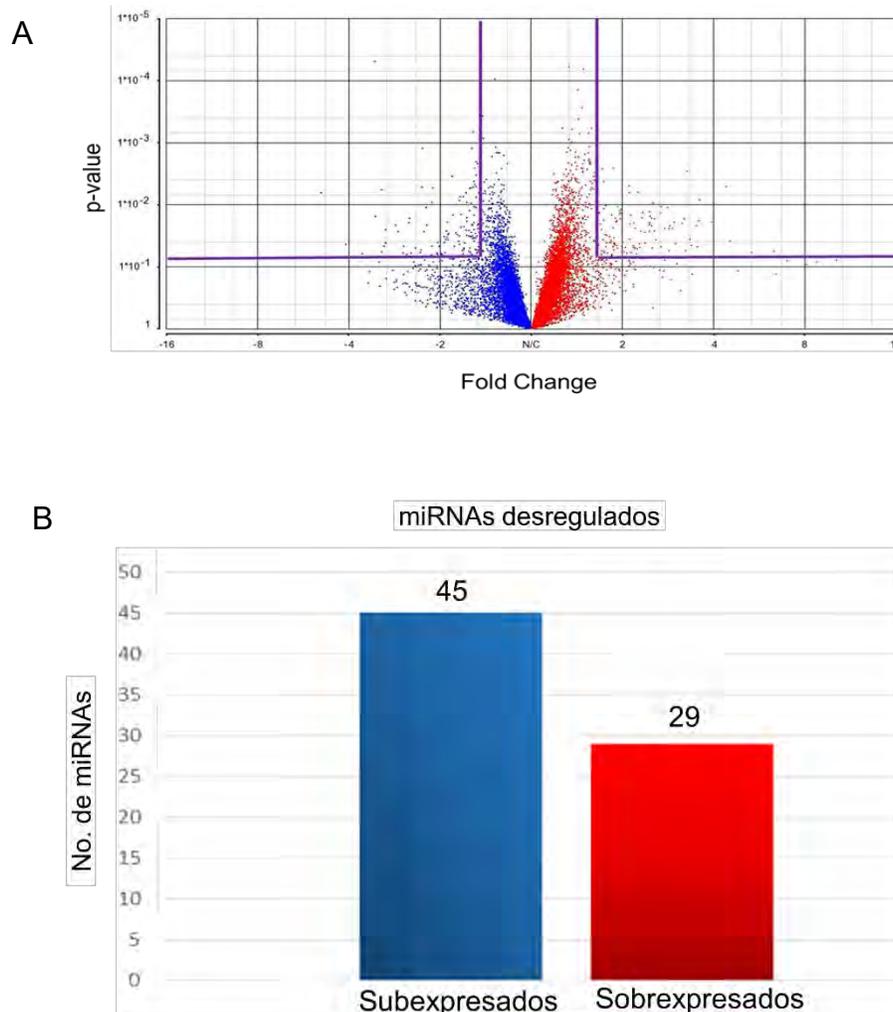


Figura 8. Cambios en la expresión de miRNAs inducidos por PM₁₀.

Células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas (A) Gráfica de Volcán en la cual se representa la expresión diferencial de miRNAs. Las líneas moradas delimitan el área en la que los miRNAs presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a las células sin exponer, (B) Construcción gráfica del número de miRNAs con cambios significativos respecto a las células sin exponer. Azul-subexpresión. Rojo-sobreexpresión.

Tabla 4. Lista de microRNAs subexpresados en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas

Nombre del microRNA	Fold-Change	p-value
hsa-miR-181a-5p	-1.60	0.019
hsa-mir-203a	-1.54	0.026
hsa-mir-498	-1.57	0.002
hsa-mir-548ab	-1.51	0.003
hsa-miR-615-5p	-1.58	0.027
hsa-miR-663a	-2.19	0.049
hsa-miR-762	-1.82	0.033
hsa-miR-767-3p	-1.62	0.002
hsa-miR-1227-3p	-1.54	0.011
hsa-mir-1281	-1.76	0.013
hsa-miR-1469	-2.35	0.012
hsa-miR-2861	-2.00	0.037
hsa-miR-3135b	-1.92	0.022
hsa-miR-3178	-1.90	0.050
hsa-miR-3606-5p	-1.56	0.001
hsa-miR-3685	-1.68	0.005
hsa-miR-3940-5p	-1.88	0.039
hsa-miR-4274	-1.65	0.025
hsa-mir-4281	-1.79	0.029
hsa-mir-4285	-1.58	0.007
hsa-miR-4497	-2.16	0.011
hsa-miR-4516	-1.85	0.049
hsa-miR-4674	-2.99	0.034

Nombre del microRNA	Fold-Change	p-value
hsa-mir-4716	-1.62	0.012
hsa-miR-4734	-2.45	0.017
hsa-miR-4745-5p	-2.51	0.033
hsa-miR-4758-3p	-1.72	0.039
hsa-miR-4758-5p	-2.13	0.017
hsa-miR-4763-3p	-2.03	0.007
hsa-miR-5001-5p	-2.13	0.018
hsa-mir-6511a	-1.96	0.010
hsa-mir-6511b	-1.96	0.010
hsa-miR-6724-5p	-1.98	0.043
hsa-mir-6743	-1.67	0.001
hsa-miR-6790-5p	-2.95	0.048
hsa-miR-6791-5p	-1.83	0.033
hsa-mir-6800	-2.17	0.030
hsa-miR-6800-5p	-2.71	0.016
hsa-miR-6821-5p	-1.92	0.035
hsa-mir-6836	-1.91	0.009
hsa-miR-6850-5p	-2.23	0.014
hsa-miR-6865-3p	-1.54	0.044
hsa-miR-6872-3p	-1.75	0.006
hsa-miR-8063	-3.30	0.022
hsa-miR-8069	-1.92	0.025

Tabla 5. Lista de microRNAs sobreexpresados en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 72 horas

Nombre del microRNA	Fold-Change	p-value
hsa-miR-27b-5p	2.95	0.020
hsa-miR-28-3p	1.69	0.025
hsa-miR-30c-5p	1.63	0.004
hsa-miR-32-5p	1.55	0.018
hsa-miR-125a-3p	2.22	0.031
hsa-miR-193b-5p	1.50	0.027
hsa-miR-320e	1.52	0.017
hsa-miR-324-3p	1.89	0.003
hsa-mir-517a	1.79	0.029
hsa-miR-550a-3p	1.83	0.048
hsa-miR-559	1.53	0.026
hsa-miR-1184	2.36	0.017
hsa-miR-1298-3p	2.39	0.038
hsa-miR-3147	2.64	0.011
hsa-miR-3149	1.52	0.036
hsa-mir-3611	1.65	0.038
hsa-mir-365a	1.51	0.038
hsa-miR-4448	4.82	0.000
hsa-mir-4679-1	1.58	0.048
hsa-miR-4695-3p	1.56	0.028
hsa-miR-4727-3p	1.69	0.047
hsa-miR-4788	1.93	0.039
hsa-miR-5684	1.53	0.012
hsa-miR-6510-5p	2.45	0.016
hsa-miR-6743-3p	2.08	0.000
hsa-miR-6756-3p	1.57	0.030
hsa-miR-6808-5p	3.14	0.040
hsa-miR-6886-5p	1.77	0.048
hsa-miR-8081	1.54	0.002

6.5 Genes blanco potenciales de los miRNAs subexpresados obtenidos en los análisis bioinformáticos

Para analizar los mecanismos moleculares que podrían encontrarse alterados en relación a los cambios de expresión de los miRNAs, se realizaron análisis bioinformáticos de predicción en los que se obtuvieron los genes blanco potenciales y posteriormente éstos genes fueron clasificados de acuerdo a las vías funcionales y a los procesos biológicos en los que participan.

Mediante predicciones bioinformáticas se determinó que los 45 miRNAs subexpresados por la exposición a PM₁₀, pueden regular la expresión de más de 5,000 genes y con base en el análisis de vías funcionales, los miRNAs subexpresados participan en diferentes vías de señalización, entre las que se encuentran Wnt, cAMP, mTOR, VEGF e inducen cambios moléculas de adhesión celular.

En la figura 9 se resumen las principales vías ordenadas de acuerdo el número de genes blanco potenciales que participan en cada una. En la tabla 6 incluida en la sección de anexos se encuentran todas las vías que resultaron del análisis.

Entre los procesos biológicos en los que participan los miRNAs subexpresados se encuentran proliferación celular, regulación de ciclo celular, respuesta ante daño al DNA, regulación de apoptosis, mecanismos de reparación del DNA, migración celular, organización del citoesqueleto de actina, adhesión celular, regulación de autofagia, respuesta a hipoxia, respuesta a estrés oxidante, metabolismo de glucosa, regulación de AMPc , modificación de histonas y repuesta inflamatoria.

De manera puntual los miRNAs subexpresados participan en la regulación de proliferación, ciclo celular, respuesta ante daño a DNA, reparación de DNA, autofagia y modificaciones de citoesqueleto de actina. En la Red de interacción biológica (conectividad), esquematizada en la figura 10, se encuentran representados procesos celulares, elegidos por su asociación con la carcinogénesis.

miRNAs subexpresados



Figura 9. Vías funcionales asociadas a los miRNAs subexpresados

De acuerdo a los análisis bioinformáticos en relación a los posibles genes blanco que regulan los miRNAs subexpresados, se determinaron a través de un análisis de enriquecimiento las vías de señalización en las que podría tener impacto la subexpresión de los miRNAs.

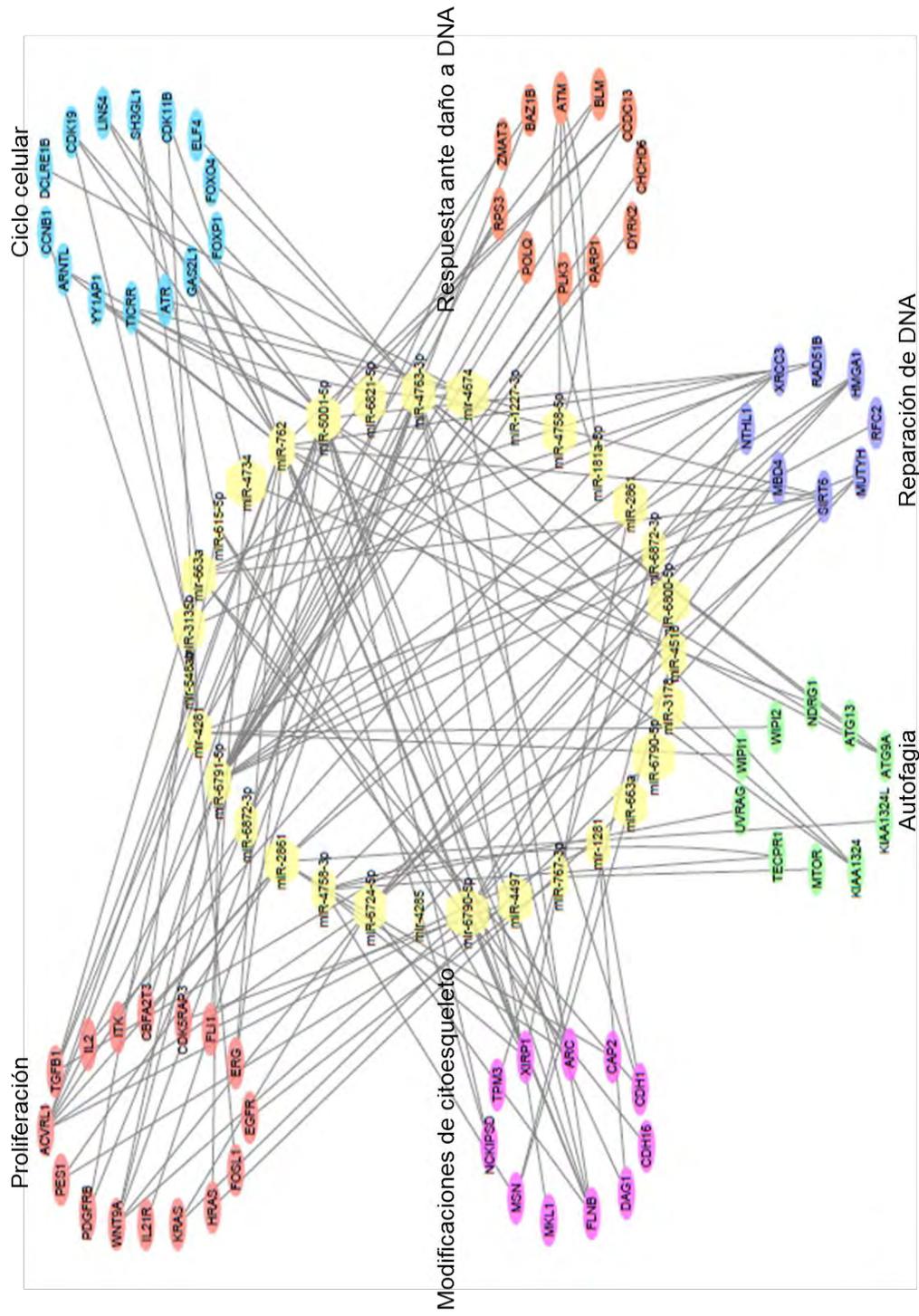


Figura 10. Red de conectividad entre miRNAs-mRNAs. Red de miRNAs subexpresados que muestra los procesos biológicos en los que pueden participar y los genes a los que regula de acuerdo a la predicción bioinformática.

6.6 Genes blanco potenciales de los miRNAs sobreexpresados obtenidos en los análisis bioinformáticos

En relación a los 29 miRNAs sobreexpresados el análisis de predicción arrojó que estos miRNAs pueden regular la expresión de más de 3,000 genes. El análisis de vías de señalización mostró que éstos miRNAs participan en la vía de señalización de p53, TGF- β , Foxo, Ras, MAPK, además de genera modificaciones en el citoesqueleto de actina, adhesiones celulares y metabolismo como se puede observar en la figura 11, en la cual se ordenan la vías de acuerdo al número de genes. En la tabla 7 incluida en la sección anexos se encuentran todas las vías que resultaron del análisis.

En relación a los procesos biológicos se determinó que la subexpresión de miRNAs tiene impacto en proliferación celular, regulación de ciclo celular, respuesta ante daño al DNA, reparación de doble cadena de DNA, regulación de apoptosis, filamentos de actina, angiogénesis, regulación epigenética, deacetilación de histonas, respuesta ante sustancias orgánicas, metabolismo de xenobióticos.

En la Red de interacción biológica, representada en la figura 12 se encuentran los procesos celulares que se asocian principalmente con la carcinogénesis en lo que los miRNAs sobreexpresados podrían tener impacto. De manera puntual encontramos que los miRNAs participan en la regulación de genes antiproliferativos, apoptóticos, reguladores de ciclo celular, respuesta ante daño a DNA, reparación de DNA, modificaciones de citoesqueleto y metabolismo de xenobióticos.

miRNAs sobreexpresados



Figura 11. Vías funcionales asociadas a los miRNAs sobreexpresados

De acuerdo a los posibles genes blancos que regulan los miRNAs sobreexpresados, se determinaron a través de un análisis de enriquecimiento las vías de señalización en las que podría tener impacto la sobreexpresión de los miRNAs.

6.7 Validación de resultados a través de qRT-PCR

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos en los microarreglos, fueron seleccionados 5 miRNAs subexpresados y 5 miRNAs sobreexpresados de acuerdo a su participación en los procesos biológicos y vías relacionadas al cáncer. Los miRNAs se analizaron mediante la técnica de qRT-PCR.

En 7 de los 10 miRNAs analizados, obtuvimos resultados coincidentes entre las dos técnicas. En la figura 13 se observan los valores obtenidos para cada uno de los miRNAs seleccionados en ambas técnicas.

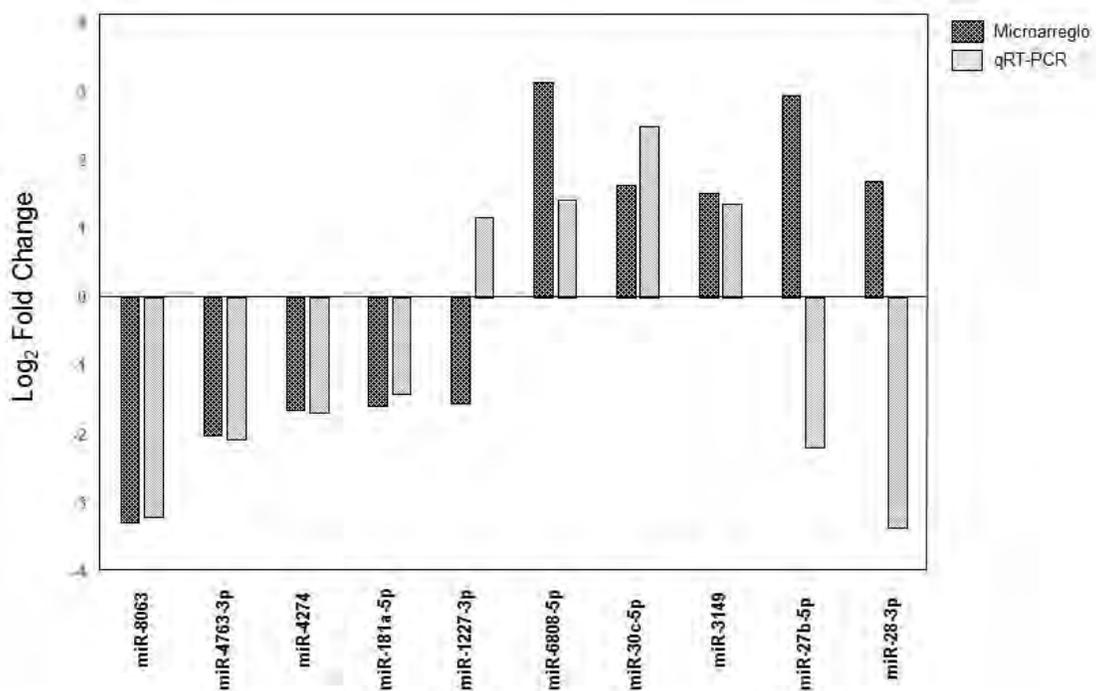


Figura 13. Evaluación de la expresión de miRNAs mediante microarreglos y qRT-PCR

Fueron seleccionados 10 miRNAs para su validación mediante qRT-PCR. 7 de los 10 miRNAs analizados tuvieron coincidencia entre los valores de ambas técnicas. El eje Y representa el Fold Change (log₂), en el cual valores positivos indican sobreexpresión y valores negativos indican subexpresión.

7 DISCUSIÓN

Las Partículas Suspendidas (PM), son uno de los principales contaminantes del aire que se han relacionado con el desarrollo de diferentes neoplasias, incluyendo el cáncer de pulmón (Pope et al., 2002; Chen et al., 2016a) y han sido clasificadas como un carcinógeno para los humanos (Loomis et al., 2014). Aún es necesario realizar estudios para profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos a través de los cuales las PM tienen implicaciones en el desarrollo de cáncer. En este trabajo se investigó el efecto que las PM pueden ejercer en la expresión de los microRNAs en células epiteliales de pulmón A549, expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 72 horas, debido a que los miRNAs son moléculas que participan de manera importante en la regulación de diferentes genes.

Se consideró que la alteración de la expresión de los miRNAs generaría la desregulación de la expresión de genes que controlan diversas vías funcionales relacionadas al mantenimiento de la homeostasis celular, por lo que el estudio de los miRNAs contribuye a comprender como las PM representan un factor de riesgo en el cáncer de pulmón.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la línea celular A549, la cual proviene de un adenocarcinoma pulmonar, Esta línea celular cuenta con un perfil genético bien caracterizado (Nardone and Andrews, 1979; Calcabrini et al., 2004; Bonetta et al., 2009; Danielsen et al., 2009), por lo que se sabe que presenta pocas alteraciones en el genoma. Por mencionar un ejemplo el gen de TP53 no se encuentra mutado (Blanco et al., 2009). Además se ha reportado que éstas células presentan respuestas similares a las encontradas en otras líneas de pulmón que no derivan de un tumor de tipo canceroso, como son las BEAS-2B (Eurlings et al., 2014).

Las células A549 han sido utilizadas previamente para el estudio toxicológico de diferentes compuestos contaminantes, incluyendo la exposición a PM_{10} tanto en nuestro grupo, así como por otros grupos de trabajo (Nardone and Andrews, 1979; Foster et al., 1998; Bonetta et al., 2009; Bollati et al., 2015; Jeong et al., 2016; Reyes-Zarate et al., 2016). Por lo anterior consideramos que la línea celular A549 es un modelo adecuado para el estudio toxicológico de las PMs.

En este trabajo las células A549 fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24 y 48 horas y no encontramos cambios en la viabilidad celular en ninguno de éstos tiempos de exposición, lo cual es congruente con lo reportado previamente, tanto en nuestro grupo como en otros grupos de trabajo, en los que se ha establecido que la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ produce alteraciones moleculares y celulares, sin inducir cambios en la viabilidad celular, determinando que es una concentración sub-letal (Sanchez-Perez et al., 2009; Chirino et al., 2010; Ferecatu et al., 2010; Reyes-Zarate et al., 2016). Además actualmente la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se

considera como una concentración equivalente a la exposición ambiental de 5 días en humanos (Li et al., 2003).

También se analizó la viabilidad celular a las 72 horas de exposición, sobre la cual no se tenían reportes previos y observamos que las PM₁₀ tampoco inducen cambios en la viabilidad de las células comparado con las células sin exponer a este tiempo. Con estos resultados y con base en estudios previos, consideramos que tanto en una exposición aguda [24 horas] como en una exposición prolongada [72 horas] (Jeong et al., 2016), las células expuestas a PM₁₀ pueden sobrevivir incluso al presentar alteraciones y daños en diferentes mecanismos celulares, entre los que destaca el daño en el DNA (Bonetta et al., 2009; Sanchez-Perez et al., 2009) reportados previamente. Por esta razón y debido a que los seres humanos nos encontramos expuestos a la contaminación ambiental por PM de forma crónica y sostenida, se decidió realizar la evaluación de los cambios de expresión de los miRNAs a un tiempo de 72 horas por considerar esta condición una exposición prolongada.

Los miRNAs son moléculas que se encargan de regular diferentes eventos celulares y participan en la homeostasis celular, sin embargo se sabe que la desregulación de dichas moléculas tiene implicaciones en el desarrollo de diferentes neoplasias entre las que destacan el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer hepático (Jiang et al., 2010; Almeida et al., 2012; Hu et al., 2012; Huang et al., 2013; Jiang et al., 2013; Cheng et al., 2014; Tang et al., 2015; Zhang et al., 2015a).

En este trabajo se analizó la expresión de 2,578 miRNAs mediante microarreglos de Affymetrix 4.0, que es una plataforma bien validada y ampliamente empleada en los análisis de expresión, con lo cual se demostró que la exposición prolongada a PM₁₀ desregula la expresión de 74 miRNAs con un Fold Change igual o mayor a 1.5, de los cuales 45 se encontraron subexpresados y 29 sobreexpresados en comparación con las células no expuestas a PM₁₀.

De los 74 miRNAs que se encontraron desregulados en este trabajo, solo 6 miRNAs han sido reportados previamente ante la respuesta a PM (miR-1469, miR-3611, miR-3940-5p, miR-4516, miR-193b-5p y el miR-4281). En relación al miR-3611 que encontramos sobreexpresado, Li y colaboradores también lo reportan sobreexpresado en células A549 expuestas a PM_{2.5}. En este mismo trabajo los autores reportaron la sobreexpresión de los miRNAs miR-1469, miR-3940-5p y miR-4516 (Li et al., 2016), por el contrario nosotros encontramos éstos miRNAs subexpresados. Además Jeong y colaboradores utilizando las células A549 expuestas a la fracción orgánica de PM_{2.5} reportan la subexpresión del miR-4281 y la sobreexpresión del miR-193b-5p (Jeong et al., 2016) coincidente con nuestros resultados.

Por otra parte, en relación a los trabajos en los que se analizó en sangre periférica de individuos expuestos a PM los niveles de expresión de miRNAs, no encontramos coincidencias con los miRNAs desregulados en este trabajo, por ejemplo Bollati y colaboradores, reportan cambios en los miRNAs miR-222 y miR-21 (Bollati et al., 2010) y en este trabajo no se observaron desregulados ninguno de estos miRNAs.

Consideramos que las diferencias encontradas en la desregulación de los miRNAs entre los trabajos previos y nuestro trabajo podrían deberse a las características de las PM incluyendo la fracción, composición y concentración de materiales que contienen, haciendo énfasis en que las PM provienen de ciudades distintas y se conoce que los componentes y su concentración pueden variar de manera importante de acuerdo a la zona y temporada del año (Alfaro-Moreno et al., 2002; Osornio-Vargas et al., 2003; Zhang et al., 2016).

Respecto a los componentes presentes en las PM, encontramos que trabajos anteriores realizados con metales como el Cd y Cr reportan cambios en la expresión de miRNAs, entre los que se encuentran el miR-125, miR-27b-3p y miR-3940-5p (Li et al., 2014; Liu et al., 2015; Chen et al., 2016b). Además Li y colaboradores reportan la desregulación de los miRNA miR-1469, miR-3611, miR-3940-5p, miR-4516 en células expuestas a PM_{2.5} y lo atribuyen a los metales presentes en las PM como el Pb, Al y Cu (Li et al., 2016). Si bien nosotros consideramos que los metales pueden estar ejerciendo efectos en la expresión de los miRNAs, es importante tomar en cuenta que las PM₁₀ contienen otros componentes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las endotoxinas (Chirino et al., 2015; Morakinyo et al., 2016) que podrían tener impacto en la regulación de diferentes moléculas, en este caso sobre los miRNAs.

Considerando que las PM son una mezcla compleja de materiales, pueden inducir sinergismos o antagonismos que derivaran en repuestas celulares distintas, incluyendo la expresión de los miRNAs. De aquí la importancia de estudiar el efecto del material particulado completo tal como se encuentran en el ambiente y no por fracciones o componentes aislados.

Como se mencionó anteriormente, de los miRNAs que encontramos desregulados por la exposición a PM₁₀, se han reportado 6 en trabajos previos asociados a la exposición a partículas, sin embargo además de estos 6 miRNAs, en este trabajo se observaron cambios en otros 68 miRNAs distintos a los ya reportados, por lo que realizamos diferentes análisis bioinformáticos de predicción y enriquecimiento que nos permitieron predecir los blancos (mRNAs) y vías que pueden estar alteradas por los cambios en la expresión de los miRNAs.

Las interacciones entre miRNAs y mRNA se consideraron de acuerdo a lo descrito en la literatura, como el hecho que cuando un miRNA se encuentra subexpresado sus mRNAs blancos pueden estar sobreexpresados. Por el contrario cuando un miRNA se encuentra sobreexpresado, éste puede inhibir la expresión de sus mRNAs (Filipowicz et al., 2008; Fabian et al., 2010). De acuerdo a este principio de

regulación, se considera que los miRNAs pueden funcionar como oncomiRNAs o como miRNAs supresores de tumores, dependiendo de los genes que regulen (Mo, 2012; Han et al., 2016).

Derivado de las pruebas de interacción biológica, previos trabajos han reportado que el miR-4516 puede regular la expresión de los genes RPL37 y UBA52, inducir estrés ribosomal y activar la autofagia (Li et al., 2016) y basado en análisis bioinformáticos se reportó que los miR-193b-5p y miR-4281 participan en la regulación del ciclo celular, reparación de DNA y procesos metabólicos (Jeong et al., 2016). Los análisis de predicción realizados en este trabajo mostraron que el miR-4516 además de participar en autofagia regula genes que modifican el citoesqueleto de actina, el miR-193 se relaciona con apoptosis y el miR-4281 con procesos de apoptosis, cambios en citoesqueleto y estrés oxidante (miRpath3, TargetScan, DAVID).

Por otra parte el análisis de este trabajo indicó que los miR-1469, miR-3940-5p regulan procesos inflamatorios, crecimiento celular, metabolismos de xenobióticos y el miR-3611 proliferación celular (miRpath3, TargetScan, DAVID). A pesar que éstos miRNAs habían sido reportados previamente desregulados por PM, no se habían reportado las funciones o las vías celulares en las que pueden participar, por lo tanto el análisis de predicción de éste trabajo permite enriquecer el conocimiento sobre el impacto que tienen los miRNAs en los procesos celulares asociados a la exposición a material particulado.

De los 68 miRNAs restantes incluidos en los resultados de este trabajo, encontramos a través de los análisis bioinformáticos (miRpath3, TargetScan, David) que los miRNAs subexpresados regulan procesos como la proliferación, ciclo celular, respuesta ante daño a DNA, reparación de DNA (por escisión de bases (BER)), modificaciones del citoesqueleto de actina y autofagia.

En relación a las vías de señalización de los miRNAs subexpresados, obtenidas mediante análisis de enriquecimiento, destaca la vía de las MAPK asociada potencialmente con el miRNA miR-4758-3p y con el miR-181a. En reportes previos se ha encontrado que el miR-181a se subexpresa en tejido tumoral y se ha demostrado que conduce a la progresión de diferentes tipos de neoplasias, incluyendo el cáncer de pulmón, la subexpresión de éste miRNA se ha relacionado con una mayor capacidad de proliferación y migración celular (Huang et al., 2015; Ma et al., 2015; Tan et al., 2015). La vía del AMPc se encuentra modulada potencialmente por los miRNAs miR-615-5p, miR-762 y miR-5001-5p y en relación a la vía mTOR encontramos a los miR-762, miR-4281, miR-4516, miR-4763-3p, miR-4758-3p. En general los cambios en estas tres vías han sido asociados previamente al desarrollo de diferentes tipos de tumores incluyendo los de pulmón (Ding et al., 2008).

Con base en el análisis bioinformático podemos proponer que la subexpresión de estos miRNAs favorece la expresión de oncogenes, la transformación maligna de

las células y lleva al desarrollo de cáncer, por lo que clasificamos a éste grupo de miRNAs como potenciales supresores tumorales.

De acuerdo a la predicción de blancos de los miRNAs sobreexpresados, éstos participan en la regulación de señales antiproliferativas, pro-apoptóticas, regulan genes de ciclo celular, específicamente genes de paro del ciclo o *checkpoint*, así como de reparación de DNA (mecanismo de reparación de doble cadena) y metabolismo de xenobióticos. También identificamos mediante los análisis de enriquecimiento diferentes vías entre las que destacan la vía Foxo relacionado a los miRNAs miR-324-3p, miR-1184 y miR-3147, la vía TNF que se relacionó con los miR-32-5p, miR-193-5p, miR-324-3p y miR-6808-5p y la vía de p53 la cual se asoció con los miRNAs miR-193-5p, miR-324-3p y miR-559. Es importante mencionar que no existen trabajos anteriores que demuestren la regulación de dichos miRNAs con estas vías.

Debido a que la sobreexpresión de miRNAs se relaciona con una subexpresión de sus mRNAs blanco, es importante destacar que en este caso, la disminución de los mRNA relacionados a reparación por doble cadena mediada por la sobreexpresión de miRNAs podrían derivar en un proceso procarcinogénico, ya que estudios previos, tanto nuestro grupo de trabajo como otros grupos, han demostrado que las PM inducen daño en la doble cadena del DNA (Bonetta et al., 2009; Sanchez-Perez et al., 2009) y la reparación incorrecta podría llevar a la acumulación de daño y conducir a inestabilidad genómica.

Por otra parte, construir las redes de conectividad entre miRNAs y mRNAs nos permitió observar que algunos de los miRNAs destacan por su participación en la regulación de los procesos biológicos (de acuerdo a las predicciones bioinformáticas) e incluso consideramos que juegan un papel básico en mantener la homeostasis celular por los genes que regulan. Específicamente en los miRNAs subexpresados se encuentra el miR-762 que participa en proliferación, ciclo celular, respuesta ante daño a DNA, reparación de DNA y autofagia, además del miR-663 (ciclo celular, proliferación y citoesqueleto), miR-5001-5p (proliferación, ciclo celular, citoesqueleto y reparación), miR-4763-3p (citoesqueleto, proliferación, ciclo celular y autofagia) y el miR-4758-3p (citoesqueleto, autofagia y proliferación). En los miRNAs sobreexpresados encontramos al miR-324-3p, regulador de citoesqueleto, proliferación, ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis, el miR-6510-5p (apoptosis, ciclo celular, proliferación y citoesqueleto), miR-6808-5p (apoptosis, reparación de DNA y metabolismo de xenobióticos).

De estos miRNAs sólo encontramos información previa sobre el miR-663, el cual está reportado como un miRNA que funciona como supresor tumoral en cáncer de pulmón (Zhang et al., 2015b). En este trabajo la exposición a PM₁₀ induce la subexpresión de dicho miRNA y de acuerdo a los estudios previos, la disminución presentada en el cáncer de pulmón se asocia con la sobreexpresión del complejo AP-1, regulación de gen Bcl-2 y el bloqueo de la apoptosis (Zhang et al., 2015b),

por lo que es importante considerar que el miR-663 podría estar participando en la carcinogénesis derivada de la exposición a PM₁₀ a través de éstos mecanismos.

Si bien el análisis de microarreglos nos permitió cuantificar los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs, fue importante validar los resultados obtenidos mediante metodología molecular independiente como el RT-PCR tiempo real. En este trabajo elegimos 10 miRNAs (miR-181a-5p, miR-1227-3p, miR-4274, miR-4763-3p, miR-8063 y miR-27b-5p, miR-28-3p, miR-30c-5p, miR-3149 y miR-6808-5p), seleccionados por su participación en los procesos biológicos y vías descritas anteriormente, así como por el hecho de que algunos de éstos miRNAs ya se han reportado previamente en diferentes neoplasias (Almeida et al., 2012).

De los 10 miRNAs validados por qRT-PCR encontramos coincidencias en 7 miRNAs, lo cual es congruente con datos previamente reportados en los que se habla de una correlación entre el 70 y el 80% de los datos analizados por ambas técnicas (Ach et al., 2008). Estas diferencias entre los resultados podrían deberse a la sensibilidad de las técnicas, las secuencias utilizadas y los procesos de normalización de datos (Dallas et al., 2005), por lo que podemos concluir que los microarreglos son reproducibles y afirmamos en este sentido que los microarreglos son una herramienta útil para realizar la evaluación de una gran cantidad de miRNA.

El estudio de moléculas a través de microarreglos permite tener un panorama global sobre los procesos y vías que resultan modificados por la desregulación de miRNAs a causa de la exposición a PM. Es importante hacer énfasis en que tanto el estudio de las interacciones entre los miRNAs y los mRNAs, así como el estudio del material particulado es complejo, por lo que es necesario conocer a detalle la regulación de la expresión génica derivada de los cambios en los miRNAs y la relación que presentan ante el desarrollo de cáncer y la exposición a PM₁₀.

Con los resultados de este proyecto podemos concluir que los miRNAs participan en la respuesta toxicológica ante la exposición a PM, los procesos celulares que probablemente resultan alterados por la desregulación de miRNAs aumentan el riesgo de una transformación maligna, al inhibir la expresión de diferentes genes relevantes en la oncogénesis a nivel molecular, entre los que se encuentran algunos genes supresores de tumores o al favorecer la activación de vías de señalización que le permiten a las células proliferar y sobrevivir aún con daños en DNA o modificaciones a nivel celular.

El utilizar un modelo *in vitro*, permitió explorar los efectos de las PM₁₀ a nivel molecular y aportar evidencia del impacto sobre la expresión de los miRNAs en las células de pulmón. Otra de las ventajas de nuestro modelo es el hecho de que las condiciones de cultivo y exposición fueron precisas y homogéneas, es decir la exposición (concentración, tiempo) fue totalmente controlada, lo que facilita el análisis estadístico de los resultados y con lo cual aseguramos que los efectos encontrados derivan de la exposición a PM, además a través de los análisis *in silico* pudimos obtener un panorama general de los posibles blancos de regulación de los

miRNAs y con esto generar hipótesis relacionadas a los mecanismos moleculares clave en la iniciación o promoción del cáncer derivado de la exposición a PM.

Sin embargo es importante considerar que existen algunas limitaciones en cuanto a la extrapolación de los resultados en relación a lo que ocurre en los humanos expuestos a la contaminación del aire y por esto es importante realizar más estudios en otro tipo de modelos por ejemplo en un modelo murino que nos permitan explorar los cambios en los miRNAs dentro de un sistema biológico complejo, en el que existen interacciones entre los diferentes tipos celulares y moléculas y en los cuales es muy probable que encontremos desregulados varios de los miRNAs reportados en este trabajo.

8 CONCLUSIONES

1. La exposición a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24, 48 y 72 horas no induce cambios en la viabilidad de las células A549. En este sentido las células sobreviven aún en tiempos de exposición crónica.
2. La exposición a una concentración subletal ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PM_{10} por 72 horas, indujo la desregulación de 74 miRNAs en células de pulmón humano, de los cuales 45 se encuentran subexpresados y 29 sobrepresados.
3. Los miRNAs desregulados por la exposición a material particulado inducen cambios en la expresión de distintos mRNAs y conducen a la generación de respuestas celulares específicas entre las que se encuentran proliferación, evasión de apoptosis, autofagia, cambios en citoesqueleto de actina, modificaciones en ciclo celular, respuestas ante daño a DNA y la activación o bloqueo de mecanismos de reparación del DNA, como se resume en la figura 14.

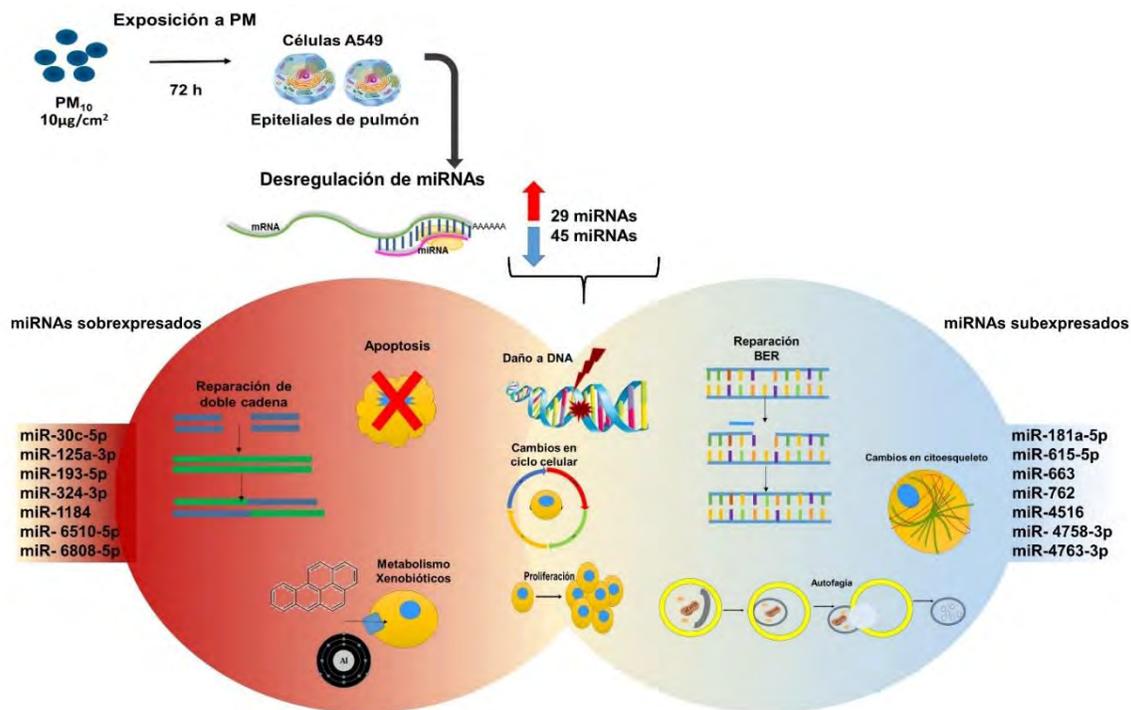


Figura 14. Esquema de alteraciones en miRNAs por exposición a PM_{10}

Representación de las alteraciones en diferentes procesos celulares predichas a través de los análisis bioinformáticos como consecuencia de la desregulación de microRNAs en las células de pulmón posterior a la exposición a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 72 horas. La sobreexpresión y subexpresión de los miRNAs altera la expresión de genes que podrían conducir al desarrollo de cáncer mediante diferentes vía celulares.

9 APORTACIONES

-Con éste trabajo aportamos evidencia sobre las alteraciones que las PM₁₀ inducen en la expresión de microRNAs de células pulmonares.

- A través de los análisis bioinformáticos planteamos un panorama global sobre las alteraciones a nivel génico que presentan las células derivado de los cambios de expresión de miRNAs en relación a la exposición prolongada a PM₁₀.

-El estudio realizado permite genera nuevas hipótesis enfocadas al conocimiento de los efectos de las PM y la participación de los miRNAs en el desarrollo de cáncer.

10 PERSPECTIVAS

-Evaluar a través de una plataforma de microarreglos los niveles de expresión de los mRNAs, con la finalidad de analizar los datos de miRNAs y mRNAs en conjunto y basado en el análisis de predicción bioinformática asociar la desregulación de miRNAs con los cambios de expresión de genes.

-Enfocar el análisis de miRNAs hacia una vía de interés con el fin de validar a nivel biológico las interacciones entre mRNA y miRNA a través de ensayos de luciferasa que detectan la unión del miRNA en la región 3'-UTR del gen blanco.

-Dirigir el estudio hacia vías funcionales que no se han explorado anteriormente en relación al efecto de las PM, como es el caso de la señalización de la vía Hippo, mTOR, AMPc o TNF, esto considerando el impacto que tendría la desregulación sobre los diferentes procesos biológicos.

-Profundizar en el estudio de los miR-181a-5p, miR-125a-3p, miR-663a y miR-30c-5p, para dilucidar y validar su participación en la respuesta a exposición a PM₁₀; estos miRNAs son importantes ya que estos se ha relacionado previamente con el desarrollo de neoplasias e incluso se han encontrado desregulados en cáncer de pulmón.

-Explorar los blancos de miRNAs como el miR-324-3p, miR-762, miR-5001-5p, miR-4763-3p, debido a que mediante el análisis de predicción encontramos que estos miRNAs participan de forma importante en las respuestas celulares ante la exposición a PM.

-Realizar transfecciones con inhibidores o estimuladores de los miRNAs, para evaluar si la subexpresión o sobreexpresión del miRNA tiene impacto en los mecanismos celulares de interés como proliferación, apoptosis, autofagia, etc.

11 LITERATURA CITADA

Ach, R. A., Wang, H., and Curry, B. (2008). Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC biotechnology* 8, 69.

Alfaro-Moreno, E., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Bonner, J. C., Murray, J. C., Rosas, I., Rosales, S. P., and Osornio-Vargas, A. R. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environmental health perspectives* 110, 715-720.

Almeida, M. I., Nicoloso, M. S., Zeng, L., Ivan, C., Spizzo, R., Gafa, R., Xiao, L., Zhang, X., Vannini, I., Fanini, F., *et al.* (2012). Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 142, 886-896 e889.

Arrieta, O., Guzman-de Alba, E., Alba-Lopez, L. F., Acosta-Espinoza, A., Alatorre-Alexander, J., Alexander-Meza, J. F., Allende-Perez, S. R., Alvarado-Aguilar, S., Araujo-Navarrete, M. E., Argote-Greene, L. M., *et al.* (2013). [National consensus of diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 65 Suppl 1, S5-84.

Baccarelli, A., Wright, R. O., Bollati, V., Tarantini, L., Litonjua, A. A., Suh, H. H., Zanobetti, A., Sparrow, D., Vokonas, P. S., and Schwartz, J. (2009). Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179, 572-578.

Badyda, A. J., Grellier, J., and Dabrowiecki, P. (2016). Ambient PM2.5 Exposure and Mortality Due to Lung Cancer and Cardiopulmonary Diseases in Polish Cities. *Advances in experimental medicine and biology*. 1-9.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Blanco, R., Iwakawa, R., Tang, M., Kohno, T., Angulo, B., Pio, R., Montuenga, L. M., Minna, J. D., Yokota, J., and Sanchez-Cespedes, M. (2009). A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human mutation* 30, 1199-1206.

Bleck, B., Grunig, G., Chiu, A., Liu, M., Gordon, T., Kazeros, A., and Reibman, J. (2013). MicroRNA-375 regulation of thymic stromal lymphopoietin by diesel exhaust particles and ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells. *Journal of immunology* 190, 3757-3763.

Bollati, V., Angelici, L., Rizzo, G., Pergoli, L., Rota, F., Hoxha, M., Nordio, F., Bonzini, M., Tarantini, L., Cantone, L., *et al.* (2015). Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells. *Journal of applied toxicology : JAT* 35, 59-67.

Bollati, V., Marinelli, B., Apostoli, P., Bonzini, M., Nordio, F., Hoxha, M., Pegoraro, V., Motta, V., Tarantini, L., Cantone, L., *et al.* (2010). Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environmental health perspectives* 118, 763-768.

Bonetta, S., Gianotti, V., Bonetta, S., Gosetti, F., Oddone, M., Gennaro, M. C., and Carraro, E. (2009). DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM(2.5) from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 77, 1030-1034.

Bourcier, T., Viboud, C., Cohen, J. C., Thomas, F., Bury, T., Cadiot, L., Mestre, O., Flahault, A., Borderie, V., and Laroche, L. (2003). Effects of air pollution and climatic

conditions on the frequency of ophthalmological emergency examinations. *The British journal of ophthalmology* 87, 809-811.

Brauer, M., Avila-Casado, C., Fortoul, T. I., Vedal, S., Stevens, B., and Churg, A. (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Environmental health perspectives* 109, 1039-1043.

Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 10, 1957-1966.

Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M., Falzano, L., Colone, M., De Berardis, B., Paoletti, L., Arancia, G., and Fiorentini, C. (2004). Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environmental research* 95, 82-91.

Carthew, R. W., and Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.

Cohen, A. J., Pope, C. A., 3rd, and Speizer, F. E. (1997). Ambient air pollution as a risk factor for lung cancer. *Salud publica de Mexico* 39, 346-355.

Chen, X., Zhang, L. W., Huang, J. J., Song, F. J., Zhang, L. P., Qian, Z. M., Trevathan, E., Mao, H. J., Han, B., Vaughn, M., *et al.* (2016a). Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: A 12-year cohort study in Northern China. *The Science of the total environment* 571, 855-861.

Chen, Z., Gu, D., Zhou, M., Shi, H., Yan, S., and Cai, Y. (2016b). Regulatory role of miR-125a/b in the suppression by selenium of cadmium-induced apoptosis via the mitochondrial pathway in LLC-PK1 cells. *Chemico-biological interactions* 243, 35-44.

Cheng, C., Chen, Z. Q., and Shi, X. T. (2014). MicroRNA-320 inhibits osteosarcoma cells proliferation by directly targeting fatty acid synthase. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 4177-4183.

Cheng, Z., Luo, L., Wang, S., Wang, Y., Sharma, S., Shimadera, H., Wang, X., Bressi, M., de Miranda, R. M., Jiang, J., *et al.* (2016). Status and characteristics of ambient PM_{2.5} pollution in global megacities. *Environment international* 89-90, 212-221.

Chirino, Y. I., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A. R., Morales-Barcenas, R., Gutierrez-Ruiz, M. C., Segura-Garcia, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., and Garcia-Cuellar, C. M. (2010). PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology letters* 193, 209-216.

Chirino, Y. I., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A. R., Rosas, I., and Garcia-Cuellar, C. M. (2015). Sampling and composition of airborne particulate matter (PM₁₀) from two locations of Mexico City. *Data in brief* 4, 353-356.

Dallas, P. B., Gottardo, N. G., Firth, M. J., Beesley, A. H., Hoffmann, K., Terry, P. A., Freitas, J. R., Boag, J. M., Cummings, A. J., and Kees, U. R. (2005). Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC genomics* 6, 59.

Danielsen, P. H., Loft, S., Jacobsen, N. R., Jensen, K. A., Autrup, H., Ravanat, J. L., Wallin, H., and Moller, P. (2010). Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in rats after intratracheal instillation or oral exposure to ambient air and

wood smoke particulate matter. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 118, 574-585.

Danielsen, P. H., Loft, S., Kocbach, A., Schwarze, P. E., and Moller, P. (2009). Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines. *Mutation research* 674, 116-122.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D. M., Morgan, M. B., *et al.* (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.

Dockery, D. W., Pope, C. A., 3rd, Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., Ferris, B. G., Jr., and Speizer, F. E. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England journal of medicine* 329, 1753-1759.

Doench, J. G., and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* 18, 504-511.

Englert, N. (2004). Fine particles and human health--a review of epidemiological studies. *Toxicology letters* 149, 235-242.

Eurlings, I. M., Reynaert, N. L., van den Beucken, T., Gosker, H. R., de Theije, C. C., Verhamme, F. M., Bracke, K. R., Wouters, E. F., and Dentener, M. A. (2014). Cigarette smoke extract induces a phenotypic shift in epithelial cells; involvement of HIF1alpha in mesenchymal transition. *PloS one* 9, e107757.

Fabian, M. R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* 79, 351-379.

Feoktistova, M., Geserick, P., and Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor protocols* 2016, 4, pdb prot087379.

Ferecatu, I., Borot, M. C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., and Andreau, K. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Particle and fibre toxicology* 7, 18.

Ferreira, T. M., Forti, M. C., de Freitas, C. U., Nascimento, F. P., Junger, W. L., and Gouveia, N. (2016). Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. *International journal of environmental research and public health* 13.947,2-11.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics* 9, 102-114.

Fossati, S., Baccarelli, A., Zanobetti, A., Hoxha, M., Vokonas, P. S., Wright, R. O., and Schwartz, J. (2014). Ambient particulate air pollution and microRNAs in elderly men. *Epidemiology* 25, 68-78.

Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., and Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research* 243, 359-366.

Gharibvand, L., Shavlik, D., Ghamsary, M., Beeson, W. L., Soret, S., Knutsen, R., and Knutsen, S. F. (2016). The Association between Ambient Fine Particulate

Air Pollution and Lung Cancer Incidence: Results from the AHSMOG-2 Study. *Environmental health perspectives*. DOI:10.1289/EHP124

Gilmour, P. S., Rahman, I., Donaldson, K., and MacNee, W. (2003). Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 284, L533-540.

Guillerm, N., and Cesari, G. (2015). Fighting ambient air pollution and its impact on health: from human rights to the right to a clean environment. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 19, 887-897.

Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., and Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environmental health perspectives* 122, 906-911.

Han, J., Liu, S., Zhang, Y., Xu, Y., Jiang, Y., Zhang, C., Li, C., and Li, X. (2016). MiRSEA: Discovering the pathways regulated by dysfunctional MicroRNAs. *Oncotarget*.7,55012-55025.

Hartsock, A., and Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 660-669.

Hu, H., Li, S., Liu, J., and Ni, B. (2012). MicroRNA-193b modulates proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 44, 424-430.

Huang, F., Luo, Y., Guo, Y., Tao, L., Xu, Q., Wang, C., Wang, A., Li, X., Guo, J., Yan, A., and Guo, X. (2016). Particulate Matter and Hospital Admissions for Stroke in Beijing, China: Modification Effects by Ambient Temperature. *Journal of the American Heart Association* 5,1-11.

Huang, J., Yao, X., Zhang, J., Dong, B., Chen, Q., Xue, W., Liu, D., and Huang, Y. (2013). Hypoxia-induced downregulation of miR-30c promotes epithelial-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma. *Cancer science* 104, 1609-1617.

Huang, P., Ye, B., Yang, Y., Shi, J., and Zhao, H. (2015). MicroRNA-181 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting Bcl-2. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 3381-3387.

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16961-16966.

Jeong, S. C., Song, M. K., Cho, Y., Lee, E., and Ryu, J. C. (2016). Integrative analysis of mRNA and microRNA expression of a human alveolar epithelial cell(A549) exposed to water and organic-soluble extract from particulate matter (PM). *Environmental toxicology*.32,302-310.

Jiang, L., Chang, J., Zhang, Q., Sun, L., and Qiu, X. (2013). MicroRNA hsa-miR-125a-3p activates p53 and induces apoptosis in lung cancer cells. *Cancer investigation* 31, 538-544.

Jiang, L., Huang, Q., Zhang, S., Zhang, Q., Chang, J., Qiu, X., and Wang, E. (2010). Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC cancer* 10, 318.

Karlsson, O., and Baccarelli, A. A. (2016). Environmental Health and Long Non-coding RNAs. *Current environmental health reports* 3, 178-187.

Kile, M. L., Fang, S., Baccarelli, A. A., Tarantini, L., Cavallari, J., and Christiani, D. C. (2013). A panel study of occupational exposure to fine particulate matter and changes in DNA methylation over a single workday and years worked in boilermaker welders. *Environmental health : a global access science source* 12, 47.

Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.

Lai, H. K., Tsang, H., and Wong, C. M. (2013). Meta-analysis of adverse health effects due to air pollution in Chinese populations. *BMC public health* 13, 360.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.

Lee, R. C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.

Li, J., Li, W. X., Bai, C., and Song, Y. (2015a). Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *The clinical respiratory journal*.

Li, N., Hao, M., Phalen, R. F., Hinds, W. C., and Nel, A. E. (2003). Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical immunology* 109, 250-265.

Li, R., Kou, X., Xie, L., Cheng, F., and Geng, H. (2015b). Effects of ambient PM on pathological injury, inflammation, oxidative stress, metabolic enzyme activity, and expression of c-fos and c-jun in lungs of rats. *Environmental science and pollution research international*.22,20167-20176.

Li, X., Lv, Y., Hao, J., Sun, H., Gao, N., Zhang, C., Lu, R., Wang, S., Yin, L., Pu, Y., and Chen, R. (2016). Role of microRNA-4516 involved autophagy associated with exposure to fine particulate matter. *Oncotarget*.7,4585-45397.

Li, Y., Li, P., Yu, S., Zhang, J., Wang, T., and Jia, G. (2014). miR-3940-5p associated with genetic damage in workers exposed to hexavalent chromium. *Toxicology letters* 229, 319-326.

Liu, Q., Zheng, C., Shen, H., Zhou, Z., and Lei, Y. (2015). MicroRNAs-mRNAs Expression Profile and Their Potential Role in Malignant Transformation of Human

Bronchial Epithelial Cells Induced by Cadmium. *BioMed research international* 2015, 902025.

Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., and International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, I. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet Oncology* 14, 1262-1263.

Loomis, D., Huang, W., and Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chinese journal of cancer* 33, 189-196.

Ma, Z., Qiu, X., Wang, D., Li, Y., Zhang, B., Yuan, T., Wei, J., Zhao, B., Zhao, X., Lou, J., *et al.* (2015). MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47, 630-638.

Mo, Y. Y. (2012). MicroRNA regulatory networks and human disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 3529-3531.

Molina, M. J., and Molina, L. T. (2004). Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* 54, 644-680.

Morakinyo, O. M., Mokgobu, M. I., Mukhola, M. S., and Hunter, R. P. (2016). Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. *International journal of environmental research and public health* 13,592.

Morales-Barcenas, R., Chirino, Y. I., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A. R., Melendez-Zajgla, J., Rosas, I., and Garcia-Cuellar, C. M. (2015). Particulate matter (PM(1)(0)) induces metalloprotease activity and invasion in airway epithelial cells. *Toxicology letters* 237, 167-173.

Motta, V., Angelici, L., Nordio, F., Bollati, V., Fossati, S., Frascati, F., Tinaglia, V., Bertazzi, P. A., Battaglia, C., and Baccarelli, A. A. (2013). Integrative Analysis of miRNA and inflammatory gene expression after acute particulate matter exposure. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 132, 307-316.

Nardone, L. L., and Andrews, S. B. (1979). Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. *Biochimica et biophysica acta* 573, 276-295.

Osornio-Vargas, A. R., Bonner, J. C., Alfaro-Moreno, E., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Ponce-de-Leon Rosales, S., Miranda, J., and Rosas, I. (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environmental health perspectives* 111, 1289-1293.

Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., and Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell* 21, 533-542.

Pope, C. A., 3rd, Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* 287, 1132-1141.

Pope, C. A., 3rd, and Dockery, D. W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *Journal of the Air & Waste Management Association* 56, 709-742.

Pope, C. A., 3rd, Thun, M. J., Namboodiri, M. M., Dockery, D. W., Evans, J. S., Speizer, F. E., and Heath, C. W., Jr. (1995). Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *American journal of respiratory and critical care medicine* 151, 669-674.

Reyes-Zarate, E., Sanchez-Perez, Y., Gutierrez-Ruiz, M. C., Chirino, Y. I., Osornio-Vargas, A. R., Morales-Barcenas, R., Souza-Arroyo, V., and Garcia-Cuellar, C. M. (2016). Atmospheric particulate matter (PM) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKCzeta and Src kinases in lung cells. *Environmental pollution* 214, 646-656.

Reymao, M. S., Cury, P. M., Lichtenfels, A. J., Lemos, M., Battlehner, C. N., Conceicao, G. M., Capelozzi, V. L., Montes, G. S., Junior, M. F., Martins, M. A., *et al.* (1997). Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environmental research* 74, 150-158.

Riojas-Rodriguez, H., Alamo-Hernandez, U., Texcalac-Sangrador, J. L., and Romieu, I. (2014). Health impact assessment of decreases in PM10 and ozone concentrations in the Mexico City Metropolitan Area: a basis for a new air quality management program. *Salud publica de Mexico* 56, 579-591.

Saetrom, P., Heale, B. S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J. J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic acids research* 35, 2333-2342.

Sanchez-Guerra, M., Zheng, Y., Osorio-Yanez, C., Zhong, J., Chervona, Y., Wang, S., Chang, D., McCracken, J. P., Diaz, A., Bertazzi, P. A., *et al.* (2015). Effects of particulate matter exposure on blood 5-hydroxymethylation: results from the Beijing truck driver air pollution study. *Epigenetics* 10, 633-642.

Sanchez-Perez, Y., Chirino, Y. I., Osornio-Vargas, A. R., Herrera, L. A., Morales-Barcenas, R., Lopez-Saavedra, A., Gonzalez-Ramirez, I., Miranda, J., and Garcia-Cuellar, C. M. (2014). Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM(10)) exposure in lung cells. *Toxicology letters* 225, 12-19.

Sanchez-Perez, Y., Chirino, Y. I., Osornio-Vargas, A. R., Morales-Barcenas, R., Gutierrez-Ruiz, C., Vazquez-Lopez, I., and Garcia-Cuellar, C. M. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer letters* 278, 192-200.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7, 3.

Soberanes, S., Gonzalez, A., Urich, D., Chiarella, S. E., Radigan, K. A., Osornio-Vargas, A., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Ridge, K. M., Chandel, N. S., *et al.* (2012). Particulate matter Air Pollution induces hypermethylation of the p16 promoter Via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Scientific reports* 2, 275.

Song, Q., Christiani, D. C., XiaorongWang, and Ren, J. (2014). The global contribution of outdoor air pollution to the incidence, prevalence, mortality and hospital admission for chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *International journal of environmental research and public health* 11, 11822-11832.

Sun, S., Schiller, J. H., and Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers a different disease. *Nature reviews Cancer* 7, 778-790.

Tan, J. Y., Habib, N. A., Chuah, Y. W., Yau, Y. H., Geifman-Shochat, S., and Chen, W. N. (2015). Identification of Cellular Targets of MicroRNA-181a in HepG2 Cells: A New Approach for Functional Analysis of MicroRNAs. *PloS one* 10, e0123167.

Tang, H., Li, R. P., Liang, P., Zhou, Y. L., and Wang, G. W. (2015). miR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncology letters* 10, 681-686.

Tarantini, L., Bonzini, M., Apostoli, P., Pegoraro, V., Bollati, V., Marinelli, B., Cantone, L., Rizzo, G., Hou, L., Schwartz, J., *et al.* (2009). Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environmental health perspectives* 117, 217-222.

Turner, M. C., Krewski, D., Pope, C. A., 3rd, Chen, Y., Gapstur, S. M., and Thun, M. J. (2011). Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184, 1374-1381.

Valavanidis, A., Fiotakis, K., and Vlachogianni, T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 26, 339-362.

Wang, B., Yanez, A., and Novina, C. D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5343-5348.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228-234.

Wu, L., and Belasco, J. G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 29, 1-7.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4034-4039.

Zeng, Y. (2006). Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 25, 6156-6162.

Zhang, H., Zhu, X., Li, N., Li, D., Sha, Z., Zheng, X., and Wang, H. (2015a). miR-125a-3p targets MTA1 to suppress NSCLC cell proliferation, migration, and invasion. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47, 496-503.

Zhang, Y., Ji, X., Ku, T., Li, G., and Sang, N. (2016). Heavy metals bound to fine particulate matter from northern China induce season-dependent health risks: A study based on myocardial toxicity. *Environmental pollution* 216, 380-390.

Zhang, Y., Zhou, X., Xu, X., Zhang, M., Wang, X., Bai, X., Li, H., Kan, L., Zhou, Y., Niu, H., and He, P. (2015b). Waltonitone induces apoptosis through mir-663-induced Bcl-2 downregulation in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 871-876.

Zheng, X. Y., Ding, H., Jiang, L. N., Chen, S. W., Zheng, J. P., Qiu, M., Zhou, Y. X., Chen, Q., and Guan, W. J. (2015). Association between Air Pollutants and Asthma Emergency Room Visits and Hospital Admissions in Time Series Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* 10, e0138146.

Referencias de internet:

Semarnat, 2014. Calidad del aire en la Ciudad de México, Informe. 2014. En línea:

http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/informe_anual_calidad_aire_2014/#p=2 . Consultado en septiembre del 2016.

Centro Mario Molina, 2015. Cambio Climático. En línea: <http://centromariomolina.org/cambio-climatico/temas/educacion-en-cambio-climatico/> . Consultado en enero del 2016.

EPA, 2015. What are the six common air pollutants. En línea: <http://www3.epa.gov/airquality/urbanair/>. Consultado en enero del 2016.

INECC, 2014. Calidad del Aire. En línea: <http://www.inecc.gob.mx/calair-informacion-basica/521-calair-cont-air>. Consultado en enero del 2016.

INECC, 2013. Contaminantes criterio. En línea: <http://www.inecc.gob.mx/calair-informacion-basica/523-calair-cont-criterio>. Consultado en enero del 2016.

IARC, 2015. Outdoor air pollution. Volume 109. En línea: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol109/mono109.pdf>. Consultado en enero del 2016.

Sedema, 2012. Inventario de emisiones contaminantes y de efecto invernadero. Zona Metropolitana del Valle de México. Gobierno del Distrito Federal. Primera edición.

SIMAT, 2014. Calidad del Aire de la Ciudad de México. En línea: http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/informe_anual_calidad_aire_2014/#p=114

OMS, 2014. Calidad del aire (exterior) y salud. En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/> Consultado en enero 2016.

UNEP, 2009. Contaminantes: Partículas (PM). En línea: http://www.unep.org/tnt-unep/toolkit_esp/pollutants/facts.html Consultado en enero 2016.

12 ANEXOS

12.1 Anexo I. Límites de contaminantes criterio

Contaminante	Norma Oficial Mexicana	Valores	Organización Mundial de la Salud	Valores
Dióxido de azufre (SO₂)	NOM-022-SSA1-2010	288 µg/m ³ media en 24h 524 µg/m ³ segundo máximo anual como promedio móvil de 8 horas 66 µg/m ³ ppm, promedio anual	Directrices sobre la Calidad del Aire	20 µg/m ³ media en 24h 500 µg/m ³ de media en 10 min
Monóxido de carbono (CO)	NOM-021-SSA1-1993	11.0 ppm, máximo anual como promedio móvil de 8 horas	Directrices sobre la Calidad del Aire	
Dióxido de nitrógeno (NO₂)	NOM-023-SSA1-1993	395 µg/m ³ de media en 1h	Directrices sobre la Calidad del Aire	200 µg/m ³ de media en 1h 40 µg/m ³ de media anual
Ozono (O₃)	NOM-020-SSA1-2014	0.095 ppm, promedio horario 0.070 ppm, de media en 8 horas	Directrices sobre la Calidad del Aire	100 µg/m ³ de media en 8 horas
Partículas menores a 10 micrómetros (PM₁₀)	NOM-025-SSA1-2014	75 µg/m ³ , promedio 24 horas 40 µg/m ³ , promedio anual	Directrices sobre la Calidad del Aire	50 µg/m ³ , promedio 24 horas 20 µg/m ³ , promedio anual
Partículas menores a 2.5 micrómetros (PM_{2.5})	NOM-025-SSA1-2014	45 µg/m ³ , promedio 24 horas 12 µg/m ³ , promedio anual	Directrices sobre la Calidad del Aire	25 µg/m ³ , promedio 24 horas 10 µg/m ³ , promedio anual
Plomo (Pb)	NOM-026-SSA1-1993	1.5 µg/m ³ , en un periodo de tres meses como promedio aritmético	Directrices sobre la Calidad del Aire	

12.2 Anexo II. Vías de señalización de los miRNAs desregulados

Tabla 6. Lista de vías funcionales en las que participan los microRNAs subexpresados en células expuestas 72 horas a PM₁₀ comparadas con células sin exponer.

Vías KEGG	
Activación plaquetaria	Regulación de la absorción de sodio aldosterona
Adhesiones focales	Regulación de mediadores inflamatorios de canales TRP
Biosíntesis de ácidos grasos	Resistencia a la insulina
Biosíntesis de aminoácidos	Secreción de renina
Biosíntesis de O-glicanos tipo mucina	Señalización adrenérgica en cardiomiocitos
Cáncer de páncreas	Sistema renina-angiotensina
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Unión adherentes
Cáncer de tiroides	Vía de glucólisis / gluconeogénesis
Carcinoma de células basales	Vía de señalización Hippo
Contracción del músculo cardíaco	Vía de señalización cAMP
Contracción del músculo liso vascular	Vía de señalización de calcio
Degradación del ARN	Vía de señalización de cGMP-PKG
Diabetes mellitus tipo II	Vía de señalización de estrógenos
Digestión de proteínas y la absorción	Vía de señalización de GnRH
Endocitosis	Vía de señalización de la hormona tiroidea
Enfermedad de Parkinson	Vía de señalización de la insulina
Guía de axones	Vía de señalización de los esfingolípidos
Interacción ECM-receptor	Vía de señalización de neurotrofina
Interacción ligando-receptor neuroactivos	Vía de señalización de oxitocina
La secreción de insulina	Vía de señalización de quimiocinas
Leucemia mieloide aguda	Vía de señalización de TNF
Melanogénesis	Vía de señalización de VEGF
Metabolismo central de carbono en el cáncer	Vía de señalización Hedgehog
Metabolismo de arginina y prolina	Vía de señalización MAPK
Metabolismo de los ácidos grasos	Vía de señalización mTOR
Metabolismo de Nicotina y nicotinamida	Vía de señalización rap1
Moléculas de adhesión celular (CAMs)	Vía de señalización Ras
Pérdida de regulación transcripcional en cáncer	Vía de señalización Wnt
Proteoglicanos en el cáncer	Vía pentosa fosfato
Reabsorción de calcio regulado por factores endócrinos	Vías de señalización en cáncer
Regulación de citoesqueleto de actina	Vía de señalización Glucagón

Tabla 7. Lista de vías funcionales en las que participan los microRNAs sobreexpresados en células expuestas 72 horas a PM10 comparadas con células sin exponer.

Vías KEGG
Adhesiones focales
Cáncer de páncreas
Cáncer de próstata
Endocitosis
Guía de axones
Infección por virus de Epstein-Barr
Interacciones SNARE en el transporte vesicular
Melanoma
Metabolismo central de carbono en el cáncer
Regulación de citoesqueleto de actina
Sinapsis Gabanérgicas
Uniones adherentes
Vía de señalización adipocitocinas
Vía de señalización de cGMP-PKG
Vía de señalización de la hormona tiroidea
Vía de señalización de p53
Vía de señalización de quimiocinas
Vía de señalización de TGF-beta
Vía de señalización de TNF
Vía de señalización del receptor de células B
Vía de señalización FoxO
Vía de señalización MAPK
Vía de señalización Ras
Vías de señalización en el cáncer
Vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre