



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**LA VÍA AKT/FOXO3A INHIBE LA APOPTOSIS Y EL ARRESTO DEL CICLO  
CELULAR EN CÉLULAS DE PULMÓN HUMANO EXPUESTA A PM<sub>10</sub>**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**QFB. ARANDA RIVERA ANA KARINA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CD. MX., JUNIO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

OFICIO CPCB/594/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 25 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ARANDA RIVERA ANA KARINA** con número de cuenta **517027840**, con la tesis titulada "**LA VÍA AKT/FOXO3A INHIBE LA APOPTOSIS Y EL ARRESTO DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE PULMÓN HUMANO EXPUESTA A PM<sub>10</sub>**", realizada bajo la dirección de la **DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Secretario: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS  
Suplente: DR. FELIPE VACA PANIAGUA  
Suplente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 21 de mayo de 2019

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de realizar una maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con número de registro 818062, así como al financiamiento otorgado por el proyecto SEP-CONACYT-215150.

A mi tutora, la Dra. Yesennia Sánchez Pérez y a los miembros de comité tutorial, Dra. Yolanda Irasema Chirino López y Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, por su apoyo y por contribuir a mi crecimiento profesional.

## **Agradecimientos personales**

Al Instituto Nacional de Cancerología, principalmente a la Dirección de Investigación Básica por el apoyo otorgado para poder realizar mi maestría dentro de sus instalaciones.

A los miembros del jurado: Dr. Pedraza, Dr. Soto, Dr. Felipe Vaca y Dra. Gonsebatt por sus comentarios realizados a este trabajo. En especial a la Dra. Marcela Lizano, gracias a ella me enamoré de la investigación, por sus muy acertados consejos y por formar parte de mi crecimiento profesional.

A mi esposo y amigo Dr. Alfredo Cruz Gregorio por su amor incondicional durante estos años que llevamos de la mano, por sus consejos y enseñanzas en esta etapa, por no dejarme caer en los momentos difíciles. Te amo. A mi hija Amaya, por aguantar mis ausencias y desvelos, por enseñarme que la vida es mejor cuando eres feliz, por siempre sonreír y hacerme ver que no hay nada imposible y que de lo que se trata es de romper estigmas. Los amo familia.

A mis padres y hermana porque a pesar de la distancia me animan a continuar, por su paciencia y amor incondicional. Por recordarme que todo se logra a base de dedicación y esfuerzo. No tengo palabras que cubran todo lo que los amo y agradecerles hasta donde he llegado. Los adoro.

A mis suegros y cuñada, por la ayuda que me han brindado cada vez que la necesité, por estar siempre presentes y hacerme parte de su familia. Los quiero mucho.

A mis mejores amigas Annete y Ana Leticia, por sus consejos y ánimos, son las mejores. Por demostrarme que a pesar de la distancia siempre están ahí para mí como yo para ustedes y porque gracias a ustedes seguí en este camino, las amo.

A Edna, por escucharme y leerme siempre, por ser una verdadera amiga. Te quiero.

A mis compañeros de laboratorio Miguel, Carlos, Yanueh, Marel y Pablo, por los momentos compartidos. Los quiero.

A la Biol. Rocío Morales, por el apoyo en la realización de las citometrías de flujo.

A la Dra. Claudia Gracia Cuellar, por ser una gran líder en el grupo.

¡Gracias!

# ÍNDICE

## Índice de figuras

## Lista de abreviaturas

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1. La contaminación del aire .....	5
1.2 El material particulado.....	7
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>10</b>
2.1 Efectos de las PM en la salud humana .....	10
2.1.1 Estudios epidemiológicos .....	10
2.1.2 Estudios toxicológicos .....	12
2.1.3 Estrés oxidante y PM <sub>10</sub> .....	14
2.1.4 La regulación del ciclo celular .....	15
2.1.4.1 Efecto de las PM <sub>10</sub> en el ciclo celular .....	17
2.1.5 La apoptosis .....	17
2.1.5.1 PM <sub>10</sub> y su efecto en apoptosis.....	19
2.1.6 La vía de AKT/ FoxO3a .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>27</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>28</b>
6.1 Reactivos y anticuerpos .....	28
6.2 Obtención de PM <sub>10</sub> .....	28
6.3 Cultivo celular de A549 .....	28
6.4 Exposición a PM <sub>10</sub> .....	29
6.5 Tratamiento con el inhibidor LY294002 .....	29
6.6 Extracción de proteína .....	30
6.7 Cuantificación de proteína.....	30
6.8 Western Blot de las células A549 tratadas con PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
6.9 Evaluación de ciclo celular .....	31
6.10 Determinación de apoptosis .....	32
6.11 Análisis estadísticos .....	33
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
7.1 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> inducen la fosforilación de AKT <sup>S473</sup> y FoxO3a <sup>S253</sup> .....	33
7.2 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de proteína de catalasa .....	36
7.3 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de p27 <sup>kip1</sup> .....	37

7.4 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no inducen cambios en el ciclo celular.....	37
7.5 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no inducen apoptosis.....	38
7.6 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> inducen la fosforilación de FoxO3a <sup>S253</sup> a través de AKT <sup>S473</sup> .....	39
7.7 Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de catalasa mediante la vía de AKT/FoxO3a .....	41
7.8. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de p27 <sup>kip1</sup> a través de la vía AKT/FoxO3a .....	42
7.9. La vía de AKT/FoxO3a inhibe la detención del ciclo celular en células expuestas a PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	43
7.10 La vía de AKT/FoxO3a previene la apoptosis inducida por la exposición a PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	44
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>9. RESUMEN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>10. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>11. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>12. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 1: Clasificación de carcinogénicos por la Agencia Internacional del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 2: Resumen de los efectos citotóxicos de las PM<sub>10</sub> .....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo 3: Imagen representativa de los plots de la citometría de flujo para evaluar apoptosis en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub> y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con y sin inhibidor de la vía AKT/FoxO3a (LY294002). .....</b>	<b>65</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Clasificación del material particulado de acuerdo con su tamaño aerodinámico. . . . .	<b>9</b>
Figura 2. Reacción que cataliza la catalasa.. . . .	<b>15</b>
Figura 3. Regulación del ciclo celular.. . . .	<b>16</b>
Figura 4. Mecanismos de muerte celular por apoptosis: vía intrínseca y extrínseca.. . . .	<b>19</b>
Figura 5. Inactivación de FoxO3a por AKT. . . . .	<b>24</b>
Figura 6. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> inducen la fosforilación de AKT <sup>S473</sup> y de FoxO3a <sup>S253</sup> . . .	<b>34</b>
Figura 7. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de catalasa.. . . .	<b>36</b>
Figura 8. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de p27 <sup>kip1</sup> .. . . .	<b>37</b>
Figura 9. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no inducen cambios en las fases del ciclo celular.. . . .	<b>38</b>
Figura 10. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no inducen apoptosis.. . . .	<b>39</b>
Figura 11. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> inducen la fosforilación de FoxO3a <sup>S253</sup> a través de AKT <sup>S473</sup> . . . . .	<b>40</b>
Figura 12. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de la enzima catalasa vía AKT/FoxO3a.. . . .	<b>42</b>
Figura 13. Las PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disminuyen los niveles de p27 <sup>kip1</sup> a través de la vía AKT/FoxO3a. . . . .	<b>43</b>
Figura 14. La vía de AKT/FoxO3a inhibe la detención del ciclo celular en células expuestas a PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .. . . .	<b>44</b>
Figura 15. La vía AKT/FoxO3a inhibe la apoptosis inducida por PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a través de AKT/FoxO3a. . . . .	<b>45</b>
Figura 16. Mecanismo de señalización propuesto para la inhibición de apoptosis y del arresto del ciclo celular en células de cáncer de pulmón humano expuestas a PM <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .. . . .	<b>51</b>



## Lista de abreviaturas

<b>4-HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal.
<b>8-oxodG</b>	8-oxo,7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina.
<b>AhR</b>	Receptor aril hidrocarburos.
<b>Al</b>	Aluminio.
<b>ACS CPS 2</b>	Del inglés América cáncer society prevention 2.
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B.
<b>AKT<sup>S473</sup></b>	Proteína cinasa B fosforilada en serina 473.
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico.
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza.
<b>APAF1</b>	Factor activador de proteasas 1.
<b>ATCC</b>	Colección Americana de Tipos de Cultivo.
<b>ATF 2</b>	Factor activador 2.
<b>ATF 3</b>	Factor activador 3.
<b>BaP</b>	Benzo [a] pireno.
<b>BI</b>	Búfer de incubación.
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina.
<b>Cd</b>	Cadmio.
<b>CDMX</b>	Ciudad de México.
<b>Cdk</b>	Cinasas dependientes de ciclinas.
<b>CIP</b>	Proteínas inhibidoras de las cdk's.
<b>CO</b>	Monóxido de carbono.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono.
<b>Cr</b>	Cromo.
<b>CREB</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta.
<b>Cu</b>	Cobre.
<b>DISC</b>	Complejo de señalización inductor de muerte.
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>E2F</b>	Factor de elongación 2.
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar crónica obstructiva.
<b>ERK1/2</b>	Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2.
<b>EUA</b>	Estados Unidos de América.
<b>FADD</b>	Proteínas adaptadoras intracelulares.
<b>FoxO3a</b>	Factor de transcripción Forkhead box O3.
<b>Foxo3a<sup>S253</sup></b>	Factor de transcripción Forkhead box O3 fosforilado en serina 253.
<b>FoxO4</b>	Factor de transcripción Forkhead box O4.
<b>FoxO6</b>	Factor de transcripción Forkhead box O6.
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
<b>Gpx</b>	Glutación peroxidasa.
<b>GPCRs</b>	Receptores de proteínas acoplados a proteínas G.
<b>GSH</b>	Glutación reducido.
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa.
<b>GR</b>	Glutación reductasa.
<b>HAP's</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>HCB</b>	Hexaclorobenceno.
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano.
<b>INK4</b>	Inhibidoras de la cdk4.
<b>IARC</b>	Del inglés Interational Agency for Research on Cancer Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intracelular-1.
<b>IL-R</b>	Receptor de interleucinas.
<b>IL-6</b>	Interleucina 6.
<b>IL-8</b>	Interleucina-8.
<b>IP</b>	Ioduro de propidio.
<b>JNK</b>	Proteína cinasa c-Jun N-terminal.
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógenos.
<b>MDA</b>	Malondialdehido.
<b>MENIN</b>	Menina.
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinasa de matriz 2.
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinasa de matriz 9.
<b>mTOR</b>	Proteína diana de rampamicina de mamífero.
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dióxido de nitrógeno.
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana.
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozono.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>p27<sup>kip1</sup></b>	Inhibidor 1B cinasa dependiente de ciclina.
<b>Pb</b>	Plomo.
<b>PBS</b>	Búfer salino de fosfatos.
<b>PBS-EDTA</b>	Búfer salino de fosfatos más ácido etilendiaminotetraacético.
<b>PCB</b>	Bifenilos policlorados.
<b>PDK1</b>	Proteína 3-cinasa dependiente de fosfoinositol.
<b>PI3-K</b>	Fosfoinositol 3-cinasa.
<b>PIMP</b>	Proteína putativa de la membrana integral.
<b>PIP2</b>	Fosfatidil inositol (3,4) bifosfato.
<b>PIP3</b>	Fosfatidil inositol (4,5,6) trifosfato.
<b>PM</b>	Material particulado (del inglés Particulate Matter).
<b>PM<sub>10</sub></b>	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤ a 10 µm.
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤ a 2.5 µm.
<b>PM<sub>0.1</sub></b>	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤0.1µm.
<b>PP2A</b>	Fosfatasa 2-A.
<b>PST</b>	Partículas suspendidas totales.
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno.
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa.
<b>RTKs</b>	Receptores tirosina cinasa.
<b>Rb</b>	Retinoblastoma.
<b>Ser</b>	Serina.
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino.
<b>SIMAT</b>	Sistema de monitoreo atmosférico.
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saude.

<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de azufre.
<b>SOD 1</b>	Superóxido dismutasa 1.
<b>SOD 2</b>	Superóxido dismutasa 2.
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
<b>TBST</b>	Bufer salino de tris con tween.
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina.
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral.
<b>TRAIL-R</b>	Receptor de ligando que inducen la apoptosis relacionada con
<b>Thr</b>	TNF.
<b>Tyr</b>	Treonina.
<b>VCAM</b>	Tirosina.
<b>µg/cm<sup>2</sup></b>	Molécula de citoadhesión vascular.
<b>µg/cm<sup>3</sup></b>	Microgramos por centímetro cuadrado.
<b>µl</b>	Microgramos por centímetro cúbico.
<b>µm</b>	Microlitros.
<b>m<sup>3</sup>/min</b>	Micrómetros.
<b>nm</b>	Metros cúbicos por minuto.
<b>°C</b>	Nanómetros.
	Grados centígrados.

## RESUMEN

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó a la contaminación del aire y al material particulado con un diámetro aerodinámico  $\leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) como un carcinógeno del grupo 1, debido a que se encontró evidencia epidemiológica suficiente de carcinogenicidad para los humanos. Se sabe que posterior a la exposición a  $\text{PM}_{10}$  se induce estrés oxidante (EO) asociado al aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y a una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes; sin embargo, la exposición a un segundo reto con  $500 \mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no induce muerte celular. Cabe señalar que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula que se encuentra presente normalmente en las células y actúa como segundo mensajero en las vías de señalización; sin embargo, a altas concentraciones produce estrés y daño oxidante, lo cual está asociado a enfermedades como la enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC), el asma y el cáncer, y que a su vez son exacerbadas por exposición a  $\text{PM}_{10}$ . Además, las  $\text{PM}_{10}$  inducen la activación de vías relacionadas a procesos carcinogénicos, así, la exposición a un segundo reto permitiría entender los mecanismos por los cuales las  $\text{PM}_{10}$  son un factor de riesgo para enfermedades, entre ellas el cáncer. El factor de transcripción Forkhead box O3 (FoxO3a) regula la resistencia a estrés, ciclo celular y apoptosis; sin embargo, cuando éste es fosforilado por la proteína cinasa B (AKT), se inactiva, lo cual se asocia con procesos carcinogénicos como la inhibición del arresto del ciclo celular y de la apoptosis. Se ha descrito la inactivación de FoxO3a en exposiciones a contaminantes del aire, sin embargo, no se ha evaluado con exposiciones a  $\text{PM}_{10}$  bajo un segundo reto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la activación de la vía AKT/FoxO3a en la inhibición de la apoptosis y el arresto del ciclo celular en un modelo de cáncer de pulmón en el que las células son expuestas a  $\text{PM}_{10}$  y posteriormente a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se utilizaron células alveolares derivadas de un adenocarcinoma de pulmón humano (A549), exponiéndolas a  $\text{PM}_{10}$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) por 24 h y posteriormente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 h. En seguida se evaluaron las fosforilaciones de AKT<sup>S473</sup> y FoxO3a<sup>S253</sup> por inmunoblot

o *western blot*. Posteriormente, se determinaron los niveles de catalasa y p27<sup>kip1</sup> por *western blot*, así mismo se evaluó ciclo celular y apoptosis empleando la técnica de citometría de flujo. Para determinar la participación de la AKT/FoxO3a, se empleó un inhibidor de la vía (LY294002) y se evaluó si se prevenían los eventos propiciados por la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+PM<sub>10</sub>. Se encontró que, posterior a la exposición a PM<sub>10</sub> y a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumenta 34% la fosforilación de AKT<sup>S473</sup> (p<0.005) y 48% la fosforilación de FoxO3a<sup>S253</sup> (p<0.005) con respecto a las células control. También se observó que disminuyen 46% (p<0.005) los niveles de la enzima catalasa y 29% los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup> (p<0.05) comparadas con el control. No se detectaron cambios en las fases del ciclo celular ni en apoptosis. Por otro lado, cuando se trata a las células expuestas a PM<sub>10</sub> y a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el inhibidor de AKT (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se previene 40% la fosforilación de FoxO3a<sup>S253</sup> (p<0.05), 25% la disminución de catalasa (p<0.05) y 45% la disminución de p27<sup>kip1</sup> (p<0.05). Además, se incrementa 8.47% la fase G0/G1 (p<0.05) y los porcentajes de apoptosis aumentan 5.17% (p<0.05) comparadas con las células tratadas sin el inhibidor. La conclusión del estudio es que la vía de AKT/FoxO3a se activa con exposición a PM<sub>10</sub> con un segundo reto (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en células derivadas de un adenocarcinoma de pulmón humano y que esto podría inducir características de sobrevivencia celular las cuales están relacionadas con el desarrollo de cáncer.

## ABSTRACT

International agency for research on cancer (IARC) classifies air pollution and particulate matter with an aerodynamic diameter  $\leq 10\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) as a carcinogen within group 1, based on epidemiological evidence of carcinogenicity in humans. The subsequent exposure to  $\text{PM}_{10}$  induces oxidative stress (OS), associated to an increase in reactive oxygen species (ROS) and a decrease in the antioxidant enzymes activity. Moreover, exposure to a second challenge with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 500  $\mu\text{M}$  does not induce cell death.  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a molecule that is normally present in cells and it acts as second messenger in signalling pathways; however, in high concentrations induce damage and OS, which is associated to chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and cancer. Moreover,  $\text{PM}_{10}$  activate signalling pathways related to carcinogenesis, thus, exposure to a second challenge, such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ , would allow us to understand the mechanisms by which  $\text{PM}_{10}$  induce diseases, as cancer. The Forkhead box O3 FoxO3a transcription factor regulates resistance to stress, cell cycle and apoptosis; however, when it is phosphorylated by protein kinase B (AKT) is inactivated, which is associated with the inhibition of cell cycle arrest and apoptosis. Previous studies have reported the inactivation of FoxO3a in exposures to air pollutants; however, it has not been evaluated with exposures to  $\text{PM}_{10}$  under a second challenge, such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The aim of the present work was to evaluate the activation of the AKT/FoxO3a pathway and the subsequent arrest of cell cycle and inhibition of apoptosis in a lung cancer model, exposed to  $\text{PM}_{10}$  and subsequently to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Human lung alveolar cells (A549) were exposed to  $\text{PM}_{10}$  (10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) for 24 h and subsequently to  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The phosphorylations of  $\text{AKT}^{\text{S}473}$  and  $\text{FoxO3a}^{\text{S}253}$  were then evaluated by western blot. Then, the levels of catalase and  $\text{p}27^{\text{kip}1}$  were determined by western blot and cell cycle and apoptosis were evaluated using the flow cytometry technique. Finally, to determine the participation of AKT/FoxO3a, a pathway inhibitor (LY294002) was used and the events induced by exposure to  $\text{PM}_{10}$  were prevented. A549 cells exposure to  $\text{PM}_{10}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , increase 34% the phosphorylation of  $\text{AKT}^{\text{S}473}$  ( $p < 0.005$ ) and 48% the phosphorylation of  $\text{FoxO3a}^{\text{S}253}$  ( $p < 0.005$ ), in comparison with the control cells. Moreover, it was also observed that the levels of catalase and  $\text{p}27^{\text{kip}1}$

decreased in 46% and 21%, respectively, compared to the control. No changes were detected in the phases of the cell cycle or in apoptosis. Furthermore, when A549 cells exposed to PM<sub>10</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were also treated with the AKT inhibitor (LY294002), the phosphorylation of FoxO3a<sup>S253</sup> was prevented in 40% (p <0.05), decreasing catalase and p27<sup>kip1</sup> in 25% (p <0.05) and 45% (p<0.05), respectively and increasing the G0/G1 phase (8.47%, p <0.05) and the percentages of apoptosis in 5.17% (p <0.05) compared with the control. This study concluded that the exposition to PM<sub>10</sub> with a second challenge with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the AKT/FoxO3a, decreasing catalase and p27<sup>kip1</sup> expression, with the induction of cell cycle arrest and apoptosis inhibition in human lung cancer cells and this could induce characteristics of cell survival relate with development of cancer.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La 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 gases traza en menor proporción como el dióxido de carbono, el helio, el argón (1%), entre otros (Centro Mario Molina., 2015). Cuando se introducen gases y/o partículas a la atmósfera en proporciones tales que se altera su composición química natural, se produce la contaminación del aire. Dichos gases y/o partículas pueden provenir de fuentes naturales como volcanes o bien, por actividades humanas como la quema de combustible (INECC., 2014; SIMAT., 2014).

Dentro de los contaminantes que se encuentran presentes en el aire, hay seis que son considerados criterio: dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), plomo (Pb) y el material particulado (particulate matter, PM por sus siglas en inglés). Estos contaminantes son considerados criterio debido a que se demostró que su presencia produce efectos adversos a la salud, y son utilizados para evaluar la calidad del aire, por lo que existen normas que monitorean los límites permisibles para cada uno (SIMAT, 2014).

Si bien, no hay un umbral para la exposición a contaminantes del aire, pues va a depender de diferentes factores como el tiempo, la frecuencia de exposición y de las características propias de la población expuesta, los límites señalados para cada contaminante del aire se basan en estudios realizados de personas vulnerables y se establecen bajo los lineamientos de las leyes de cada país, tomando como base los parámetros indicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En México, los límites permisibles para cada contaminante criterio son dictados por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) las cuáles establecen las concentraciones máximas durante un periodo definido. En la tabla 1, se detallan los límites para cada contaminante criterio en cuanto a lo que marca la OMS y la NOM para nuestro país.



<b>Contaminante</b>	<b>Norma Oficial Mexicana, NOM</b>	<b>Organización Mundial de la Salud, OMS</b>
Dióxido de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	NOM-023-SSA1-1993 0.210 ppm valor promedio	-Directrices sobre la calidad del aire 40 µg/m <sup>3</sup> de media anual 200 µg/m <sup>3</sup> de media en 1h
Monóxido de carbono (CO)	NOM-021-SSA1-1993 11.0 ppm máximo anual como promedio móvil de 8 h	
Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )	NOM-022-SSA1-2010 0.110 máximo promedio 24 h 0.200 segundo máximo anual con promedio móvil de 8 h 0.025 ppm promedio anual.	Directrices sobre la calidad del aire 20 µg/m <sup>3</sup> media en 24 h 500 µg/m <sup>3</sup> de media en 10 min
Ozono (O <sub>3</sub> )	NOM-020-SSA1-2014 0.095 ppm promedio diario 0.070 máximo anual del promedio móvil de 8 h	Directrices sobre la calidad del aire 100 µg/m <sup>3</sup> de media en 8 h
Plomo (Pb)	1.5 µg/m <sup>3</sup> en un promedio de tres meses como promedio aritmético	No disponible
Material Particulado con un diámetro aerodinámico ≤10 µm (PM <sub>10</sub> )	NOM-025-SSA1-2014 75 µg/m <sup>3</sup> promedio de 24 h 40 µg/m <sup>3</sup> Promedio anual	Directrices sobre la calidad del aire 50 µg/m <sup>3</sup> promedio de 24 h

		20 µg/m <sup>3</sup> promedio de 24 h
Material Particulado con un diámetro aerodinámico ≤2.5 µm (PM <sub>2.5</sub> )	NOM-025-SSA1-2014 45 µg/m <sup>3</sup> promedio de 24 h 12 µg/m <sup>3</sup> promedio anual	Directrices sobre la calidad del aire 25 µg/m <sup>3</sup> promedio de 24 h 10 µg/m <sup>3</sup> promedio de 24 h

**Tabla 1. Concentraciones de los contaminantes criterio según lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Norma Oficial Mexicana (NOM).**

Datos obtenidos de la OMS y del SIMAT (2014).

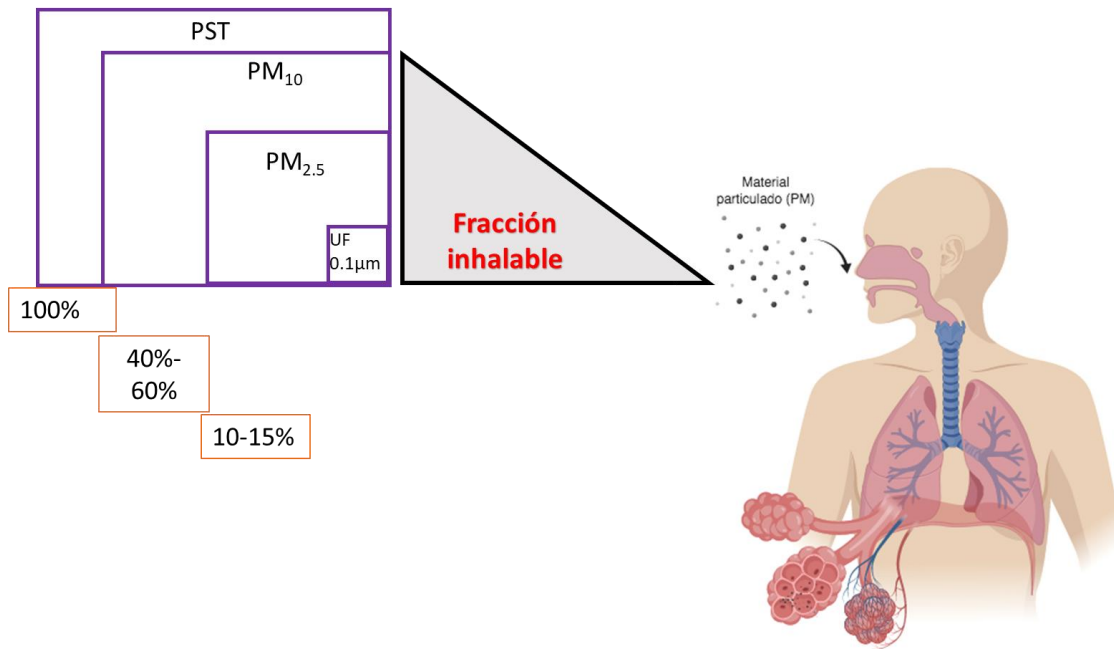
Dentro de los contaminantes criterio, el material particulado con un diámetro aerodinámico ≤10 µm (PM<sub>10</sub>) y el material particulado con un diámetro aerodinámico ≤2.5 µm (PM<sub>2.5</sub>) son de gran interés debido a que forman parte de los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiopulmonares y cardiovasculares (Correia et al., 2013; Loomis et al., 2014b), así como cáncer de pulmón y en el 2013, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó a la contaminación del aire, incluyendo a las PM<sub>10</sub> y a las PM<sub>2.5</sub> como un carcinógeno del grupo 1 (anexo 1), ya que se encontró evidencia suficiente del potencial carcinogénico en humanos, a través de la revisión de más de mil publicaciones científicas (Loomis et al., 2014a). Dicha clasificación realizada por la IARC se basó en la evidencia científica obtenida y se definió por encontrar una asociación de carcinogenicidad en los humanos.

## **1.2 El material particulado**

Las PM son un contaminante complejo por su origen y composición y pueden ser clasificadas de diferentes formas. Dentro de las clasificaciones se encuentra la que se basa en la fuente de origen, que las clasifica en naturales y antropogénicas. Estas últimas incluyen la quema de combustibles fósiles, el tráfico, erosión del pavimento, actividades agrícolas e industriales, entre otras (Anderson et al., 2012; Baccini et al., 2011). Las fuentes naturales comprenden incendios forestales,

erupciones volcánicas, la brisa marina, tormentas de arena, etc. (Atkinson et al., 2010). De acuerdo a la fuente de emisión, las PM se clasifican en primarias y secundarias: si las PM son emitidas directamente a la atmósfera se les llama primarias, pero si provienen de un proceso de conversión de gases como los sulfatos, nitratos y componentes orgánicos a sólido, se les llama secundarias. Sin embargo, es el diámetro aerodinámico, cuya clasificación describe la habilidad de las PM de desplazarse por la atmósfera e ingresar a las vías respiratorias (Brauer et al., 2001; Falcon-Rodriguez et al., 2016; Kim et al., 2015).

Con base a su diámetro aerodinámico, las PM se clasifican en partículas suspendidas totales (PST) cuyo tamaño aerodinámico va desde los 30 hasta los 70  $\mu\text{m}$ ; material particulado con un diámetro aerodinámico  $\leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ), las partículas con un diámetro aerodinámico  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) y las partículas con un diámetro aerodinámico  $\leq 0.1 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{0.1}$ ) (Esworthy, 2013) (Figura 1). Las fracciones equivalentes o menores a  $\text{PM}_{10}$  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 (Brauer et al., 2001; Englert, 2004; Pope y Dockery, 2006).



**Figura 1. Clasificación del material particulado de acuerdo con su tamaño aerodinámico.** El material particulado (Particulate Matter, PM por sus siglas en inglés) se clasifica en partículas suspendidas totales (PST) ( $>50\ \mu\text{m}$ ) que comprenden el 100% de las partículas. Dentro de ellas se encuentran contenidas las PM<sub>10</sub> con diámetro aerodinámico menor o igual a  $10\ \mu\text{m}$ , conocidas como la fracción inhalable (representada por el triángulo azul) las cuáles son retenidas alrededor del árbol bronquial y que comprenden 40% de las PST; dentro de ellas se encuentran las PM<sub>2.5</sub> con diámetro aerodinámico menor o igual a  $2.5\ \mu\text{m}$  que comprenden del 16% de las PST, que pueden alcanzar los alveolos y depositarse, y la fracción ultrafina (UF), cuyo tamaño aerodinámico es igual o menor a  $0.1\ \mu\text{m}$ , pueden penetrar los alveolos y alcanzar la circulación sanguínea (Kim et al., 2015). El triángulo negro indica la fracción inhalable que puede alcanzar los alveolos en el tracto respiratorio y los recuadros de color naranja incluyen los porcentajes de las partículas: 100% PST, 40-60% PM<sub>10</sub> y 10-15% PM<sub>2.5</sub>.

Las PM<sub>10</sub> son una mezcla heterogénea 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 biológicos como endotoxinas, polen, bacterias, hongos y compuestos inorgánicos, entre los que destacan metales como hierro, cobre, aluminio, sílice, fósforo, titanio, manganeso, entre otros (Chirino et al., 2015; Morakinyo et al., 2016).

Las PM<sub>10</sub> son emitidas a la atmósfera directamente o a partir de la conversión de gases precursores tales como dióxido de azufre, amonio y componentes volátiles (Atkinson et al., 2010). El proceso de formación de las partículas incluye tres etapas:

nucleación, la cual depende de la concentración de gases, humedad y temperatura que se encuentre en la atmósfera, durante esta etapa se forma el núcleo de la partícula que en su mayoría es de carbón. En seguida hay una etapa de condensación de gases calientes y finalmente la fase de coagulación, durante la cual se van añadiendo otros elementos a las partículas siguiendo movimientos brownianos (Falcon-Rodriguez et al., 2016; Raes et al., 2000).

En la tabla 2 se muestran los componentes más importantes que contienen las PM<sub>10</sub> de una zona urbana residencial de la CDMX.

**Tabla 2. Componentes de las PM<sub>10</sub> de la CDMX recolectadas en el 2007**

Fracción orgánica	Fracción inorgánica	Fracción biológica
Naftaleno	Aluminio (Al)	Endotoxinas
Acenaftileno	Silicio (Si)	Bacterias
Acenafteno	Fósforo (P)	Hongos
Fluoreno	Azúfre (S)	Polen
Fenantreno	Cloro (Cl)	
Antraceno	Potasio (K)	
Fluoranteno	Calcio (Ca)	
Pireno	Titanio (Ti)	
Benzo(a)antraceno	Cromo (Cr)	
Criseno	Manganeso (Mn)	
Benzo(b)fluoranteno	Hierro (Fe)	
Benzo (k)fluoranteno	Níquel (Ni)	
Benzo(a)pireno	Cobre (Cu)	
Dibenzo(a,h)antraceno	Estaño (Zn)	
Benzo(h,h,i)perileno	Plomo (Pb)	
Indeno		

Composición de las PM<sub>10</sub> de la CDMX (Chirino et al., 2017).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Efectos de las PM en la salud humana

#### 2.1.1 Estudios epidemiológicos

En el 2018, la OMS estimó que la contaminación del aire de extramuros e intramuros causó 9 millones de muertes prematuras alrededor del mundo (Landrigan et al., 2018) y actualmente se estima que la contaminación del aire extramuros causa 4.2

millones de muertes al año. En este sentido se realizaron estudios epidemiológicos para entender el impacto de las PM en la salud de los humanos. Estos estudios describieron que la exposición aguda a PM aumenta los padecimientos oftálmicos, las cefaleas y hay un incremento en el número de hospitalizaciones (Chang et al., 2015; Dominici et al., 2006; Mo et al., 2018). Por ejemplo, Ferreira y colaboradores reportaron que por cada aumento de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{10}$ , hay un incremento de 12.8% de hospitalizaciones por enfermedades respiratorias en una población de São José dos Campos, Brasil en la que se revisaron expedientes de aproximadamente 40 000 pacientes pertenecientes al Sistema Único de Saúde (SUS) admitidos desde marzo del 2010 a febrero del 2011 (Ferreira et al., 2016). Por otro lado, en Estados Unidos de América (EUA), se revisó una base de datos de admisiones hospitalarias desde 1999 a 2002, que incluía 11.5 millones de pacientes en los cuáles se relacionó el aumento de 0.6% de hospitalizaciones por enfermedades cardiovasculares cuando se rebasaban los límites máximos permisibles para  $\text{PM}_{2.5}$  (Dominici et al., 2006; Guo et al., 2018). Recientemente, Li y colaboradores (2019) describieron que un incremento en las concentraciones de  $\text{PM}_{10}$  de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , aumentaba los ingresos hospitalarios por infartos al miocardio en 3.62% en un estudio en el que se incluyeron 347 pacientes (Li et al., 2019).

Por otra parte, Dockery y colaboradores (1993), siguieron una cohorte de una población que incluyó 8,111 participantes durante 18 años, con la cual demostró que un incremento de  $18.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en los índices de  $\text{PM}_{10}$  aumenta la mortalidad en un 29% (Dockery et al., 1993). En un estudio, en el cual se empleó la base de datos American Cancer Society Cancer Prevention Study 2 (ACS CPS 2) que incluyó 552,138 pacientes de 151 áreas metropolitanas, se determinó que un incremento en la concentración de  $\text{PM}_{10}$  de  $24.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  aumenta el 17% de mortalidad entre ellas por cáncer de pulmón y enfermedades cardiopulmonares (Pope, 1995). Posteriormente, este estudio se amplió incluyendo 1.2 millones de participantes y si bien no se encontraron asociaciones con  $\text{PM}_{10}$ , se estimó que por cada aumento de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{2.5}$ , se asociaba a 9% de mortalidad por enfermedades cardiopulmonares (Pope III, 2002). Cabe destacar que dentro de las  $\text{PM}_{10}$  se encuentran contenidas las  $\text{PM}_{2.5}$ , en un porcentaje que va desde un 15 hasta un

40%. En otro estudio en el cual se siguió a una población que incluyó 39 mil personas en el norte de China durante 12 años, se estimó que un aumento de 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{10}$  se asociaba con un incremento del 6% de mortalidad por cáncer de pulmón, con un mayor riesgo para personas mayores de 60 años (Chen et al., 2016).

En un estudio realizado en México, se informó que un incremento de 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{2.5}$  aumentaba 1.4% la tasa de mortalidad dentro de los 4 días posteriores a la exposición en la CDMX expuesta entre 1993-1995 (Borja-Aburto et al., 1998). Dentro de ese mismo estudio, se asoció a la exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  con mortalidad por enfermedades cardiovasculares y pulmonares de personas mayores de 65 años. Un estudio más reciente realizado en México demostró que un aumento en la concentración de  $\text{PM}_{2.5}$ , se asocia con un incremento de 1.22% y de 3.43% de mortalidad por enfermedades cardiovascular y cerebrovascular, respectivamente (Gutiérrez-Avila et al., 2018).

Importantemente, en la CDMX, el Sistema Nacional de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) informó que las normas para ozono (0.070 ppm),  $\text{PM}_{10}$  (40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) y  $\text{PM}_{2.5}$  (12  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), no se cumplen, pues se rebasan los límites permisibles anualmente.

### **2.1.2 Estudios toxicológicos**

Para dilucidar los mecanismos por los cuáles la exposición a PM induce daño a la salud de los humanos, se han realizado diversos estudios toxicológicos, los cuales demostraron los efectos adversos que producen las partículas. A grandes rasgos se demostró que las PM inducen daño al DNA, procesos inflamatorios y estrés oxidante. (Bonetta et al., 2009; Falcon-Rodriguez et al., 2017; Sánchez-Pérez et al., 2009).

En cuanto al daño al DNA, se reportó que, en las células alveolares de pulmón humano, A549, la exposición a  $\text{PM}_{10}$  induce el rompimiento del DNA de doble cadena y en respuesta a ello, la variante de la histona H2A.X es fosforilada en serina (Ser) 139, conocida como gamma-H2A.X ( $\gamma\text{-H2A.X}$ ). Se determinó un incremento en los niveles de fosforilación de las proteínas ataxia telangiectancia (ATM) y de la

proteína Rad-3 relacionada con la cinasa ATM (ATR), las cuáles son las responsables de fosforilar a  $\gamma$ -H2A.X y a p53 en Ser 15; sin embargo, aunque se activa la respuesta al daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés), el ciclo celular no se detiene y los porcentajes de apoptosis son del 5% (Sánchez-Pérez et al., 2009).

Otro de los efectos descritos posterior a la exposición a PM<sub>10</sub> es la inducción de marcadores de inflamación, como la secreción de las Interleucinas 6 y 8 (IL-6 y IL-8) y en factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Alfaro-Moreno et al, 2002), las cuáles se asociaron al contenido de endotoxina presenten en las PM<sub>10</sub>. Además se reportó la secreción de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM -1) y de la molécula de citoadhesión vascular (VCAM), las cuales son importantes mediadores de la inflamación y la extravasación de leucocitos y pueden exacerbar enfermedades como el asma, la enfermedad pulmonar crónico obstructiva (EPOC) y la fibrosis pulmonar, por mencionar algunas (Botelho et al., 2011; Kelly and Fussell, 2011; Wang et al., 2019).

El estrés oxidante se asocia como el inductor de estos mediadores inflamatorios en respuesta a la liberación de ERO y de especies reactivas de nitrógeno (ERN), principalmente a cargo de los macrófagos alveolares presentes en el pulmón (Donaldson et al., 2003). Además, la activación e inactivación de proteínas que intervienen en la señalización celular. como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) dentro de los que se encuentran las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), las cinasas c-jun N-terminal (JNK) y la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (p38) (Deng et al., 2014; Lee et al., 2016; Wang et al., 2017). Las PM también provocan la transactivación de los miembros de estas vías como c-jun, el factor activador 2 (ATF2) y 3 (ATF3), y la proteína de unión a elementos de respuesta (CREB) a adenosín monofosfato cíclico (AMPc), resultando en la remodelación de la cromatina y la expresión de genes que participan en inflamación, apoptosis, metabolismo, entre otros (Li y Lin, 2018; Salcido-Neyoy et al., 2015; Yan et al., 2018).



### 2.1.3 Estrés oxidante y PM<sub>10</sub>

El estrés oxidante aparece cuando la generación de ERO excede la capacidad neutralizante de la célula (Valko et al., 2007) . La concentración neta de ERO ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $ONOO^{\cdot-}$  entre otras) en una célula está determinada por el balance en su producción y la capacidad del sistema antioxidante para removerlas regida por las enzimas antioxidantes SOD 1, 2 y 3, catalasa, glutatión S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (Gpx). También por sistemas no enzimáticos como el glutatión (GSH) y la coenzima Q, por mencionar algunos.

La generación de ERO pueden provenir de fuentes celulares endógenas, entre ellas la mitocondria para la generación de ATP y las NADPH oxidasas, o bien de las enzimas xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa, los citocromos P450 y las lipooxigenasas. Otros organelos como los peroxisomas o el retículo endoplásmico también pueden producir ERO (Holmström y Finkel, 2014).

Los componentes químicos de las PM producen ERO y estrés oxidante, principalmente los metales como cromo, cobalto, níquel, manganeso, zinc, vanadio, cobre y hierro que se encuentran en altas concentraciones en las PM que provienen de la combustión fósil (Mazzoli-Rocha et al., 2010). Los metales de transición como el hierro y el cobre pueden reaccionar con el  $H_2O_2$  a través de las reacciones de tipo Fenton para dar lugar al  $\cdot OH$ , el cual es altamente reactivo y si éste se produce cerca de membranas celulares oxida a los ácidos grasos poliinsaturados. Esto inicia una cascada de reacciones en las cuales se generan productos de la peroxidación como el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Rahman, 2003). El  $\cdot OH$  también puede dañar al DNA mediante la oxidación de bases nitrogenadas principalmente a la guanina, formando la 8-oxo,7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) (Knaapen et al., 2002) y la consecuente formación de aductos que puede llevar al rompimiento del DNA.

En estudios previos se encontró que las PM<sub>10</sub> disminuyen la capacidad del sistema antioxidante; por ejemplo, en células expuestas a PM<sub>10</sub>, se disminuye la actividad catalasa, SOD1 y SOD2, GST y GR (Chirino et al., 2010; Yi et al., 2014).

Es importante mencionar que catalasa es una enzima que dismuta el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno (Figura 2) (Glorieux et al., 2015) y que cuando no hay un correcto funcionamiento de ésta los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementan (1mM) y actúan como segundos mensajeros y en vías de señalización que inducen proliferación y contribuyen a carcinogénesis (Röhrdanz y Kahl, 1998).



**Figura 2. Reacción que cataliza la catalasa.** La enzima dismuta el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua y oxígeno.

Diferentes estudios demostraron que en modelos celulares de cáncer hay cambios en los niveles de expresión de catalasa y dentro de las proteínas que modulan la expresión de catalasa se encuentra el factor de transcripción Forkhead bOx 3 (FoxO3a) el cual es regulado por la proteína cinasa B, mejor conocida como AKT (Glorieux y Calderon, 2017).

En modelos celulares expuestos a PM<sub>10</sub> si bien se ha demostrado que disminuye la actividad de catalasa, no se han descrito los mecanismos que estén modulando su expresión a través de vías de señalización amplificadas en cáncer.

#### 2.1.4 La regulación del ciclo celular

Las células se dividen a través de una serie de pasos ordenados denominados ciclo celular y su función no solamente es dar origen a otras células, sino asegurar que el proceso se realice de manera regulada. El ciclo celular se divide en dos fases: la interfase en donde la célula crece y la fase M que agrupa a la mitosis y a la meiosis en las cuáles la célula se divide.

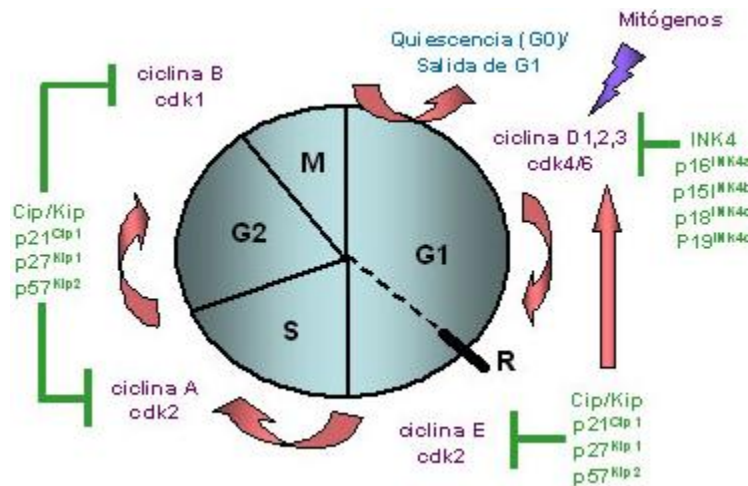
La interfase comprende tres etapas: G1 (Gap, intervalo 1), la fase S (síntesis), en la cual se sintetiza el DNA y la fase G2 (Gap, intervalo 2).

El control del ciclo celular se regula por señales externas, efectuadas por mitógenos o señales extracelulares y por controles internos, el cual está a cargo de proteínas cuyas acciones podrían resumirse en activar e inhibir a otras proteínas. Los principales efectores de esta regulación son: 1) Los complejos cinasas

dependientes de ciclina-ciclinas (cdk-ciclinas) y 2) las inhibidoras de los complejos cdk-ciclinas (Figura 3).

Los complejos cdk-ciclinas están compuestos por dos proteínas: las cdk y las ciclinas que pasan por un ciclo de síntesis y degradación. Los complejos cdk-ciclinas se encargan de fosforilar proteínas en el transcurso del ciclo celular.

Por el contrario, las proteínas inhibidoras, se dividen en dos grupos, las inhibidoras de la cdk4 (INK4) y las proteínas inhibidoras de las cdk's (CIP). A las INK4 pertenece p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup>, y dentro de las CIP se encuentran p21<sup>Cip1/waf1</sup>, p27<sup>kip1</sup> y p53.



**Figura 3. Regulación del ciclo celular.** El ciclo celular se regula por los complejos cinasas dependientes de ciclina-ciclina (cdk-ciclina) y los inhibidores de los complejos cdk-ciclina (CIP). En color morado se muestran las ciclinas y las cdk y en color verde a los inhibidores de los complejos cdk-ciclina (CIP). Intervalo 1 (G1), fase de síntesis (S), intervalo 2 (G2) y fase de mitosis (M).

La proteína p27<sup>kip1</sup> es una inhibidora de los complejos cdk2/ciclina E/A, complejo que se encarga de regular la transición de la G1/S (Polyak et al., 1994) y de los complejos cdk4/6 /ciclina D, controlando así la proliferación celular. Cuando la proteína p27<sup>kip1</sup> se une al complejo cdk2/ciclina E/A, éste es incapaz de fosforilar a la proteína retinoblastoma (Rb), por lo que hay una pausa en la transcripción de los genes para la progresión a la fase S, pero si se une a los complejos cdk4/6 /ciclina D en células quiescentes o senescentes, éstas impiden la transcripción del factor de elongación 2 (E2F) (Aleem et al., 2005).

La proteína p27<sup>kip1</sup> es regulada por fosforilaciones y a nivel transcripcional por proteínas como FoxO, menina (MENIN), c-myc y la proteína putativa de la membrana integral (PIMP). Dentro de estas, la proteína FoxO3a es el principal regulador transcripcional de p27<sup>kip1</sup> y la disminución en los niveles de proteína se relaciona con la inactivación de FoxO3a vía AKT (Hnit et al., 2015).

#### **2.1.4.1 Efecto de las PM<sub>10</sub> en el ciclo celular**

En células epiteliales de pulmón A549 se describió que la exposición a PM<sub>10</sub> no induce arresto del ciclo celular (Sánchez-Pérez et al., 2009) pero sí inducen la estabilización de p21<sup>cip/waf1</sup> en el citoplasma mediante la fosforilación en treonina (Thr) 145 y Ser 146 (Sánchez-Pérez et al., 2014). p21<sup>cip/waf1</sup> es una proteína inhibidora de los complejos cdk-ciclina -cdk2 y -cdk1, regulando la transición de la fase G1/S, S/G2 y G2/M (Abbas y Dutta, 2009) y su desregulación en las células A549 se asoció a un fenotipo senescencia (Sánchez-Pérez et al., 2014), a la formación de fibras de estrés de actina para la remodelación del citoesqueleto a través de la vía de ROCK, que está relacionado a migración celular (Chirino et al., 2017) y a la evasión de la apoptosis mediada por STAT3 (Reyes-Zárate et al., 2016a).

Lo anterior sugiere que las PM<sub>10</sub> desregulan vías implicadas en la detención del ciclo celular y que es probable que otras proteínas que inhiben el ciclo celular se alteran por la exposición a partículas.

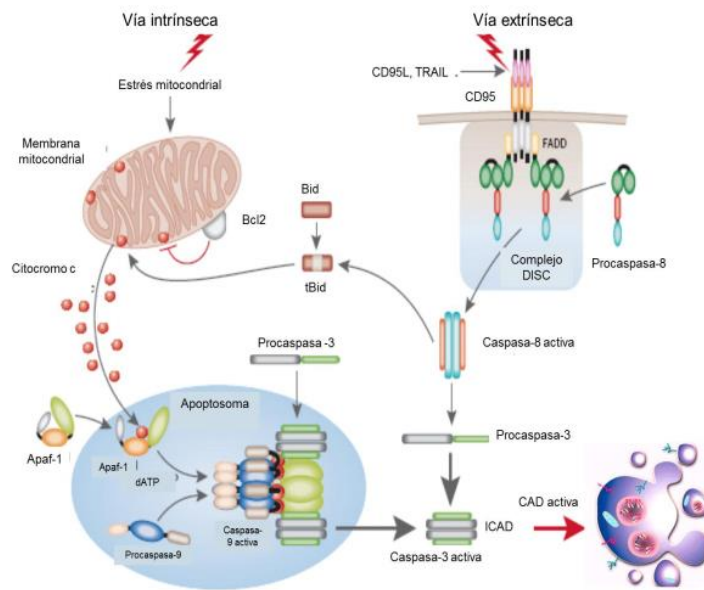
Una de estas proteínas es p27<sup>kip1</sup> que se regula la transición de G1/S. Se evaluó que en exposiciones a contaminantes, entre ellos el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y el hexaclorobenceno (HCB) (Ventura et al., 2017; Xu et al., 2014), los niveles de ésta aumentan y se detiene el ciclo celular; sin embargo, no se ha descrito su participación en exposiciones a PM<sub>10</sub>.

#### **2.1.5 La apoptosis**

La muerte celular por apoptosis es un proceso de pasos ordenados en el cual una célula se destruye a sí misma para ser fagocitada por otras células. Durante el proceso de apoptosis se observan cambios morfológicos en los cuales las células

se hacen picnóticas, el citoesqueleto se colapsa, se desensambla la envoltura nuclear, se condensa la cromatina y se rompe en fragmentos (Taylor et al., 2008). La apoptosis se desencadena por una familia de proteasas llamadas caspasas (c de cisteína y asp de ácido aspártico) de dos clases: iniciadoras (caspasa 8 y 9 que existen como monómeros inactivos en el citosol) y ejecutoras (caspasa 3, 6 y 7, las cuales existen como dímeros inactivos en citosol) (Nicholson, 1999). La principal función de las caspasas iniciadoras es activar a las caspasas ejecutoras cuando son escindidas en el dominio de proteasa. Existen dos vías para la activación de las caspasas iniciadoras: la vía extrínseca en la cual la señal de muerte proviene del exterior, a través de receptores como el TNF- $\alpha$  y la vía intrínseca, que es mediada por la mitocondria. En la vía extrínseca hay activación de receptores de muerte como CD95 que es activado por el ligando de Fas (FasL) y por receptores de ligando que inducen la apoptosis relacionada con TNF (TRAIL-R). Cuando el receptor Fas (Fas-R) es activado por FasL, los dominios de muerte del receptor se unen a proteínas adaptadoras intracelulares (FADD) y después a la caspasa iniciadora 8 para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Posteriormente, las caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras (Beaudouin et al., 2013) (Figura 4).

Por otro lado, la activación de la vía intrínseca a menudo responde a condiciones de estrés, como el daño a DNA. Esta vía se caracteriza por la liberación de proteínas del espacio intermembrana, entre ellas el citocromo c, un componente de la cadena de transporte de electrones. La liberación del citocromo le da como nueva función unirse al factor activador de proteasas de la apoptosis 1 (Apaf1) y que después Apaf1 se oligomerice para formar el heptámero llamado apoptosoma. Las proteínas Apaf1 en el apoptosoma reclutan a las caspasas 9, que se activan por proximidad inducida con el apoptosoma y posteriormente activan a las caspasas ejecutoras (caspasa 3) (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismos de muerte celular por apoptosis: vía intrínseca y extrínseca.** La vía intrínseca se caracteriza por la despolarización de la membrana mitocondrial en respuesta a estímulos como agentes quimioterapéuticos, radiación UV, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN), lo cual lleva a la liberación del citocromo c al citoplasma que se une al factor activador de proteasas de la apoptosis 1 (Apaf1) y la posterior activación de las caspasas iniciadoras (caspasa 9), que posteriormente activa a la caspasa ejecutora (caspasa 3). La vía extrínseca se inicia cuando se unen los receptores de muerte (TRAILR, CD95) a su propio ligando (TRAIL, CD95L) y los dominios de muerte del receptor se unen a las proteínas adaptadoras intracelulares (FADD) para la posterior activación de la caspasa iniciadora (caspasa 8) para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), entonces la caspasa 8 activa a la casapasa 3. En ambos casos, la célula apoptótica experimenta cambios morfológicos y bioquímicos de una célula apoptótica. Modificado de (MacFarlane y Williams, 2004).

#### 2.1.5.1 PM<sub>10</sub> y su efecto en apoptosis

La exposición aguda a PM<sub>10</sub> *in vitro* tiene un efecto en apoptosis por diferentes mecanismos pues mientras unos grupos reportan una nula apoptosis, otros presentan la activación de componentes de las vías de apoptosis, entre ellas las caspasas (Tabla 3). Estas discrepancias pueden deberse al tipo de estirpe celular empleada, la concentración de componentes orgánicos e inorgánicos presentes en las partículas y a la concentración de PM<sub>10</sub> utilizada en los diferentes estudios (Peixoto et al., 2017).

La generación de estrés oxidante se plantea como el principal inductor de apoptosis, principalmente en la activación de la vía intrínseca mediada por la liberación del citocromo c y la subsecuente activación de la caspasa 9 y 3 (Cimino et al., 2014; Upadhyay et al., 2003).

Recientemente se encontró que las PM<sub>10</sub> inducen la evasión de apoptosis en células A549 a través de la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). La proteína STAT3 se activa por fosforilaciones en tirosina (Tyr) 705 y Ser 727 en respuesta a estímulos como interleucinas, factores de crecimiento y ERO induciendo proliferación celular. Se reportó que cuando se inhibe la activación de este factor de transcripción, los porcentajes de apoptosis incrementan hasta un 28.8% (Reyes-Zárate et al., 2016a).

Lo anterior, llama la atención en evaluar vías de señalización que modulan la apoptosis en exposiciones agudas a PM<sub>10</sub> debido a que su desregulación está asociada con el desarrollo de enfermedades, entre ellas el cáncer.

Dentro de las vías implicadas en apoptosis (tabla 4), se encuentra la de la proteína cinasa B (AKT) que regula al factor de transcripción Forkhead bOx 3 (FoxO3a). Esta vía resulta de gran interés debido a que la inactivación de FoxO3a vía AKT está asociada a mal pronóstico en modelos celulares de cáncer debido a que FoxO3a modula la expresión de genes que participan en el arresto del ciclo celular, en la resistencia a estrés y en apoptosis, además si este factor de transcripción se encuentra desregulado en exposiciones a PM<sub>10</sub>, no ha sido descrito, pero sí la activación de AKT (Beaver et al., 2009; C.-W. Liu et al., 2018; Su et al., 2017). Por lo anterior, es importante determinar si la vía de AKT/FoxO3a se encuentra activada en exposiciones a PM<sub>10</sub> para dilucidar los mecanismos por los cuales las partículas inhiben la apoptosis.

Tabla 3. PM<sub>10</sub> y apoptosis

Trabajo	Autores
En los modelos celulares J774A.1, A549 y HUVEC expuestas a PM <sub>10</sub> (160 µg/cm <sup>2</sup> ) de tres zonas (norte, sur y centro), los porcentajes máximos de apoptosis fueron del 15% (en las tres zonas), 15% (norte) y 6% (norte), respectivamente. CDMX, México.	(Alfaro-Moreno et al., 2002)
En las células A59, la exposición a PM <sub>10</sub> (100 µg/cm <sup>2</sup> ) induce daño a DNA, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y activación de la caspasa 9. Dusseldorf, Alemania.	(Upadhyay et al., 2003)
En las células A549 se activa la apoptosis intrínseca mediada por p53 a diferentes concentraciones de PM <sub>10</sub> .	(Soberanes et al., 2006)
En las células A549, la exposición a PM <sub>10</sub> (10 µg/cm <sup>2</sup> ) induce daño a DNA, se activa p53 a través de ATM y ATR, sin cambios en los porcentajes de apoptosis con respecto a las células control. CDMX, México.	(Sánchez-Pérez et al., 2009)
En las células BEAS-2B, la exposición a PM <sub>10</sub> (25 µg/cm <sup>2</sup> ) de invierno inducen necrosis, mientras las PM <sub>2.5</sub> (25 µg/cm <sup>2</sup> ) de invierno inducen estrés oxidante y apoptosis. Milán, Italia.	(Gualtieri et al., 2011)
En leucocitos, la exposición a la fracción orgánica de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de PM <sub>10</sub> de diferentes zonas, induce la activación de caspasa 3. Mesina Francia.	(Cimino et al., 2014)
En las células A549, la exposición a PM <sub>10</sub> (10 µg/cm <sup>2</sup> ) induce evasión de apoptosis a través de la activación de STAT3. CDMX, México.	(Reyes-Zárate et al., 2016a)
En un modelo <i>in vivo</i> de ratones, se observó que la administración ocular de PM <sub>10</sub> (5 mg/mL) induce apoptosis en las células de la cornea. Xi'an, China.	(Li et al., 2017)



### 2.1.6 La vía de AKT/ FoxO3a

La vía de AKT/FoxO3a es una vía de señalización que modula la sobrevivencia celular a través de la inactivación de los factores de transcripción FoxO, inhibiendo así la respuesta a estrés, el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Klotz et al., 2015; Zhang et al., 2011). La proteína AKT, es una proteína serina/treonina que se activa mediante la unión de un factor de crecimiento a los receptores tirosina cinasa (RTK), receptores de citocinas (ILR), receptores de proteínas acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores de células T y B o a receptores de integrinas de una manera dependiente de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) (Manning and Toker, 2017).

La unión del factor de crecimiento al receptor induce el reclutamiento de la proteína PI3K a la membrana plasmática, la cual cataliza la conversión de fosfatidil inositol (3,4) bifosfato (PIP2) a fosfatidil inositol (4,5,6) trifosfato (PIP3) que actúa como un segundo mensajero y activa a la proteína 3-cinasa dependiente de fosfoinositol (PDK1), la cual fosforila a la proteína AKT en thr 308. La fosforilación de la proteína AKT en el residuo ser 473 es llevada a cabo por la proteína diana de rampamicina de mamífero (mTOR) (Vivanco y Sawyers, 2002) y se ha descrito que la fosforilación en este residuo es suficiente para promover la activación de la proteína AKT (Sarbasov, 2005). La proteína AKT activa induce la inactivación de FoxO3a fosforilándolo en thr 32, ser 253 y ser 315, las cuales propician la unión de las proteínas chaperonas 14-3-3 que exportan a FoxO3a al citoplasma en donde puede ser degradado vía proteosoma (Figura 5) (Brunet et al., 1999; Calnan y Brunet, 2008). Se realizaron estudios en los cuales se demostró que la fosforilación del FoxO3a en ser 253 es suficiente para inducir su inactivación, además de que esto promueve la fosforilación de los demás sitios (thr 32 y ser 315) (Dobson et al., 2011). Si FoxO3a se inactiva se inhibe la transcripción de las proteínas proapoptóticas BIM y PUMA, del ligando de Fas (FasL), de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD2 y de la proteína inhibidora de la cinasa 1, mejor conocida como p27<sup>kip1</sup>. Sin embargo, cuando FoxO3a se encuentra retenido en citoplasma, la proteína cinasa C-Jun (JNK) puede reactivarlo e inducir su retorno al núcleo para activar la transcripción

de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD2 bajo condiciones de estrés celular (Essers et al., 2004). Interes

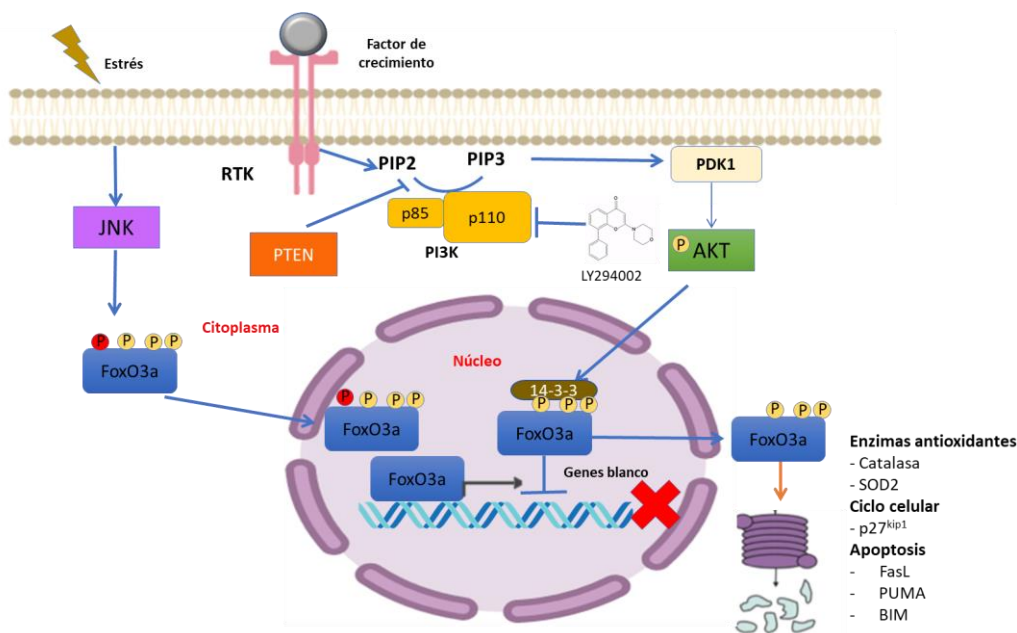
Actualmente, se han descrito cuatro proteínas FoxO en mamíferos: Forkhead box O1 (FoxO1), Forkhead box O3 (FoxO3), Forkhead box O4 (FoxO4) y Forkhead box O6 (FoxO6), las cuáles son tejido-específico. Las proteínas FoxO1 y FoxO4 se expresan principalmente en tejido adiposo y en el músculo esquelético, la proteína FoxO3 es abundante principalmente en pulmón, mama, hígado, y la proteína FoxO6 que se expresa solo en cerebro (Greer y Brunet, 2005a; Huang y Tindall, 2011). Todas ellas comparten un dominio de unión al DNA llamado Forkhead o winged helix domain y reconocen dos secuencias consenso: 5'GTAAA(T/C) AA-3', conocido como el elemento de unión de miembros de la familia Daf-16 (DBE) y 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3' que se encuentra presente en la región promotora conocida como la secuencia de respuesta a insulina (IRE) (Obsil and Obsilova, 2011).

El factor de transcripción FoxO3, conocido también como FoxO3a, se encuentra localizado en el cromosoma 6q21 (Anderson et al., 1998). Se han identificado 6 variantes, de las cuales dos de ellas codifican a la misma proteína y en los humanos se reportó un pseudogene, FoxO3b (Arden, 2006).

El factor de transcripción FoxO3a participa en varios procesos que implican la expresión y actividad de genes de apoptosis, metabolismo, reparación del DNA, ciclo celular y respuesta antioxidante (Y. Liu et al., 2018). Además, se informó sobre su desregulación en cáncer, pues su inactivación está relacionada con un peor pronóstico en leucemias, cáncer de mama y cáncer de pulmón. Además, se demostró que la resistencia a apoptosis en pacientes con cáncer colorrectal que son sometidos a radioterapia y en cáncer de mama en pacientes tratados con cis-platino estaba relacionada a la inactivación del factor de transcripción FoxO3a vía AKT (Ding et al., 2015; Liu et al., 2014; Wang et al., 2018).

Por otro lado, se reportó la participación de FoxO3a en exposiciones a contaminantes presentes en el aire. Por ejemplo, en un modelo *in vivo*, se determinó

la activación de FoxO3a en exposiciones a ozono en la regulación de las enzimas catalasa y SOD2, así como la activación de la caspasa 3, sugiriendo que este factor de transcripción es importante en el mantenimiento de la homeostasis celular bajo condiciones de estrés oxidante (Gómez-Crisóstomo et al., 2014). El grupo de Xu et al. (2014) informó que el factor de transcripción FoxO3a regula a la proteína p27<sup>kip1</sup> *in vitro* e *in vivo*, en exposiciones a TCDD, una dioxina que se encuentra presente en las PM<sub>10</sub> (Kouimtzis et al., 2002) y que este mecanismo era dependiente de receptor de aril hidrocarburos (AhR).



**Figura 5. Inactivación de FoxO3a por AKT.** La activación del receptor de tirosina cinasa (RTK), desencadena el reclutamiento a la membrana plasmática de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), que cataliza la conversión de fosfatidil inositol (3,4) bifosfato (PIP2) a fosfatidil inositol (4,5,6) trifosfato (PIP3). PIP3 es un segundo mensajero que interactúa con la proteína 3-cinasa dependiente de fosfoinositol (PDK1) que activa a AKT. La proteína AKT inactiva al factor de transcripción Forkhead bOx 3 (FoxO3a) al fosforilarlo en thr 32, ser 253 y ser 315 las cuales impiden su unión al DNA e inducen la unión de las proteínas chaperonas 14-3-3, que exportan a FoxO3a al citoplasma en donde puede ser degradado vía proteosoma impidiendo la transcripción de las proteínas proapoptóticas PUMA y BIM, del ligando de fas (FasL), del inhibidor 1B quinasa dependiente de ciclina (p27<sup>kip1</sup>) y de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa 2(SOD2). En condiciones de estrés celular, la proteína cinasa c-Jun (JNK) puede fosforilar a FoxO3a e inducir su activación para importarlo a núcleo para la transcripción de genes de respuesta a estrés (catalasa, SOD2).

El grupo de Al-Anati y colaboradores, por su parte, reportó que la co-exposición de los contaminantes Benzo[a]pireno (BaP) y bifenilos policlorados (PCBs), también contenidas en las PM, se inhibe la apoptosis a través de FoxO3a. Además, demostraron que la inhibición de apoptosis se debía al secuestro de p53 por el factor de transcripción FoxO3a. Se informó que si bien, la exposición a solo BaP inducía apoptosis, cuando se utilizaban mezclas de PCBs, TCDD y estradiol, la apoptosis se atenuaba mediante un mecanismo que involucraba a las fosfatasa 2 A (PP2A) (Al-Anati et al., 2014).

La participación del factor de transcripción FoxO3a en exposiciones a PM<sub>10</sub> no se ha descrito; sin embargo, los componentes como el TCDD y los PCBs están contenidos en ella, aunque varían en proporción y la zona en la cual se recolectaron las partículas. Además, la sola presencia de alguno de esos compuestos no garantiza la inducción de apoptosis, sino que es necesaria la activación de vías que le indiquen a la célula la decisión entre vivir o morir.

Aunado a lo anterior, el grupo de trabajo reporta porcentajes bajos de apoptosis durante una exposición aguda a concentraciones sub-letales, sin embargo, se activa la maquinaria de daño a DNA. Interesantemente, no hay detención del ciclo celular necesario para la activación de mecanismos de reparación, lo cual sugiere que las células continúan proliferando y podrían llevar mutaciones relacionadas a inestabilidad genética.

He ahí el interés de determinar la alteración de proteínas que participan en la inducción de apoptosis y que podrían estar inhibiendo la apoptosis en células expuestas a PM<sub>10</sub>, mediante la activación de vías de señalización relacionadas a procesos carcinogénicos como la vía de AKT/FoxO3a.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las PM<sub>10</sub> están clasificadas como carcinógeno del grupo 1 por la IARC y son consideradas un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón. Si bien, los estudios toxicológicos previos han permitido entender los mecanismos por los cuáles las partículas inducen alteraciones a nivel celular, aun falta mucho por explorar.

Se ha demostrado que las PM<sub>10</sub> inducen inflamación, daño al DNA y estrés oxidante, además de la activación de vías de vías de señalización que inhiben apoptosis y la inactivación de proteínas que controlan la transición del ciclo celular. Además, la exposición a un segundo reto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual se encuentra presente normalmente en las células como un subproducto de la fosforilación oxidativa, cuyas concentraciones incrementan en periodos de inflamación sostenida en enfermedades como EPOC y asma, no induce cambios en la viabilidad celular. Esto llama la atención a estudiar la activación de vías de señalización bajo un segundo reto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pues permitiría entender la participación de las PM<sub>10</sub> en la carcinogénesis.

Una de estas vías es la vía de AKT/FoxO3a en la cual la inactivación de FoxO3a vía AKT induce la inhibición del arresto del ciclo celular, de la apoptosis y de la respuesta antioxidante cuando el factor de transcripción FoxO3a es inactivado por la proteína AKT.

La activación de AKT/FoxO3a en exposiciones a PM<sub>10</sub> no se ha descrito. Sin embargo, hay indicios que esta vía es importante en la respuesta a estímulos ambientales para mantener la homeostasis celular, por lo que consideramos de relevancia determinar la participación de la vía de AKT/FoxO3a en exposiciones a PM<sub>10</sub> bajo un segundo reto (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## **4. HIPÓTESIS**

Las PM<sub>10</sub> inducen la activación de la vía AKT/FoxO3a y esto favorecerá la inhibición de la apoptosis y del arresto del ciclo celular en células de cáncer de pulmón humano.

## **5. OBJETIVO**

Evaluar la vía de AKT/FoxO3a en la inhibición de apoptosis y arresto del ciclo celular en células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>.

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

En células A549 expuestas a PM<sub>10</sub> y posteriormente expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):

1. Evaluar la activación de la proteína AKT mediante la fosforilación de su residuo serina 473.
2. Evaluar la inactivación del factor de transcripción FoxO3a mediante la fosforilación de su residuo serina 253.
3. Para determinar la participación de la vía AKT/FoxO3a en respuesta a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evaluar:
  - 3.1. Los niveles de la enzima catalasa.
  - 3.2. Los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup>.
  - 3.3. Los porcentajes de apoptosis y las fases del ciclo celular.
  - 3.4. Inhibir la vía AKT/FoxO3a para determinar que los efectos observados son mediante esta vía inducidos por la exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Reactivos y anticuerpos**

La línea celular A549 (#CCL-185), derivada de un Adenocarcinoma de pulmón humano, fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). El medio F12 K (#21127-022) y el suero fetal bovino (SFB) (#16 0000) se obtuvieron en Gibco Life Sciences. La placa de cultivo de 6 pozos fue obtenida de Costar (3516). El inhibidor de AKT LY294002 (#9901S), el anti-AKT fosforilado en ser 473 (#4060), anti-AKT (#2920) y anti-p27<sup>kip1</sup> (#3686), anti-FoxO3a (#99199) fueron obtenidos de Cell Signalling Technology. El inhibidor de fosfatasas y proteasas (Halt Protease and Phosphatase Inhibidor Cocktel) y el anti-FoxO3a fosforilado en ser 253 (#PA5-36816) fueron obtenidos de Thermo Scientific, MA, EUA. El anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, Texas, EUA. El kit Annexin-V-Fluos (#11988549001) de ROCHE, Basilea, Suiza.

### **6.2 Obtención de PM<sub>10</sub>**

Las PM<sub>10</sub> utilizadas en este trabajo se recolectaron en una zona urbana residencial de la CDMX, ubicada en el Instituto de Ciencias de la Atmósfera de Ciudad Universitaria, UNAM en el año 2007. Se empleó un colector de partículas de grandes volúmenes con un flujo de 1.13 m<sup>3</sup>/min (GMW modelo 1200 VFCHVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA), equipados con filtros de celulosa (Sartorius AG, Goettingen, Germany). Después de ser recolectadas, los filtros de nitrocelulosa se mantuvieron en un desecador a 4°C en oscuridad y las partículas fueron recuperadas de las membranas y se almacenaron en frascos de vidrio estériles y libres de endotoxina. Las PM<sub>10</sub> se mantuvieron a 4°C en un desecador y oscuridad hasta su uso.

### **6.3 Cultivo celular de A549**

Las células A549 se utilizaron en pases temprano y se cultivaron de acuerdo a las recomendaciones de la ATCC en medio F12 K suplementadas con 10% de SFB a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la realización de los ensayos, se sembraron 125 000 células en placas de 6 pozos, las células se incubaron por 24 h y se exponen a PM<sub>10</sub> y 24 h posteriores a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se dicta a continuación.

#### **6.4 Exposición a PM<sub>10</sub>**

Las PM<sub>10</sub> fueron pesadas y esterilizadas a 121°C, 15 psi por 15 min. Posteriormente, se resuspendieron en medio suplementado (1 mg/mL) y se mezclaron mediante el uso de vortex hasta su homogenización.

Antes de exponer a las células A59 a PM<sub>10</sub>, se removió el medio de cultivo de las células, se reemplazó por medio fresco y posteriormente, se expuso a PM<sub>10</sub> a una concentración final de 10 µg/cm<sup>2</sup>. A la par se tenían células sin exponer (control) y en seguida, las células se incubaron durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, las células se expusieron al segundo reto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 500 µM, concentración previamente estandarizada en el laboratorio (Chirino et al., 2010) y que ha sido reportada por otros grupos de trabajo (Ferecatu et al., 2010a) y se incubaron durante 24 h. Como control, las células se expusieron a la misma concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h y 24 h después, se volvieron a exponer a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **6.5 Tratamiento con el inhibidor LY294002**

Para determinar la participación de la vía AKT/FoxO3a en los procesos evaluados en el presente trabajo, se utilizó un inhibidor reversible de AKT, LY294002, a una concentración final de 50 µM, el cual se estandarizó para inhibir la fosforilación de AKT. El inhibidor LY294002, es un tipo morfolino que se une competitiva y reversiblemente a la subunidad catalítica de PI3K (P110) proteína que se encuentra río arriba de la proteína AKT en la cascada de señalización, y que se encarga de inducir la activación de la proteína AKT río abajo (Manning and Toker, 2017). Para llevar a cabo la inhibición de AKT, 24 h después de que las células se expusieron a PM<sub>10</sub> y 1 h antes de ser tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las células A549 se incubaron con el inhibidor LY294002. Después de haber tratado a las células con el inhibidor, se retiró el medio de cultivo y se cambió por medio fresco y entonces las células se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h.



## 6.6 Extracción de proteína

Después de los tratamientos, las células se lavaron tres veces con el bufer salino de fosfatos (PBS 1X), pH 7.4 y se realizó la extracción de proteína para lo cual se empleó un amortiguador de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM y NP-40 al 1%) al cual se le añadió un inhibidor de fosfatasas y proteasas. Los lisados celulares obtenidos fueron centrifugados a 13000 rpm durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se realizaron alícuotas de las proteínas las cuáles fueron almacenadas a -20 hasta su uso.

## 6.7 Cuantificación de proteína

Las proteínas obtenidas se cuantificaron empleando el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985). En una placa de 96 pozos, se cargó primero la curva de albúmina sérica bovina (BSA) de la siguiente manera:

A1 10  $\mu$ L del blanco (Tris 10 mM).

B1, B2, B3 agregar 10  $\mu$ L de BSA 1.25  $\mu$ g/ $\mu$ L (por triplicado).

C1, C2, C3 agregar 10  $\mu$ L de BSA 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ L (por triplicado).

D1, D2, D3 agregar 10  $\mu$ L de BSA 5  $\mu$ g/ $\mu$ L (por triplicado).

E1, E2, E3 agregar 10  $\mu$ L de BSA 10  $\mu$ g/ $\mu$ L (por triplicado).

En seguida, se cargaron las muestras como sigue: 1  $\mu$ L de la muestra de proteína más 9  $\mu$ L de Tris-HCl 10 mM pH 7.4, a cada una de las muestras se les añadieron 200  $\mu$ L de la solución de trabajo (ácido bicinconínico más CuSO<sub>2</sub>), preparado según las instrucciones del fabricante. La placa se calentó a 90° C durante 10 min y se leyó a 570 nm.

## 6.8 Western Blot de las células A549 tratadas con PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para determinar los niveles de proteína de AKT fosforilada en su residuo ser 473 (AKT<sup>S473</sup>), el factor de transcripción FoxO3a fosforilado en ser 253 (FoxO3a<sup>S253</sup>), catalasa y p27<sup>kip1</sup>, se realizaron ensayos de western blot. Para ello, se cargaron 30  $\mu$ g de proteína en un gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) empleando una cámara semi-seca o transblot. y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes. Los anticuerpos primarios se prepararon en leche svelty al 5% en un búfer salino de

tris con tween (TBS-T) al 0.2%, como se indica a continuación: anti-GAPDH 1:1000, anti-AKT<sup>S473</sup> 1:2000, anti-AKT, 1:2000, anti-FoxO3a<sup>S253</sup> 1:1000, anti-FoxO3a y anti-p27<sup>kip1</sup> 1:1000. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0.2% y se incubaron con los anticuerpos secundarios de ratón o conejo según correspondiera, acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el reactivo quimioluminiscente (Chemo Luminiscent).

## 6.9 Evaluación de ciclo celular

Las células A549 a una confluencia de 60% se trataron con PM<sub>10</sub> (10µg/cm<sup>2</sup>), 24 h después se cambió el medio por medio fresco y se trataron con el segundo reto (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con y sin inhibidor y se incubaron por 24 h. Después de los tratamientos, las células se despegaron con un búfer salino de fosfatos más ácido etilendiaminotetraacético (PBS-EDTA) 1 mM, se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en etanol al 70%, al menos, 18 horas antes de su lectura. Posteriormente, las células A549 se fijaron en etanol, se lavaron dos veces con PBS 1X y se centrifugaron a 1 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se agitó manualmente el botón celular. Para el proceso de tinción se emplearon las siguientes soluciones:

- 1) Solución concentrada de citrato de trisodio. 2H<sub>2</sub>O 3.4 mM, nonidet-P40 al 0.1%, tetrahidrochloride de espermina 1.5 mM, Tris 0.5 mM pH 7.6.
- 2) Solución A: solución concentrada de tripsina 30 µg/mL.
- 3) Solución B: solución concentrada de Inhibidor de tripsina 55 µg/mL y ribonucleasa (RNasa) 0.1 mg/mL.
- 4) Solución C: solución concentrada de ioduro de propidio (IP) 150 µg/mL, tetrahidrochloride de espermina 1.5 mM.

Se adicionaron 100 µL de la solución A [tripsina 30 mg/mL] y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente, agitando suavemente, pero sin usar el vortex. Enseguida, sin retirar la solución A, se adicionaron 100 µL de la solución B [Inhibidor de tripsina (55 µg/mL) y RNasa (0.1 mg/mL)], se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se agitaron suavemente, pero sin usar el vortex. Sin retirar las soluciones A y B, se adicionaron 80 µL de IP (150 µg/mL), se incubaron por 15 min en hielo y protegidas de la luz. Las lecturas se realizaron en el citómetro de Flujo FACSCanto

II de Becton Dickinson con el software FACSDiva v.1.1, lo más pronto posible y a más tardar 2 h después de la tinción con IP. Posteriormente, se analizaron los datos en el software ModFITT LT v.2.0 de Becton Dickinson.

### **6.10 Determinación de apoptosis**

Las células A549 a una confluencia del 60% se trataron con PM<sub>10</sub> (10 µg/cm<sup>2</sup>), 24 h después se cambió el medio por medio fresco y se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con y sin inhibidor y se incubaron por 24 h. El ensayo de apoptosis se realizó siguiendo el siguiente protocolo, el cuál se realizó en base a la hoja de datos incluida en el estuche Annexin-V-Fluos:

A cada una de las muestras se le adicionó 1 mL de PBS-EDTA 1mM para ser despegadas, posteriormente se les añade 1 mL más de PBS 1X (pH 7.4) y se someten a centrifugación a 160 g durante 5 min. Se realizaron 2 lavados más con PBS 1X y se centrifugaron a 160 g durante 5 min, descartando el sobrenadante. Se preparó la mezcla de Annexin-V-Fluos, dependiendo de la cantidad de muestras a procesar, por ejemplo, para 10 muestras pre-diuyen 20 µL del reactivo Annexin-V-Fluos en 1 mL del bufer de incubación (BI) y se añade 20 µL de la solución de IP. Para la compensación de los fluorocromos para IP (rojo) y Annexin-v-Fluos (verde) en el citómetro de flujo es necesario tener por separado 3 tubos con las siguientes características:

- a) Tubo con únicamente células (auto fluorescencia) + 500 µL de BI.
- b) Tubo con células + Annexin-V-Fluos (2 µL en 100 µL de BI) + 500 µL de BI.
- c) Tubo con células + IP (2 µL en 100 µL de BI) + 500 µL de BI.

A cada una de las muestras a procesar, se le añadieron 100 µL de la mezcla preparada, se incubó durante 10-15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se añadieron 500 µL de BI por cada 10<sup>6</sup> células y se leyeron en el citómetro de Flujo FACS Canto II de Becton Dickinson con el software FACSDiva v.1.1 lo más pronto posible, no deben pasar más de 30 min, después de la incubación.

### **6.11 Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos representan las medias  $\pm$  la desviación estándar ( $\pm$ DE) de 3 experimentos independientes. Se aplicó el análisis estadístico de varianza con la prueba de comparaciones múltiples con el Programa Prisma versión 5 (GraphPad Software, Inc). Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

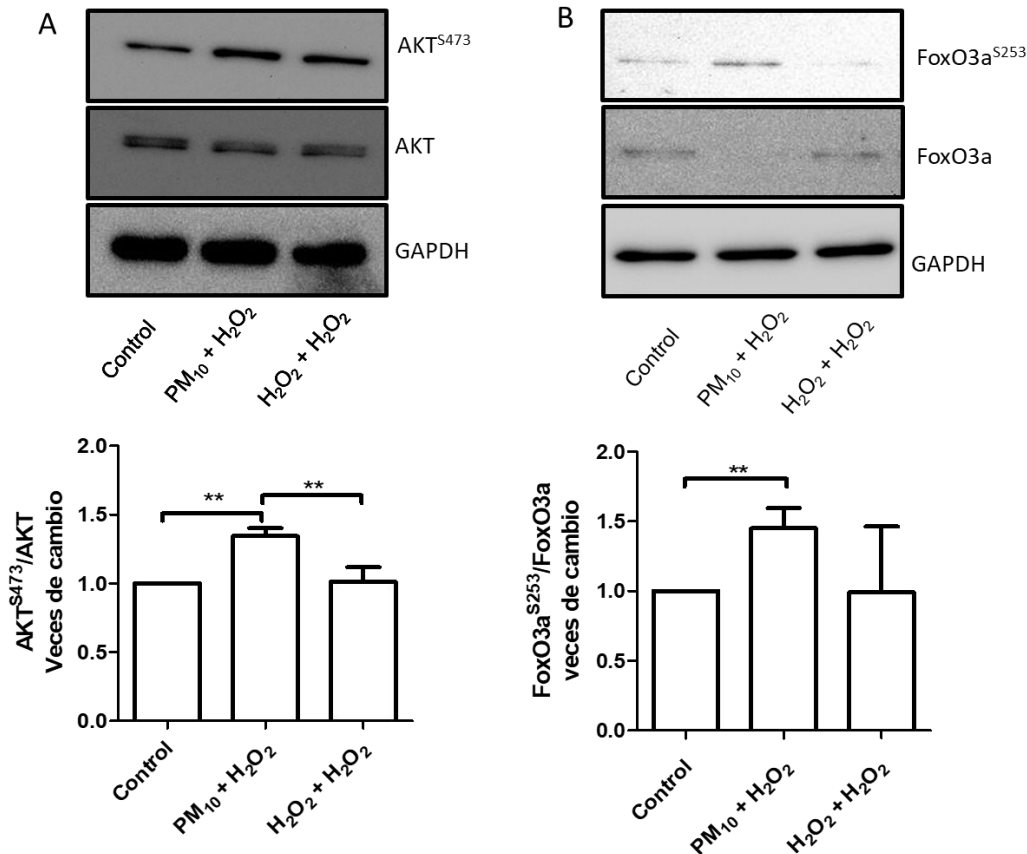
## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Las $PM_{10}+H_2O_2$ inducen la fosforilación de $AKT^{S473}$ y $FoxO3a^{S253}$**

Para determinar el efecto de las  $PM_{10}$  sobre la fosforilación de  $AKT^{Ser473}$  y de  $FoxO3a^{S253}$  en células, expuestas a  $PM_{10}$  ( $10 \mu g/cm^2$ ) durante 24 h y posteriormente

a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se evaluaron los niveles de ambas proteínas mediante western blot. Los resultados indican que hubo un incremento significativo de AKT<sup>S473</sup> en las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 34% con respecto a las células control (p<0.005). Las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no muestran cambios significativos en la fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup> (Figura 6A).

Posteriormente, se determinaron los niveles de FoxO3a<sup>S253</sup> y éstos aumentan significativamente 77% en las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a las células control (Figura 6B). En las células H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se detectaron cambios significativos (Figura 6B).



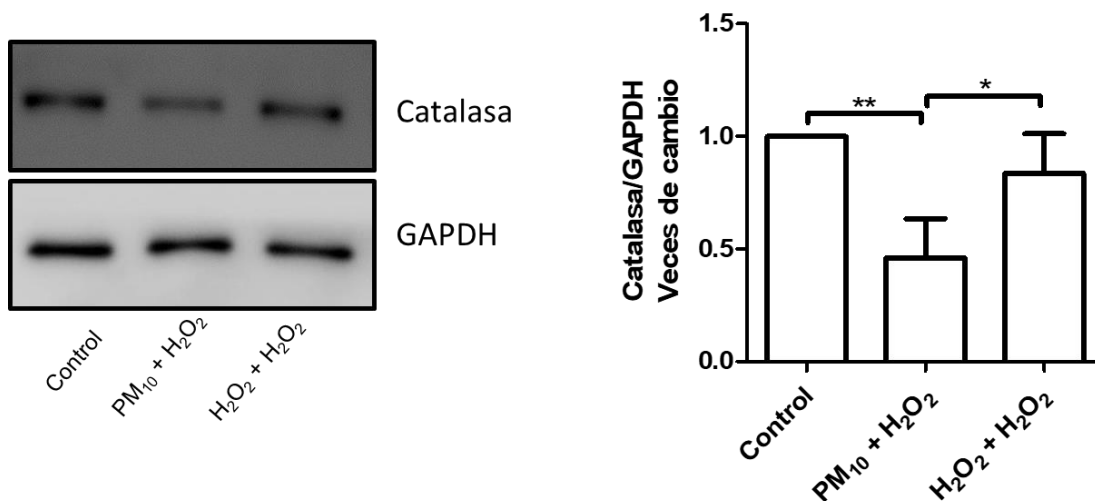
**Figura 6. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen la fosforilación de AKT<sup>S473</sup> y de FoxO3a<sup>S253</sup>.** Las células A549 fueron expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µm (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron utilizadas como un control del efecto de las PM<sub>10</sub>. Se evaluaron los niveles de (A) Proteína cinasa B fosforilada en serina 473 (AKT<sup>S473</sup>) en los cuales hubo un incremento en las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al

control, y (B) Niveles del factor de transcripción Forkhead box O3 fosforilado en serina 253 (FoxO3a<sup>S253</sup>), en los que se aprecia un incremento en las células expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al control. Las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no presentaron cambios con respecto al control para ambas proteínas. Western blot representativos utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los datos se expresan como la media ± DE \*\*p < 0.005, n=3.

## 7.2 Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyen los niveles de proteína de catalasa

El factor de transcripción FoxO3a se encarga de regular las enzimas de respuesta a estrés oxidante como catalasa, una enzima antioxidante que se encarga de la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y se evaluó si la fosforilación de FoxO3a<sup>S253</sup> tenía impacto sobre esta enzima.

Se determinó que los niveles de proteína de catalasa disminuyen 46% posterior a la exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.005) con respecto a las células control. Las células A549 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no mostraron cambios estadísticamente significativos con respecto al control, pero si un incremento significativo de 27% con respecto a las células tratadas con PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p ≤ 0.05) (Figura 7).

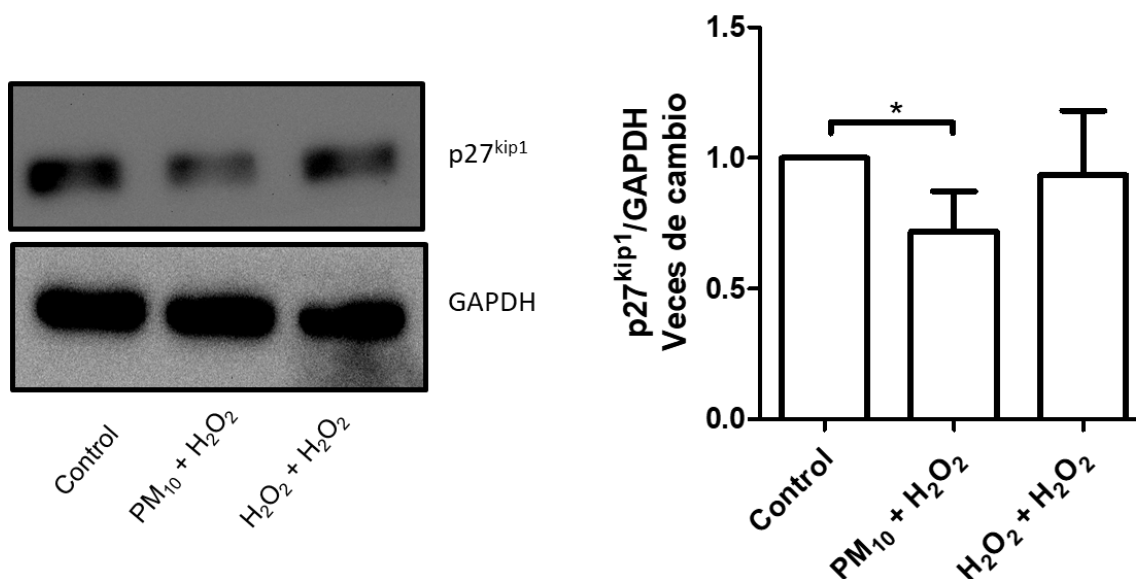


**Figura 7. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyen los niveles de catalasa.** Se evaluaron los niveles de catalasa en las células A549 expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µM (PM<sub>10</sub>) por 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h (PM<sub>10</sub>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se determinó que los niveles de esta enzima disminuyen significativamente con respecto al control. Las células A549 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no muestran cambios significativos con respecto al control. Western blot representativo utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los datos están expresados como la media ± DE de tres experimentos realizados de manera independiente, \*\* p (< 0.005), \* p (< 0.05), n=3.

### 7.3 Las $PM_{10}+H_2O_2$ disminuyen los niveles de $p27^{kip1}$

Una de las proteínas importantes en la transición de la fase G1/S del ciclo celular es  $p27^{kip1}$ , la cual es blanco transcripcional de FoxO3a y para determinar el impacto del incremento de FoxO3a<sup>S253</sup> en esta proteína, se evaluaron sus niveles por western blot.

Se observó que los niveles de  $p27^{kip1}$  disminuyen 29% cuando las células son expuestas a  $PM_{10}+H_2O_2$  ( $p < 0.05$ ), no así para las células expuestas solo a  $H_2O_2+H_2O_2$  (Figura 8).

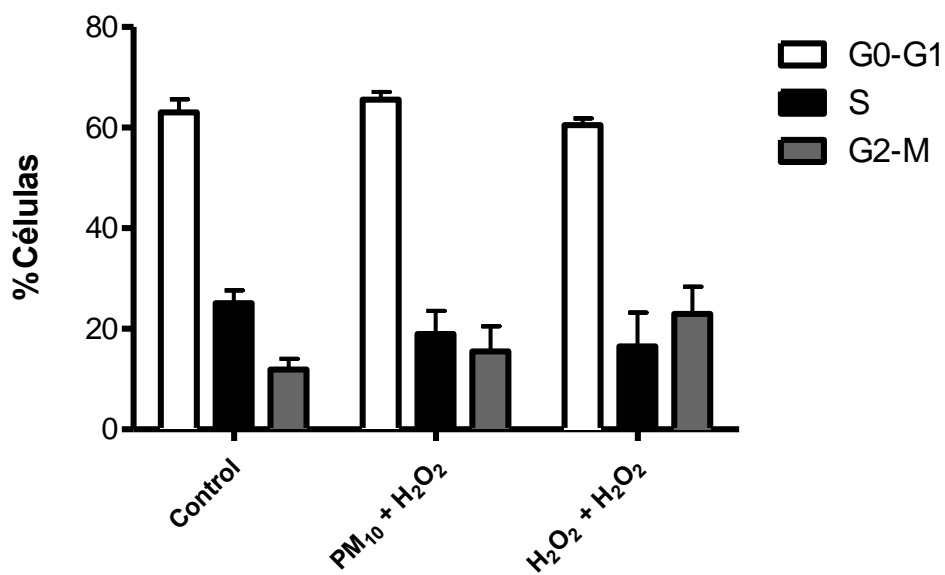


**Figura 8. Las  $PM_{10}+H_2O_2$  disminuyen los niveles de  $p27^{kip1}$ .** Las células A549 se expusieron a  $10 \mu g/cm^2$  de material particulado  $\leq$  a  $10 \mu m$  ( $PM_{10}$ ) durante 24 h y 24h después con  $H_2O_2$  ( $PM_{10}+H_2O_2$ ) y se determinaron los niveles del inhibidor 1B de ciclina dependiente de ciclina ( $p27^{kip1}$ ) y se observó una disminución significativa en las células  $PM_{10}+H_2O_2$  con respecto al control. Western blot representativo utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga de tres ensayos realizados de manera independiente. Los resultados están presentados como la media  $\pm$  DE \* $p < 0.05$ ,  $n=3$ .

### 7.4 Las $PM_{10}+H_2O_2$ no inducen cambios en el ciclo celular

Debido a que  $p27^{kip1}$  es una proteína que arresta el ciclo celular en la fase G1/S, se evaluó el ciclo celular y se determinó que la exposición de las células A549  $PM_{10}+H_2O_2$  no tiene efecto sobre el ciclo celular (Figura 9).



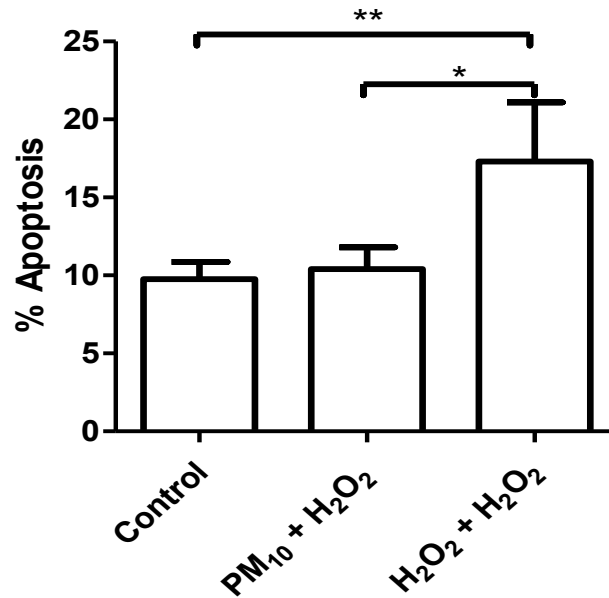


**Figura 9. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no inducen cambios en las fases del ciclo celular.** Las células A549 se expusieron a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤ a 10 µm (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se analizó el ciclo celular empleando Ioduro de propidio (IP). No se observaron cambios con respecto al control en ninguno de los tratamientos. Los valores representan ± DE de tres experimentos independientes, n=3.

Previamente se había reportado que la exposición solo a PM<sub>10</sub> no tiene efecto sobre el ciclo celular pero sí sobre algunas de las proteínas que inhiben a los complejos cdk/ciclina, como p21<sup>cip1/waf1</sup> y p16<sup>INK4</sup>. La proteína p21<sup>cip1/waf1</sup> también regula la transición de G0/G1, por lo que la primera exposición a PM<sub>10</sub> podría tener efecto sobre ésta y el segundo evento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuir a p27<sup>kip1</sup>, lo que posiblemente el ciclo celular continúa.

### 7.5 Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no inducen apoptosis

Para determinar si en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se inducía apoptosis, se empleó el estuche V-Annexin Fluos como se describió previamente. Se observó que posterior a la exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se observan cambios en los porcentajes de apoptosis con respecto a las células control (Figura 10). Las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen 17.3% de apoptosis, 7.53% más comparadas con el control (Figura 10).

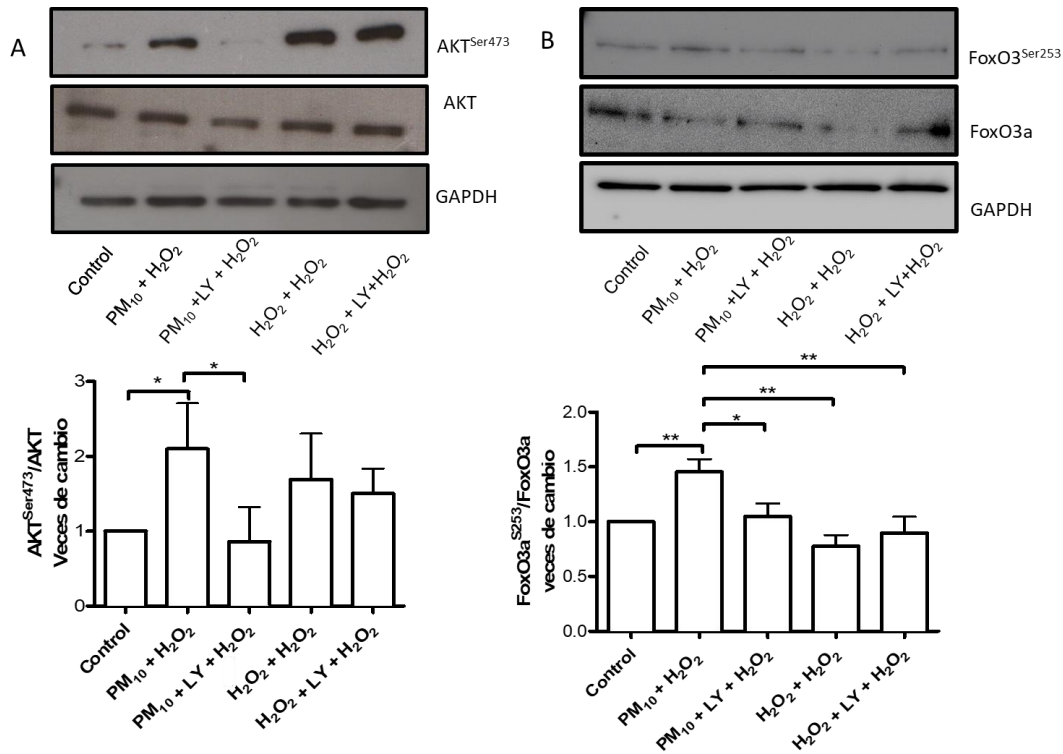


**Figura 10. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no inducen apoptosis.** Las células A549 se expusieron a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µM (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se determinaron los porcentajes de apoptosis empleando el estuche Annexin V-Fluos con annexina V y ioduro de propidio (IP). Se determinó que la exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no incrementan los porcentajes de apoptosis con respecto al control. En las células A549 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hay un 7.53% de incremento de apoptosis con respecto al control (p<0.05). Los resultados están expresados como la media ± DE de tres experimentos realizados de manera independiente, n=3.

### 7.6 Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen la fosforilación de FoxO3a<sup>S253</sup> a través de AKT<sup>S473</sup>

Se evaluaron los niveles de la proteína AKT<sup>S473</sup> en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub> por 24 h y a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h fueron tratadas con 50 µM del inhibidor LY294002 1 h antes de ser expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A la par, se tuvieron células tratadas sin el inhibidor (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se determinó que en las células PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los niveles de la proteína AKT<sup>S473</sup> disminuye 66% con respecto a las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11A). En las células A549 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h, tratadas con el inhibidor y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+LY+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), no hubo cambios significativos respecto a las células H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Se evaluaron los niveles de FoxO3a<sup>S253</sup> y se determinó que cuando las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> éstos disminuyen 40% con respecto a las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11B), previniéndose la fosforilación significativamente (p <0.05).

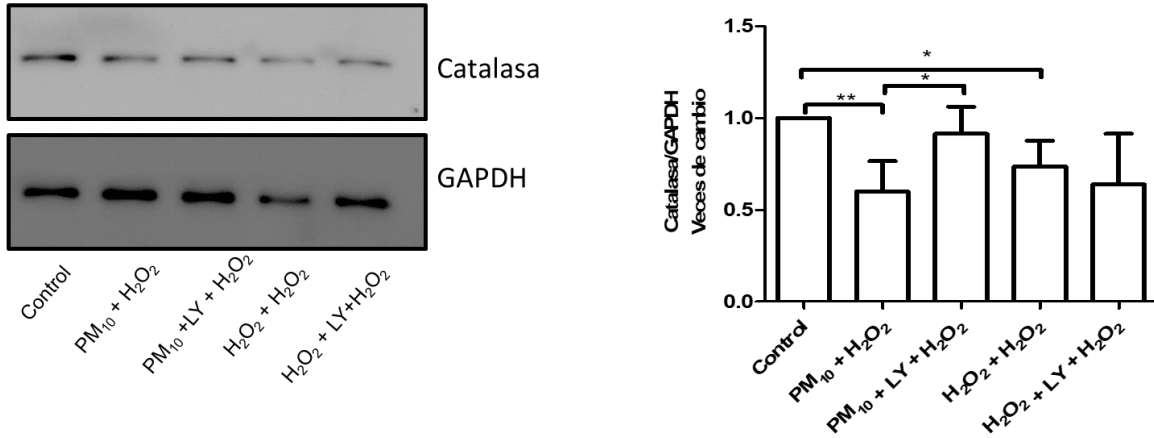


**Figura 11. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen la fosforilación de FoxO3a<sup>S253</sup> a través de AKT<sup>S473</sup>.** En las células A549 expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤ 10 µm (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h tratadas con el inhibidor (50 µM) de LY294002 1 h antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se evaluaron (a) los niveles de la proteína cinasa B fosforilada en serina 473 (AKT<sup>S473</sup>) y (b) Niveles del factor de transcripción fosforilado en serina 253 (FoxO3a<sup>S253</sup>) en los cuales se observa un incremento en la fosforilación para ambas proteínas y su prevención con el uso del inhibidor (LY294002). Western blot representativos utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los resultados están expresados como la media ± DE de tres experimentos realizados de manera independiente \*\*p≤0.005!; \*p ≤0.05, n=3.

### **7.7 Las $PM_{10}+H_2O_2$ disminuyen los niveles de catalasa mediante la vía de AKT/FoxO3a**

Para determinar si la disminución en los niveles de catalasa era dependiente de la vía AKT/FoxO3a, se evaluaron los niveles de la enzima en las células tratadas con y sin el inhibidor y se encontró que en las células A549 expuestas a  $PM_{10}+LY+H_2O_2$  se previene 25% la disminución de la catalasa con respecto a las células  $PM_{10}+H_2O_2$  (Figura 12).

Esto nos sugiere fuertemente que FoxO3a está regulando transcripcionalmente a la catalasa en las células expuestas a  $PM_{10}$ . En las células A549 expuestas a  $H_2O_2+LY+H_2O_2$  no se encontraron diferencias significativas con respecto a las células  $H_2O_2+ H_2O_2$ .

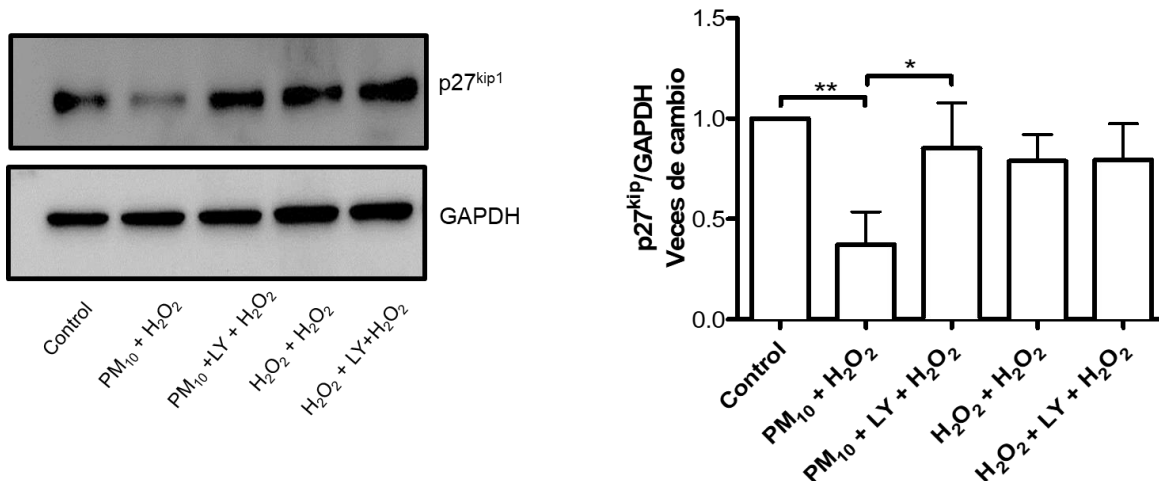


**Figura 12. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyen los niveles de la enzima catalasa vía AKT/FoxO3a.** En las células A549 expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µM (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h tratadas con 50 µM del inhibidor LY294002 1 h antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se evaluaron los niveles de catalasa. Se determinó que en las células PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se previene la disminución de los niveles de catalasa con respecto a las células que no tienen inhibidor (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Western blot representativo utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los resultados están expresados como la media ± DE de tres experimentos realizados independientemente \*\* p < 0.005 \* p < 0.05, n=3.

### 7.8. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyen los niveles de p27<sup>kip1</sup> a través de la vía AKT/FoxO3a

Los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup> pueden ser regulados transcripcionalmente por el factor de transcripción FoxO3a y en el presente trabajo evaluamos si la disminución de los niveles de esta proteína estaba asociada a la vía AKT/FOXO3a.

Los resultados señalan que en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se previene 45% la disminución de los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup> comparado contra las células que no tienen el inhibidor (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figura 13).

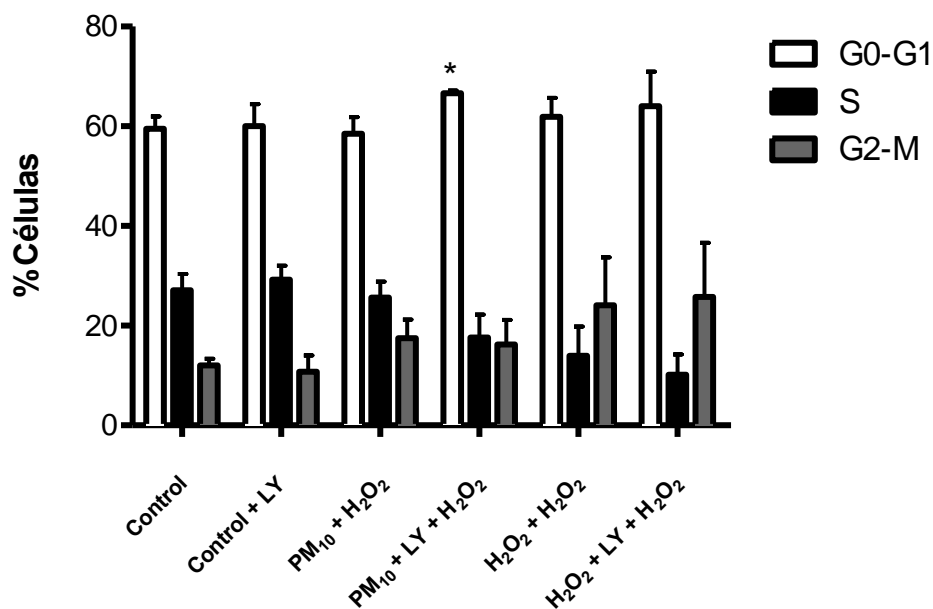


**Figura 13. Las PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyen los niveles de p27<sup>kip1</sup> a través de la vía AKT/FoxO3a.** En las células A549 expuestas a 10µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µM (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h tratadas con 50 µM del inhibidor de la proteína cinasa B (AKT) LY294002 1 h antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se evaluaron los niveles de proteína del inhibidor 1B cinasa dependiente de ciclina (p27<sup>kip1</sup>). Se determinó que en las células tratadas con el inhibidor se previene la disminución de los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup> con respecto a las células que no tienen inhibidor (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Western blot representativo utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los resultados están expresados como la media SD± de tres experimentos realizados independientemente. \*\* p<0.05; \*p<0.05, n=3.

### 7.9. La vía de AKT/FoxO3a inhibe la detención del ciclo celular en células expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Con el objetivo de determinar si cuando se previene la disminución de p27<sup>kip1</sup> había un impacto en la detención del ciclo celular, se evaluó ciclo celular en las células A549 expuestas a.

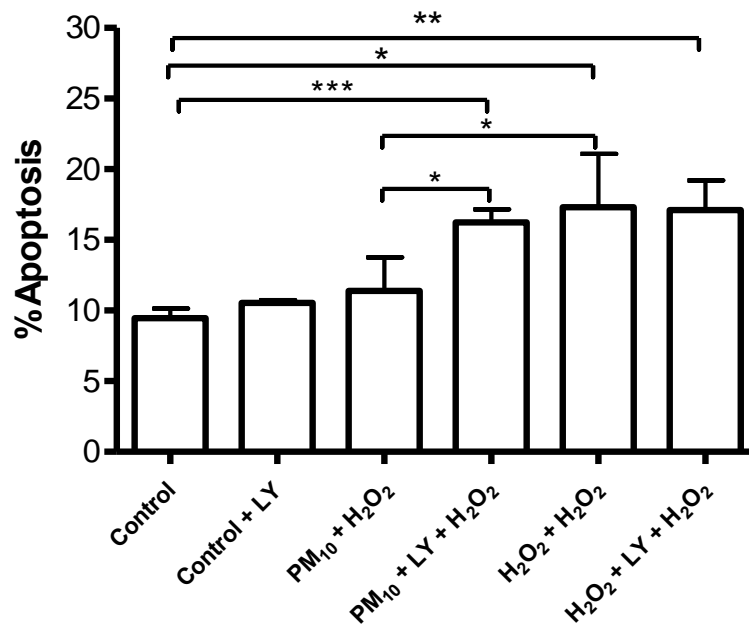
Los resultados muestran que en las células A549 tratadas con PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta 8.43% la fase G0-G1 con respecto a las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.05), no así para las células que fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con y sin inhibidor (Figura 14).



**Figura 14. La vía de AKT/FoxO3a inhibe la detención del ciclo celular en células expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Las células A549 fueron expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µM (PM<sub>10</sub>) por 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h tratadas con 50 µM del inhibidor LY294002 1 h antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se evaluaron las fases del ciclo celular: intervalo 0 (G0), intervalo 1 (G1), fase de síntesis (S), fase de mitosis (M) empleando yoduro de propidio (IP). Los porcentajes de la gráfica están presentados como la media (±SD) de tres ensayos realizados independientemente. \* p<0.05, n=3.

### 7.10 La vía de AKT/FoxO3a previene la apoptosis inducida por la exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Con la finalidad de determinar si la vía de AKT/FoxO3a inhibe la apoptosis en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se evaluaron los porcentajes de apoptosis y se determinó que en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los porcentajes de apoptosis se incrementaban un 5.17% con respecto a las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.05). No se detectaron cambios estadísticamente significativos en las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparadas con las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 15).



**Figura 15. La vía AKT/FoxO3a inhibe la apoptosis inducida por PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de AKT/FoxO3a.** Las células A549 fueron expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de material particulado ≤10 µM (PM<sub>10</sub>) durante 24 h y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h tratadas con 50 µM del inhibidor LY294002 1 h antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y se evaluaron los porcentajes de apoptosis empleando Annexina V y ioduro de propidio (IP). Se detectó un incremento significativo en los porcentajes de la fase intervalo 0 intervalo 1 (G0-G1) en las células PM<sub>10</sub>+LY+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los porcentajes están representados como la media ±DE de tres ensayos realizados independientemente, n=3. \* (p<0.05).



## 8. DISCUSIÓN

Las PM<sub>10</sub> fueron clasificadas por la IARC como un carcinógeno para los humanos (Loomis et al., 2013) y son consideradas un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón (Chen et al., 2016). Si bien, se conocen algunos mecanismos a través de los cuales las PM<sub>10</sub> inducen daño, aún falta mucho por explorar, en trabajos realizados *in vitro* se ha sugerido que el empleo de diferentes concentraciones de PM<sub>10</sub> (desde 10 a 160 µg/cm<sup>2</sup>) no tiene impacto sobre la viabilidad celular (Alfaro-Moreno et al., 2002; Quezada-Maldonado et al., 2018), pero sí inducen estrés oxidante y daño al DNA (Chirino et al., 2010; C.-W. Liu et al., 2018; Soberanes et al., 2006).

Para la realización del presente estudio, se utilizó la línea celular A549 derivada de un adenocarcinoma de pulmón humano, la cual se reconoce como un modelo celular alveolar adecuado para la realización de estudios toxicológicos, ya que comparte características genéticas similares a una estirpe celular normal, por ejemplo, no tiene mutado a p53 (Calcabrini et al., 2004). Además, los efectos observados por la exposición a PM<sub>10</sub>, son reproducibles en líneas celulares no derivadas de un cáncer, como BEAS-2B. Sin embargo, es importante mencionar que tiene una mutación en el gen de KRAS (Blanco et al., 2009).

En estudios previos se demostró que cuando se expone a las células A549 tratadas con PM<sub>10</sub> a un segundo estímulo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500µM), la viabilidad celular no cambia a pesar de que el sistema antioxidante se encuentra disminuido (Chirino et al., 2010), lo que sugiere la activación de vías de supervivencia a pesar del daño citotóxico y genotóxico propiciado por las PM<sub>10</sub>. En este estudio, tomamos como modelo el uso de un segundo estímulo después del tratamiento con PM<sub>10</sub> a una concentración subletal de 10µg/cm<sup>2</sup>, concentración que mimetiza la exposición de una persona durante cinco días (Li et al., 2003) y observamos la inactivación del factor de transcripción FoxO3a a través de AKT y que esto tiene impacto en los niveles de proteína de la enzima catalasa, en ciclo celular y en apoptosis. Previamente, se ha descrito que la inactivación de FoxO3a está relacionado con procesos

carcinogénicos y con la resistencia a apoptosis durante tratamientos antineoplásicos como cisplatino en líneas celulares de cáncer de pulmón (Liu et al, 2014).

La proteína AKT inactiva a FoxO3a mediante fosforilaciones (Brunet et al., 1999) y determinamos que los niveles de AKT<sup>S473</sup> y de FoxO3a<sup>S253</sup> aumentaban posterior a la exposición a PM<sub>10</sub> más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que este evento tiene impacto sobre los niveles de p27<sup>kip1</sup> y la enzima antioxidante catalasa, proteínas reguladas por FoxO3a a nivel transcripcional. Evidenciamos también, que dichos eventos están relacionados con los bajos niveles de apoptosis observados y previamente informados por otros grupos de trabajo en células expuestas a PM<sub>10</sub> (Ferecatu et al., 2010b; Reyes-Zárate et al., 2016b), debido a que cuando se inhibe la vía de AKT/FoxO3a, aumentan los porcentajes de apoptosis, lo que sugiere la participación de ésta vía en procesos carcinogénicos inducidos por las PM<sub>10</sub>.

En las células constantemente se están produciendo ERO, ya sea a través de fuentes endógenas, como la generación del radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> dentro de la mitocondria como subproducto de la fosforilación oxidativa que por dismutación genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen et al., 2003), o por vías exógenas, como las que genera la exposición a contaminantes como las PM<sub>10</sub> (Ferecatu et al., 2010b). Además, en personas con enfermedades preexistentes como EPOC, se ha descrito que se producen elevadas cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a individuos sanos (Cook-Mills, 2006; Dekhuijzen et al., 1996), y en este sentido se ha encontrado que la exposición a PM exacerba la respuesta a enfermedades pulmonares mediante diferentes mecanismos (Veres, 2018). Por otro lado, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se produce durante los eventos inflamatorios que desencadena la exposición a PM<sub>10</sub> y es importante durante la migración de células endoteliales como molécula de señalización (Cook et al, 2009; Wang et al, 2017).

En el presente trabajo, demostramos que la exposición a PM<sub>10</sub> más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activan a la proteína AKT e inducen la inactivación de FoxO3a, evento que se previene cuando se utiliza un inhibidor de AKT, lo que impide que las células, a pesar del daño a macromoléculas como previamente se describió, sufran un proceso de detención del ciclo celular y apoptosis. Esta vía es de sumo interés ya que tiene un

papel dual: por un lado, cuando FoxO3a se encuentra en núcleo, favorece la transcripción de genes relacionados a detención del ciclo celular como p27<sup>kip1</sup>, y de respuesta a estrés oxidante como es la activación de la enzima de catalasa y participa en la inducción de apoptosis (Bencivenga et al., 2017; Tan et al., 2008; Zhang et al., 2011); por otro lado, cuando FoxO3a es fosforilado en serina 253, esta proteína es exportada a núcleo por las chaperonas 14-3-3 y esto lleva a la inhibición del arresto del ciclo celular, la inhibición de apoptosis y estrés oxidante (Huang and Tindall, 2011). Existen datos que demuestran que las células de un carcinoma hepatocelular humano (HepG2) expuestas a contaminantes como PCB, TCDD y HAPs no se van a apoptosis y se propone a FoxO3a como la vía asociada a este mecanismo (Al-Anati et al., 2014); los reportes sugieren que la fosforilación en el residuo serina 253 evaluado en este trabajo, es llevada por AKT, y ésta modificación es suficiente para inhibir la actividad transcripcional de esta proteína (Greer and Brunet, 2005).

Además, las PM<sub>10</sub> disminuyen la capacidad antioxidante de células A549 expuestas, entre ellas la enzima catalasa (Chirino et al., 2010; Guo et al., 2018), una enzima que se encarga de reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua y oxígeno (Chirino et al., 2010; Guo et al., 2018), sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual las PM<sub>10</sub> lo hacen. En este trabajo, demostramos que los niveles de proteína de esta enzima se encuentran disminuidos cuando las células son expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que esto se previene cuando empleamos el inhibidor de la vía AKT/FoxO3a, lo que sugiere que el factor de transcripción FoxO3a modula los niveles de esta proteína. Otros autores reportan que el factor de transcripción FoxO3a regula a la enzima catalasa mediante la unión en la secuencia “ATAAATA” de su promotor y que, en modelos celulares de cáncer de mama MCF-7, el silenciamiento de FoxO3a disminuye la transcripción de la enzima (Klotz et al., 2015; Tan et al., 2008; Taylor et al., 2015).

Las PM<sub>10</sub> inducen daño celular tanto a nucleótidos mediante la formación de aductos de 8-oxoguanina, así como a proteínas, así como la activación de vías de daño a DNA de doble cadena como la vía de ATM-γH2AX-p53, sin embargo, a pesar del daño inducido por las PM, las células no sufren cambios en el ciclo celular, ni se

observan un incremento en los porcentajes de apoptosis (Sánchez-Pérez et al., 2009), aunque sí induce cambios en las proteínas que modulan los complejos ciclinas/cdk, como p21<sup>cip1/waf1</sup>, cuya estabilización en citoplasma se ha observado en células A549 expuestas a PM<sub>10</sub> de la CDMX. (Sánchez-Pérez et al., 2014), lo que impide la detención del ciclo celular (Longhin et al., 2013). Estos datos sugieren que las PM<sub>10</sub> inducen vías que inhiben la apoptosis, y en el presente estudio, se demostró que las PM<sub>10</sub> más un segundo estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son capaces de disminuir los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup> a través de la vía AKT/FoxO3a ya que FoxO3a modula los niveles de p27<sup>kip1</sup> a nivel transcripcional y este fenómeno es de suma importancia en procesos carcinogénicos (Hnit et al., 2015).

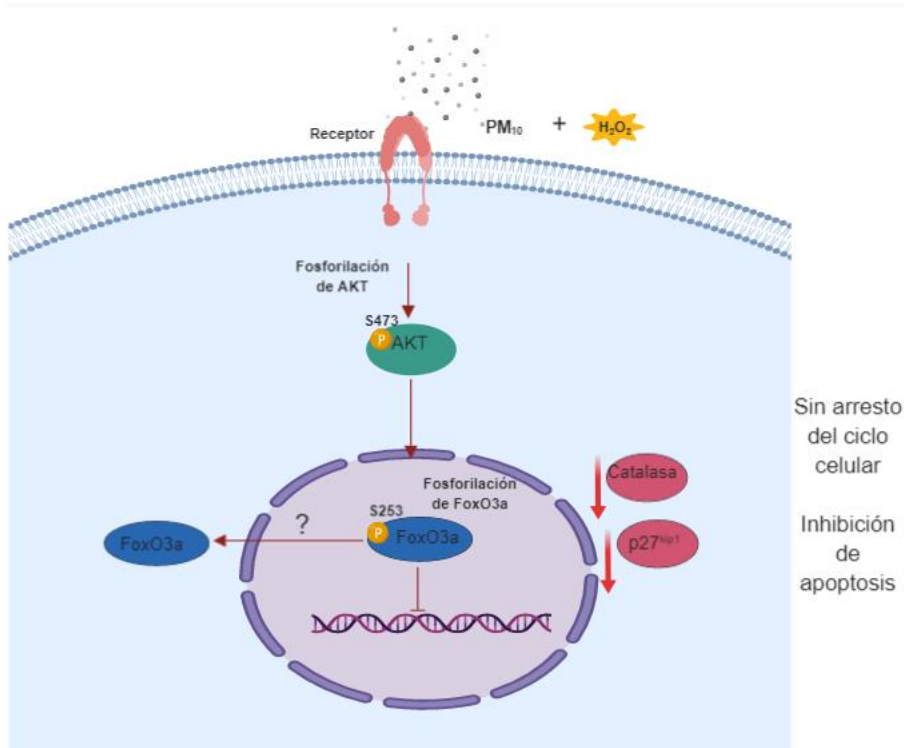
La proteína p27<sup>kip1</sup> se encarga del arresto del ciclo celular en la transición de la fase G1/S uniéndose a los complejos cdk2/ciclina E y cdk2/ciclina D (Bencivenga et al., 2017). Se reportó que posterior a la exposición de un modelo de ratas a TCDD, se induce la activación de p27<sup>kip1</sup> a través de FoxO3a y que esto trae como consecuencia la detención del ciclo celular en G1 (Xu et al., 2014). En el presente estudio, se detectó una disminución en los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup> sin cambios en el ciclo celular; sin embargo, cuando inhibimos a la proteína AKT, se induce arresto del ciclo celular en G0-G1 y se previene la disminución de los niveles de p27<sup>kip1</sup>, lo que sugiere que la inactivación de FoxO3a tiene impacto en ciclo celular. En otro estudio, se describió que los niveles de p27<sup>kip1</sup> pueden también ser regulados mediante el AhR en hepatocitos tratados con TCDD en los cuales p27<sup>kip1</sup> induce arresto del ciclo celular en G1 (Kolluri et al., 1999; Moreno-Marín et al., 2018) y en este trabajo dada la exposición a PM<sub>10</sub> y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no observamos detención del ciclo celular, por lo que la inducción de p27<sup>kip1</sup> por el AhR podría deberse a una activación directa del receptor.

Cabe mencionar que además de p27<sup>kip1</sup>, otras proteínas se encargan de regular la transición de G1/S como p16<sup>INK4</sup>, p21, p107 y p130 (Bertoli et al., 2013). Aunado a esto, se describió que las partículas son capaces de inducir la metilación de p16<sup>INK4</sup> en células de pulmón, lo que sugiere que las PM<sub>10</sub> inducen la inactivación epigenética de proteínas que regulan el ciclo celular (Soberanes et al., 2012).

Se ha asociado la inactivación de FoxO3a con la evasión de apoptosis (Liu et al., 2014) y en el presente trabajo observamos que la exposición a PM<sub>10</sub> y posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no induce apoptosis, sin embargo, cuando se inhibe la vía de AKT/FoxO3a incrementan los porcentajes de apoptosis significativamente. Esto sugiere fuertemente que la exposición a PM<sub>10</sub> desregula la vía y esto se ve reflejado cuando se da un segundo estímulo.

El presente trabajo se describe que la activación de la vía de AKT/FoxO3a por la exposición a PM<sub>10</sub> y que esto tiene efecto en las proteínas que son reguladas por FoxO3a. Se demostró que la exposición a PM<sub>10</sub> induce mecanismos de inhibición del arresto del ciclo celular y de apoptosis, lo cual se ve reflejado sólo cuando se le da un segundo estímulo a las células previamente expuestas a PM<sub>10</sub>, ya que cuando se inhibe la vía, se previenen los efectos: se previene la disminución de los niveles de proteína de la enzima catalasa, hay detención del ciclo celular y apoptosis.

Los resultados de este trabajo podrían explicar alguno de los mecanismos por los cuales las PM<sub>10</sub> inducen procesos carcinogénicos, debido a la activación de una vía asociada a sobrevivencia celular.



**Figura 16. Mecanismo de señalización propuesto para la inhibición de apoptosis y del arresto del ciclo celular en células de cáncer de pulmón humano expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

## 9. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

- La exposición a 10µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> en las células A549 por 24 h y a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h (PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induce la activación de la vía AKT/FoxO3a.
- La exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye los niveles de la enzima antioxidante catalasa.
- En las células expuestas a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se disminuyen los niveles de la proteína p27<sup>kip1</sup>.
- La exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no induce cambios en la regulación del ciclo celular.
- La exposición a PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no induce apoptosis.
- Cuando se emplea el inhibidor de la proteína AKT, se previenen la fosforilación del factor de transcripción FoxO3a<sup>S253</sup>, se previene la disminución de la enzima catalasa y de p27<sup>kip1</sup>.

- Al inhibir la vía de AKT, se induce arresto del ciclo celular e incrementan los porcentajes de apoptosis en las células A549 expuestas a PM<sub>10</sub>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparadas con las células PM<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que no fueron tratadas con el inhibidor.

## **10. CONCLUSIÓN**

Los resultados demuestran que la exposición a 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> activa la vía de señalización AKT/FoxO3a induciendo características de supervivencia a través de la inhibición del arresto del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis, lo cual es demostrado cuando las células son expuestas a un segundo reto (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este es el primer trabajo en el que se reporta la activación de la vía AKT/FoxO3a por exposición a PM<sub>10</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de sus genes blanco.

## **11. PERSPECTIVAS**

- Debido a que las PM<sub>10</sub> activan vías que inhiben el arresto del ciclo celular y la apoptosis, como la vía de AKT/FoxO3a por fosforilaciones, sería interesante investigar la inactivación de fosfatasa, como la PP2A por exposiciones a PM<sub>10</sub>.
- Investigar la participación del estrés oxidante y la generación de radicales libres en la inactivación de factores de transcripción como FoxO3a.
- Caracterizar la unión al DNA de FoxO3a en los genes blanco de las proteínas evaluadas en el presente trabajo.

## 12. LITERATURA CITADA

- Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer* 9, 400–414. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>
- Al-Anati, L., Kadekar, S., Högberg, J., Stenius, U., 2014. PCB153, TCDD and estradiol compromise the benzo[a]pyrene-induced p53-response via FoxO3a. *Chemico-Biological Interactions* 219, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.007>
- Aleem, E., Kiyokawa, H., Kaldis, P., 2005. Cdc2–cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature Cell Biology* 7, 831–836. <https://doi.org/10.1038/ncb1284>
- Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Bonner, J.C., Murray, J.C., Rosas, I., Rosales, S.P. de L., Osornio-Vargas, A.R., 2002. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ. Health Perspect.* 110, 715–720. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110715>
- Anderson, J.O., Thundiyil, J.G., Stolbach, A., 2012. Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. *Journal of Medical Toxicology* 8, 166–175. <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0203-1>
- Anderson, M.J., Viars, C.S., Czekay, S., Cavenee, W.K., Arden, K.C., 1998. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47, 187–199. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5122>
- Arden, K.C., 2006. Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp. Gerontol.* 41, 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.05.015>
- Atkinson, R.W., Fuller, G.W., Anderson, H.R., Harrison, R.M., Armstrong, B., 2010. Urban Ambient Particle Metrics and Health: A Time-series Analysis. *Epidemiology* 21, 501–511.
- Baccini, M., Biggeri, A., Grillo, P., Consonni, D., Bertazzi, P.A., 2011. Health impact assessment of fine particle pollution at the regional level. *American Journal of Epidemiology* 174, 1396–1405. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr256>
- Beaudouin, J., Liesche, C., Aschenbrenner, S., Hörner, M., Eils, R., 2013. Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 20, 599–610. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.156>
- Beaver, L.M., Stemmy, E.J., Constant, S.L., Schwartz, A., Little, L.G., Gigley, J.P., Chun, G., Sugden, K.D., Ceryak, S.M., Patierno, S.R., 2009. Lung injury, inflammation and Akt signaling following inhalation of particulate hexavalent chromium. *Toxicology and Applied Pharmacology* 235, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.018>
- Bencivenga, D., Caldarelli, I., Stampone, E., Mancini, F.P., Balestrieri, M.L., Della Ragione, F., Borriello, A., 2017. p27 Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein. *Cancer Letters* 403, 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.031>



- Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A.M., 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- Blanco, R., Iwakawa, R., Tang, M., Kohno, T., Angulo, B., Pio, R., Montuenga, L.M., Minna, J.D., Yokota, J., Sanchez-Cespedes, M., 2009. A Gene-Alteration Profile of Human Lung Cancer Cell Lines. *Hum Mutat* 30, 1199–1206. <https://doi.org/10.1002/humu.21028>
- Bonetta, Sa., Gianotti, V., Bonetta, Si., Gosetti, F., Oddone, M., Gennaro, M.C., Carraro, E., 2009. DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM2.5 from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 77, 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.076>
- Borja-Aburto, V.H., Castillejos, M., Gold, D.R., Bierzwinski, S., Loomis, D., 1998. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ. Health Perspect.* 106, 849–855. <https://doi.org/10.1289/ehp.106-1533229>
- Botelho, F.M., Bauer, C.M.T., Finch, D., Nikota, J.K., Zavitz, C.C.J., Kelly, A., Lambert, K.N., Piper, S., Foster, M.L., Goldring, J.J.P., Wedzicha, J.A., Bassett, J., Bramson, J., Iwakura, Y., Sleeman, M., Kolbeck, R., Coyle, A.J., Humbles, A.A., Stämpfli, M.R., 2011. IL-1 $\alpha$ /IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PLoS ONE* 6, e28457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028457>
- Brauer, M., Avila-Casado, C., Fortoul, T.I., Vedal, S., Stevens, B., Churg, A., 2001. Air pollution and retained particles in the lung. *Environmental Health Perspectives* 109, 1039–1043. <https://doi.org/10.1289/ehp.011091039>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* 96, 857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M., Falzano, L., Colone, M., De Berardis, B., Paoletti, L., Arancia, G., Fiorentini, C., 2004. Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ. Res.* 95, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.011>
- Calnan, D.R., Brunet, A., 2008. The FoxO code. *Oncogene* 27, 2276–2288. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.21>
- Chang, C.-C., Chiu, H.-F., Yang, C.-Y., 2015. Fine particulate air pollution and outpatient department visits for headache in Taipei, Taiwan. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 78, 506–515. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1010465>
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36027–36031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>
- 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., Chen, K.-X., Liu, Y.-M., Chen, J., Zhao, B.-X., Jiang, G.-H., Gu, Q., Bai, Z.-P., Dong, G.-H., Tang, N.-J., 2016. Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: A

- 12-year cohort study in Northern China. *Sci. Total Environ.* 571, 855–861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.064>
- Chirino, Y.I., García-Cuellar, C.M., García-García, C., Soto-Reyes, E., Osornio-Vargas, Á.R., Herrera, L.A., López-Saavedra, A., Miranda, J., Quintana-Belmares, R., Pérez, I.R., Sánchez-Pérez, Y., 2017. Airborne particulate matter *in vitro* exposure induces cytoskeleton remodeling through activation of the ROCK-MYPT1-MLC pathway in A549 epithelial lung cells. *Toxicology Letters* 272, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.002>
- Chirino, Y.I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á.R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Segura-García, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., García-Cuellar, C.M., 2010. PM10 impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters* 193, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.01.009>
- Chirino, Y.I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á.R., Rosas, I., García-Cuellar, C.M., 2015. Sampling and composition of airborne particulate matter (PM10) from two locations of Mexico City. *Data in brief* 4, 353–6. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.06.017>
- Cimino, F., Speciale, A., Siracusa, L., Naccari, C., Saija, A., Mancari, F., Raciti, R., Cristani, M., Trombetta, D., 2014. Cytotoxic effects induced *in vitro* by organic extracts from urban air particulate matter in human leukocytes. *Drug and Chemical Toxicology* 37, 32–39. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.806529>
- Cook-Mills, J.M., 2006. Hydrogen peroxide activation of endothelial cell-associated MMPs during VCAM-1-dependent leukocyte migration. *Cellular and Molecular Biology* 52, 8–16. <https://doi.org/10.1170/T721>
- Correia, A.W., Arden Pope, C., Dockery, D.W., Wang, Y., Ezzati, M., Dominici, F., 2013. Effect of air pollution control on life expectancy in the United States: An analysis of 545 U.S. Counties for the period from 2000 to 2007. *Epidemiology* 24, 23–31. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182770237>
- Dekhuijzen, P.N.R., Aben, K.K.H., Dekker, I., Aarts, L.P.H.J., Wielders, P.L.M.L., Van Herwaarden, C.L.A., Bast, A., 1996. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154, 813–816. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810624>
- Deng, X., Zhang, F., Wang, L., Rui, W., Long, F., Zhao, Y., Chen, D., Ding, W., 2014. Airborne fine particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells. *Apoptosis* 19, 1099–1112. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0980-5>
- Ding, Q., Chen, Y., Zhang, Q., Guo, Y., Huang, Z., Dai, L., Cao, S., 2015. 8-bromo-7-methoxychrysin induces apoptosis by regulating Akt/FOXO3a pathway in cisplatin-sensitive and resistant ovarian cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 12, 5100–5108. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4039>
- Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., Tzivion, G., 2011. Bimodal Regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1453–1464. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.001>
- Dockery, D.W., Pope, C.A., Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Speizer, F.E., 1993. An association between air pollution and mortality

- in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329, 1753–1759. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312093292401>
- Dominici, F., Peng, R.D., Bell, M.L., Pham, L., McDermott, A., Zeger, S.L., Samet, J.M., 2006. Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admission for Cardiovascular and Respiratory Diseases. *JAMA* 295, 1127. <https://doi.org/10.1001/jama.295.10.1127>
- Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J.A., Jimenez, L.A., Gilmour, P.S., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Rahman, I., Faux, S.P., Brown, D.M., MacNee, W., 2003. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM<sub>10</sub>). *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1369–1382.
- Englert, N., 2004. Fine particles and human health - A review of epidemiological studies. *Toxicology Letters* 149, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.035>
- Essers, M.A.G., Weijzen, S., de Vries-Smits, A.M.M., Saarloos, I., de Ruiter, N.D., Bos, J.L., Burgering, B.M.T., 2004. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* 23, 4802–4812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600476>
- Esworthy, R., 2013. Air Quality: EPA's 2013 Changes to the Particulate Matter (PM) Standard. *Air Quality* 49.
- Falcon-Rodriguez, C.I., De Vizcaya-Ruiz, A., Rosas-Pérez, I.A., Osornio-Vargas, Á.R., Segura-Medina, P., 2017. Inhalation of concentrated PM 2.5 from Mexico City acts as an adjuvant in a guinea pig model of allergic asthma. *Environmental Pollution* 228, 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.050>
- Falcon-Rodriguez, C.I., Osornio-Vargas, A.R., Sada-Ovalle, I., Segura-Medina, P., 2016. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Frontiers in Immunology* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>
- Ferecatu, I., Borot, M.-C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Andreau, K., 2010a. 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. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-18>
- Ferecatu, I., Borot, M.C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Andreau, K., 2010b. 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, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-18>
- Ferreira, T.M., Forti, M.C., de Freitas, C.U., Nascimento, F.P., Junger, W.L., Gouveia, N., 2016. Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. *Int J Environ Res Public Health* 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100947>
- Glorieux, C., Calderon, P.B., 2017. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry* 398. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., Calderon, P.B., 2015. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine* 87, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>
- Gómez-Crisóstomo, N.P., Rodríguez Martínez, E., Rivas-Arancibia, S., 2014. Oxidative Stress Activates the Transcription Factors FoxO 1a and FoxO 3a in the Hippocampus of Rats Exposed to Low Doses of Ozone. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/805764>
- Greer, E.L., Brunet, A., 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410–7425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209086>
- Gualtieri, M., Øvrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini, M., Holme, J.A., 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 713, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.011>
- Guo, P., Feng, W., Zheng, M., Lv, J., Wang, L., Liu, J., Zhang, Yanhong, Luo, G., Zhang, Yanting, Deng, C., Shi, T., Liu, P., Zhang, L., 2018. Short-term associations of ambient air pollution and cause-specific emergency department visits in Guangzhou, China. *Science of the Total Environment* 613–614, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.102>
- Gutiérrez-Avila, I., Rojas-Bracho, L., Riojas-Rodríguez, H., Kloog, I., Just, A.C., Rothenberg, S.J., 2018. Cardiovascular and Cerebrovascular Mortality Associated With Acute Exposure to PM2.5 in Mexico City. *Stroke* 49, 1734–1736. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021034>
- Hnit, S.S.T., Xie, C., Yao, M., Holst, J., Bensoussan, A., De Souza, P., Li, Z., Dong, Q., 2015. p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 68, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.08.005>
- Holmström, K.M., Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Huang, H., Tindall, D.J., 2011. Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1961–1964. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.007>
- Kelly, F.J., Fussell, J.C., 2011. Air pollution and airway disease. *Clin. Exp. Allergy* 41, 1059–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03776.x>
- Kim, K.-H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International* 74, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>
- Klotz, L.-O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., Monsalve, M., 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology* 6, 51–72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>

- Klotz, L.O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., Monsalve, M., 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology* 6, 51–72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>
- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 317–326.
- Kolluri, S.K., Weiss, C., Koff, A., Göttlicher, M., 1999. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* 13, 1742–1753.
- Kouimtzi, T., Samara, C., Voutsas, D., Balafoutis, C., Müller, L., 2002. PCDD/Fs and PCBs in airborne particulate matter of the greater Thessaloniki area, N. Greece. *Chemosphere* 47, 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00291-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00291-0)
- Landrigan, P.J., Fuller, R., Acosta, N.J.R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. (Nil), Baldé, A.B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J.I., Breyse, P.N., Chiles, T., Mahidol, C., Coll-Seck, A.M., Cropper, M.L., Fobil, J., Fuster, V., Greenstone, M., Haines, A., Hanrahan, D., Hunter, D., Khare, M., Krupnick, A., Lanphear, B., Lohani, B., Martin, K., Mathiasen, K.V., McTeer, M.A., Murray, C.J.L., Ndahimananjara, J.D., Perera, F., Potočnik, J., Preker, A.S., Ramesh, J., Rockström, J., Salinas, C., Samson, L.D., Sandilya, K., Sly, P.D., Smith, K.R., Steiner, A., Stewart, R.B., Suk, W.A., van Schayck, O.C.P., Yadama, G.N., Yumkella, K., Zhong, M., 2018. The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet* 391, 462–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
- Lee, C.-W., Lin, Z.-C., Hsu, L.-F., Fang, J.-Y., Chiang, Y.-C., Tsai, M.-H., Lee, M.-H., Li, S.-Y., Hu, S.C.-S., Lee, I.-T., Yen, F.-L., 2016. Eupafolin ameliorates COX-2 expression and PGE2 production in particulate pollutants-exposed human keratinocytes through ROS/MAPKs pathways. *J Ethnopharmacol* 189, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.002>
- Li, J., Liu, C., Cheng, Y., Guo, S., Sun, Q., Kan, L., Chen, R., Kan, H., Bai, H., Cao, J., 2019. Association between ambient particulate matter air pollution and ST-elevation myocardial infarction: A case-crossover study in a Chinese city. *Chemosphere* 219, 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.094>
- Li, J., Tan, G., Ding, X., Wang, Y., Wu, A., Yang, Q., Ye, L., Shao, Y., 2017. A mouse dry eye model induced by topical administration of the air pollutant particulate matter 10. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.032>
- Li, K.-L., Lin, Y.-C., 2018. PM2.5 induced cardiac hypertrophy via CREB/GSK3b/SOS1 pathway and metabolomics alterations. *Oncotarget* 9, 30748–30760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25479>
- Li, N., Hao, M., Phalen, R.F., Hinds, W.C., Nel, A.E., 2003. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin. Immunol.* 109, 250–265.
- Liu, C.-W., Lee, T.-L., Chen, Y.-C., Liang, C.-J., Wang, S.-H., Lue, J.-H., Tsai, J.-S., Lee, S.-W., Chen, S.-H., Yang, Y.-F., Chuang, T.-Y., Chen, Y.-L., 2018. PM2.5-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1

- expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Particle and Fibre Toxicology* 15. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0240-x>
- Liu, H., Yin, J., Wang, C., Gu, Y., Deng, M., He, Z., 2014. FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in lung cancer cells: *Anti-Cancer Drugs* 25, 898–907. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000117>
- Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., Yu, W., Wang, Y., Li, P., Wang, J., 2018. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular Cancer* 17, 104. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0856-3>
- Longhin, E., Holme, J.A., Gutzkow, K.B., Arlt, V.M., Kucab, J.E., Camatini, M., Gualtieri, M., 2013. Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. *Part Fibre Toxicol* 10, 63. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-63>
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., 2014a. IARC evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution. *Environnement, Risques et Sante* 13, 347–352. <https://doi.org/10.1684/ers.2014.0715>
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet Oncology* 14, 1262–1263. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70487-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X)
- Loomis, D., Huang, W., Chen, G., 2014b. 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. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10028>
- MacFarlane, M., Williams, A.C., 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports* 5, 674–678. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400191>
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Mazzoli-Rocha, F., Fernandes, S., Einicker-Lamas, M., Zin, W.A., 2010. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biol. Toxicol.* 26, 481–498. <https://doi.org/10.1007/s10565-010-9158-2>
- Mo, Z., Fu, Q., Lyu, D., Zhang, L., Qin, Z., Tang, Q., Yin, H., Xu, P., Wu, L., Wang, X., Lou, X., Chen, Z., Yao, K., 2018. Impacts of air pollution on dry eye disease among residents in Hangzhou, China: A case-crossover study. *Environ. Pollut.* 246, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.109>
- Morakinyo, O.M., Mokgobu, M.I., Mukhola, M.S., 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, 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060592>
- Moreno-Marín, N., Merino, J.M., Alvarez-Barrientos, A., Patel, D.P., Takahashi, S., González-Sancho, J.M., Gandolfo, P., Rios, R.M., Muñoz, A., Gonzalez, F.J., Fernández-Salguero, P.M., 2018. Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Liver Polyploidization and Inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *iScience* 4, 44–63. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.05.006>

- Nicholson, D., 1999. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation* 6, 1028–1042. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400598>
- Obsil, T., Obsilova, V., 2011. Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1946–1953. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.025>
- Peixoto, M.S., de Oliveira Galvão, M.F., Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2017. Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere* 188, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.076>
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., Koff, A., 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development* 8, 9–22. <https://doi.org/10.1101/gad.8.1.9>
- Pope, C.A., 1995. Particulate Air Pollution as a Predictor of Mortality in a Prospective Study of U.S. Adults 151, 6.
- Pope, C.A., Dockery, D.W., 2006. Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. *Journal of the Air and Waste Management Association* 56, 709–742. <https://doi.org/10.1080/10473289.2006.10464485>
- Pope III, C.A., 2002. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA* 287, 1132. <https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132>
- Quezada-Maldonado, E.M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., Vaca-Paniagua, F., García-Cuellar, C.M., 2018. miRNAs deregulation in lung cells exposed to airborne particulate matter (PM10) is associated with pathways deregulated in lung tumors. *Environmental Pollution* 241, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.073>
- Raes, F., Dingenen, R.V., Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J.-P., Seinfeld, J.H., Adams, P., 2000. Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmospheric Environment* 26.
- Rahman, I., 2003. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 95–109.
- Reyes-Zárte, E., Sánchez-Pérez, Y., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Morales-Bárceñas, R., Souza-Arroyo, V., García-Cuellar, C.M., 2016a. Atmospheric particulate matter (PM10) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKC $\zeta$  and Src kinases in lung cells. *Environ. Pollut.* 214, 646–656. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.072>
- Reyes-Zárte, E., Sánchez-Pérez, Y., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Morales-Bárceñas, R., Souza-Arroyo, V., García-Cuellar, C.M., 2016b. Atmospheric particulate matter (PM10) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKC $\zeta$  and Src kinases in lung cells. *Environmental Pollution* 214, 646–656. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.072>
- Röhrdanz, E., Kahl, R., 1998. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 27–38.
- Salcido-Neyoy, M.E., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsebatt, M.E., Meléndez-Zajgla, J., Morales-Bárceñas, R., Petrosyan, P., Molina-Servin,

- E.D., Vega, E., Manzano-León, N., García-Cuellar, C.M., 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM<sub>10</sub>) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Pollut.* 203, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.051>
- Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Herrera, L.A., Morales-Bárceñas, R., López-Saavedra, A., González-Ramírez, I., Miranda, J., García-Cuellar, C.M., 2014. Cytoplasmic p21CIP1/WAF1, ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) exposure in lung cells. *Toxicology Letters* 225, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.018>
- Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruíz, C., Vázquez-López, I., García-Cuellar, C.M., 2009. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM<sub>10</sub>) of urban air pollutants. *Cancer Letters* 278, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.010>
- Sarbassov, D.D., 2005. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 307, 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- 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., Mutlu, G.M., De Vizcaya-Ruiz, A., Bunting, G.R.S., 2012. Particulate matter Air Pollution induces hypermethylation of the p16 promoter Via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Scientific Reports* 2. <https://doi.org/10.1038/srep00275>
- Soberanes, S., Panduri, V., Mutlu, G.M., Ghio, A., Bunting, G.R.S., Kamp, D.W., 2006. p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 1229–1238. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-203OC>
- Su, R., Jin, X., Zhang, W., Li, Z., Liu, X., Ren, J., 2017. Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Chemosphere* 167, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.024>
- Tan, W.-Q., Wang, K., Lv, D.-Y., Li, P.-F., 2008. Foxo3a Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy through Transactivating Catalase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 29730–29739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805514200>
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Taylor, S., Lam, M., Pararasa, C., Brown, J., Carmichael, A.R., Griffiths, H.R., 2015. Evaluating the evidence for targeting FOXO3a in breast cancer: a systematic review. *Cancer Cell International* 15, 1. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0156-6>
- Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., Kamp, D.W., 2003. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and



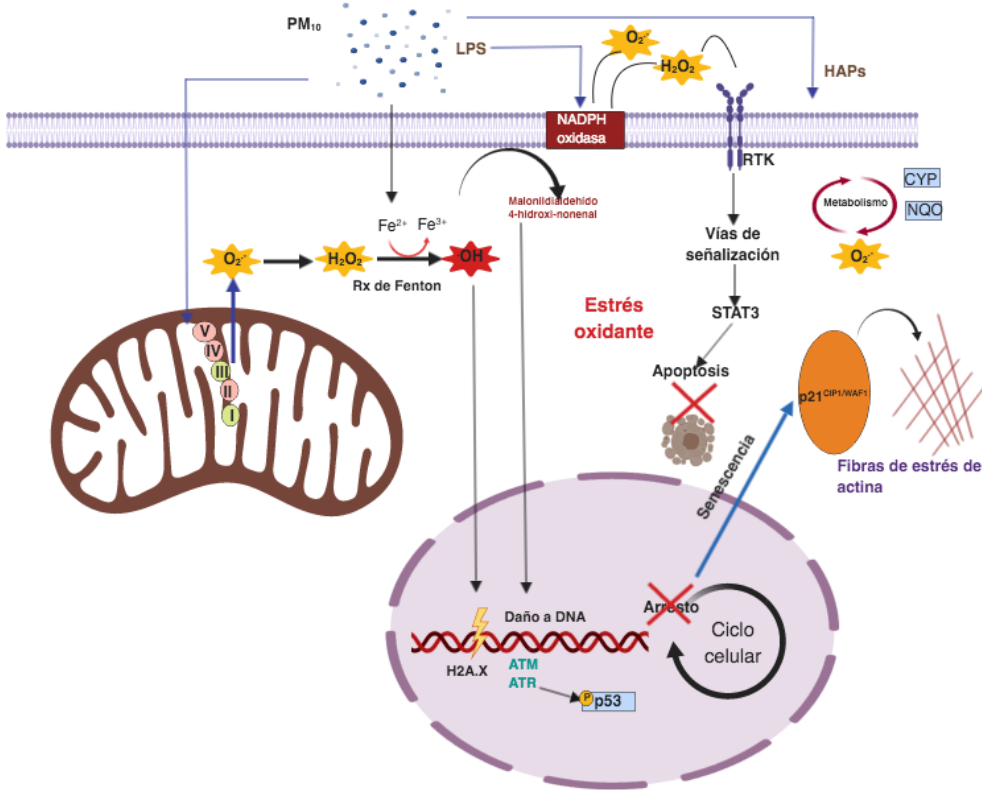
- the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 180–187. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0269OC>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Ventura, C., Núñez, M., Gaido, V., Pontillo, C., Miret, N., Randi, A., Cocca, C., 2017. Hexachlorobenzene alters cell cycle by regulating p27-cyclin E-CDK2 and c-Src-p27 protein complexes. *Toxicology Letters* 270, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.013>
- Veres, T.Z., 2018. Visualizing immune responses of the airway mucosa. *Cellular Immunology* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.10.001>
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Wang, J., Huang, J., Wang, L., Chen, C., Yang, D., Jin, M., Bai, C., Song, Y., 2017. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Journal of Thoracic Disease* 9, 4398–4412. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.09.135>
- Wang, Q., Gan, X., Li, F., Chen, Y., Fu, W., Zhu, X., Xu, Dongqun, Long, M., Xu, Donggang, 2019. PM<sub>2.5</sub> Exposure Induces More Serious Apoptosis of Cardiomyocytes Mediated by Caspase3 through JNK/ P53 Pathway in Hyperlipidemic Rats. *Int. J. Biol. Sci.* 15, 24–33. <https://doi.org/10.7150/ijbs.28633>
- Wang, Q., Wang, C., Chen, J., 2018. NLRP6, decreased in gastric cancer, suppresses tumorigenicity of gastric cancer cells. *Cancer Manag Res* 10, 6431–6444. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S182980>
- Xu, G., Liu, J., Yoshimoto, K., Chen, G., Iwata, T., Mizusawa, N., Duan, Z., Wan, C., Jiang, J., 2014. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces expression of p27kip1 and FoxO3a in female rat cerebral cortex and PC12 cells. *Toxicology Letters* 226, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.019>
- Yan, F., Wu, Yinfang, Liu, H., Wu, Yanping, Shen, H., Li, W., 2018. ATF3 is positively involved in particulate matter-induced airway inflammation in vitro and in vivo. *Toxicology Letters* 287, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.022>
- Yi, S., Zhang, F., Qu, F., Ding, W., 2014. Water-insoluble fraction of airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) induces oxidative stress in human lung epithelial A549 cells. *Environ. Toxicol.* 29, 226–233. <https://doi.org/10.1002/tox.21750>
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., Rishi, A.K., 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1978–1986. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>

## **ANEXOS**

### **Anexo 1: Clasificación de carcinogénicos por la Agencia Internacional del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés)**

Grupo 1	Carcinogénico para humanos
Grupo 2A	Probable carcinogénico para humanos
Grupo 2B	Posible carcinogénico para humanos
Grupo 3	No clasificado como carcinogénico para humanos

Anexo 2: Resumen de los efectos citotóxicos de las PM<sub>10</sub>



Anexo 3: Imagen representativa de los plots de la citometría de flujo para evaluar apoptosis en las células A549 expuestas a  $PM_{10}$  y posteriormente a  $H_2O_2$  con y sin inhibidor de la vía AKT/FoxO3a (LY294002).

