



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

**LAS AEROPARTÍCULAS CONTAMINANTES PM_{2.5} DISMINUYEN LA
EXPRESIÓN DE BRCA1 VÍA AHR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS

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

PRESENTA:

BIÓL. BAUTISTA OCAMPO YANUEH ACITLALI

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
FACULTAD DE ESTUDOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2021



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/684/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **03 de mayo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **BAUTISTA OCAMPO YANUEH ACITLALI** con número de cuenta **414004724** con la tesis titulada "**LAS AEROPARTÍCULAS CONTAMINANTES PM_{2.5} DISMINUYEN LA EXPRESIÓN DE BRCA1 VÍA AHR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**", realizada bajo la dirección de la **DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Vocal: DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA
Secretario: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca con número de registro 925348 y por el apoyo financiero para la realización de este proyecto mediante el fondo SEP-CONACyT CB-2015-01, 255150.

A mi tutora, la Dra. Yesennia Sánchez Pérez y a los miembros del comité tutor: Dra. Yolanda Irasema Chirino López y Dr. Ernesto Soto Reyes Solís.

Agradecimientos personales

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional.

A los miembros del jurado: Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro, Dra. Patricia Segura Medina y Dr. Felipe Vaca Paniagua por sus comentarios y su tiempo en la revisión de la tesis.

Al Instituto Nacional de Cancerología por permitir realizar mi proyecto de maestría dentro de sus instalaciones y brindarme las herramientas para su desarrollo. Y a los miembros de los laboratorios 2 y 4 del INCan, especialmente a mi tutora, la Dra. Yesennia Sánchez Pérez, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por su guía, apoyo y tiempo en la elaboración de este proyecto.

A mis padres, por darme a su manera la mejor educación posible y por enseñarme a ser independiente y seguir adelante. Gracias por todo su apoyo y amor incondicional. ¡Los amo!

A mi hermana Andoreni, por ser el mejor pilar de la “hermana mayor”, por procurar por nosotras, por todo el apoyo y cariño incondicional, ¡te amo andi!

A mi gemela Zuluay, por ser mi mejor amiga y siempre estar ahí, por apoyarme en cualquier nuevo pasatiempo que se me ocurra, por todo el cariño que me has otorgado, por siempre creer en mi ¡Te amo Zuli!

A Eduardo, por ser mi pareja y mi mejor amigo, gracias por todo el apoyo y cariño que me das, por siempre motivarme en continuar en la investigación. Te amo, gracias por crecer a mi lado, por acompañarnos en los días más difíciles y también crear los más felices.

A los amigos que conocí en el laboratorio y que se volvieron amigos de vida: Marel, Carlos, Miguel y Pablo, gracias por su apoyo, sus consejos, su alegría, ¡los quiero mucho!

A mis amigas de la vida, que aunque nos separe la distancia, siempre las llevo conmigo, las quiero muchísimo.

Índice

Lista de abreviaturas

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| Introducción..... | 5 |
| Contaminación del aire | 5 |
| Partículas suspendidas..... | 8 |
| Efectos de las PM en la salud..... | 10 |
| Receptor de aril hidrocarburos (AHR)..... | 11 |
| Vía canónica del AHR | 12 |
| Vías no canónicas del AHR..... | 12 |
| Cáncer de mama | 13 |
| Gen de BRCA1 | 15 |
| Asociación de las PM con el cáncer de mama | 16 |
| Justificación | 20 |
| Pregunta de investigación..... | 20 |
| Hipótesis | 20 |
| Objetivo general | 21 |
| Objetivos particulares..... | 21 |
| Metodología | 22 |
| Colecta de PM _{2.5} | 22 |
| Cultivo celular | 22 |
| Transfección de siRNAs | 23 |
| Extracción de proteína..... | 23 |
| Western blot..... | 24 |
| Extracción de RNA | 25 |
| Evaluación de los niveles del mensajero de BRCA mediante qRTPCR | 25 |
| Análisis estadístico | 26 |
| Resultados | 27 |
| Las PM _{2.5} aumentaron los niveles de la proteína AHR | 27 |
| Las PM _{2.5} disminuyeron los niveles de mRNA y proteína de BRCA1, a través de AHR | 29 |
| Discusión | 32 |
| Conclusiones..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| Perspectivas | 40 |
| Referencias bibliográficas..... | 41 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---|--|
| $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | Microgramo por centímetro cuadrado |
| $\mu\text{g}/\text{m}^3$ | Microgramo por metro cúbico |
| μm | Micrómetro |
| μM | Micromolar |
| AHR | Receptor aril hidrocarburos |
| Aip | Proteína de interacción con AHR |
| ALDH3A1 | Aldehído deshidrogenasa 3A1 |
| ARNT | Traslocador nuclear de AHR |
| ATCC | American type culture collection |
| BaA | Benzo(a)antraceno |
| BaP | Benzo(a)pireno |
| BbF | Benzo(b)fluoranteno |
| BghiP | Benzo(ghi)perileno |
| bHLH-PAS | Basic helix loop helix-PER ARNT-SIM |
| BRCA1 | Gen de susceptibilidad de cáncer de mama 1 |
| BRCA2 | Gen de susceptibilidad de cáncer de mama 2 |
| CH₄ | Metano |
| CO | Monóxido de carbono |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| CYP1A1 | Citocromo P450 1A1 |
| CYP1B1 | Citocromo P450 1B1 |
| CYP450 | Citocromos P450 |
| DahA | Dibenzo(ah)antraceno |
| ddH₂O | Agua bidestilada |
| DMBA | 7,12-dimethyl-benzo(a)anthraceno |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNMT1 | DNA metil transferasa 1 |
| DNMT3a | DNA metil transferasa 3a |
| DNMT3b | DNA metil transferasa 3b |
| ER | Receptor de estrógeno |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| GST | Glutatión S-transferasas |
| H3K9Ac | Acetilación de la lisina 9 de la histona H3 |
| H3K9me3 | Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 |
| H4ac | Acetilación de la histona H4 |
| HAPs | Hidrocarburos aromáticos policíclicos |
| HDAC1 | Histona desacetilasa 1 |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| Hsp90 | Proteína de choque térmico 90 |
| IARC | Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer |
| m³/min | Metro cúbico por minuto |
| MBD2 | Proteína 2 con dominio de unión a metil-cpg |
| mg/mL | Miligramo por microlitro |

| | |
|-------------------------|---|
| MCF7 | Michigan Cancer Foundation 7 |
| Min | Minutos |
| mL | mililitros |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NLS | Señal de localización nuclear |
| nM | Nanomolar |
| nm | nanómetro |
| NO₂ | Dióxido de nitrógeno |
| NOM | Normas oficiales mexicanas |
| NQO1 | NAD(P)H dependiente de quinona oxidoreductasa-1 |
| O₃ | Ozono |
| °C | Grados centígrados |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| Pb | Plomo |
| PBS | Amortiguador salino de fosfatos |
| PM | Partículas suspendidas |
| PM₁₀ | Partículas con diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$ |
| PM_{2.5} | Partículas con diámetro aerodinámico $\leq 2.5 \mu\text{m}$ |
| PR | Progesterona positivos |
| Psi | Libra por pulgada cuadrada |
| PVDF | Polifluoruro de vinilideno |
| q-RT-PCR | Transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SiRNA AHR | RNA pequeño de interferencia de AHR |
| SiRNA CT | RNA pequeño de interferencia control |
| siRNAs | RNA pequeño de interferencia |
| SO₂ | Dióxido de azufre |
| TBE | Tris borato EDTA |
| TBS | Amortiguador salino de tris |
| TCDD | 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina |
| TSP | Partículas suspendidas totales |
| UFP | Partículas ultrafinas |
| UGT1A6 | UDP-glucuronosil transferasa |
| uL | Microlitro |
| VOC | Compuestos orgánicos volátiles |
| XRE | Elementos de respuesta a xenobióticos |

Resumen

Las aeropartículas contaminantes con un diámetro aerodinámico $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) son una mezcla compleja de materiales en fase sólida y/o líquida que se encuentran suspendidas en el aire, se originan principalmente de procesos de combustión y su contenido está enriquecido con compuestos orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Las PM fueron clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como carcinógenos para el ser humano, por la evidencia que existe en cáncer de pulmón, principalmente; sin embargo, estudios epidemiológicos también muestran que la exposición a $\text{PM}_{2.5}$ puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama.

El gen *BRCA1* es un gen supresor de tumores, y sus mutaciones germinales están asociadas al desarrollo de cáncer de mama hereditario, sin embargo, en tumores esporádicos de mama se ha reportado que el gen *BRCA1* está silenciado, sin presentar mutaciones, y existe una relación con la disminución de la expresión de su mRNA y de su proteína. Existen trabajos que demuestran que contaminantes ambientales como los HAPs y dioxinas pueden regular negativamente la expresión de *BRCA1* a través de la activación de la vía del receptor de aril hidrocarburos (AHR), ya que esta proteína es capaz de reprimir epigenéticamente el promotor de *BRCA1*. Se desconocen los mecanismos moleculares inducidos por las $\text{PM}_{2.5}$ que puedan favorecer el desarrollo de cáncer de mama y por esta razón decidimos evaluar si las $\text{PM}_{2.5}$ disminuyen los niveles de expresión de *BRCA1*, y si esta mediado por el AHR.

Las células MCF7 fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{PM}_{2.5}$ durante 24 y 48 horas. Se evaluó la expresión del mRNA de *BRCA1* por qRT-PCR y los niveles de proteína por western blot. Para determinar la participación del AHR, se inhibió la expresión del AHR mediante un siRNA. Se encontró que las $\text{PM}_{2.5}$ aumentaron niveles de la proteína del AHR a las 24 h (**p < 0.0005 vs siRNA CT) y a las 48 h (*p < 0.05 vs siRNA CT). Las $\text{PM}_{2.5}$ disminuyeron los niveles del mRNA de *BRCA1* (*p < 0.05 vs siRNA CT) a las 24 h, y cuando las células fueron pre-tratadas con siRNA de AHR y expuestas a $\text{PM}_{2.5}$ se observó la prevención de la disminución del mRNA de *BRCA1* inducida por las PM (+p < 0.05 vs siRNA CT).

PM_{2.5}). A las 48 h de exposición, las PM_{2.5} disminuyen los niveles de la proteína de BRCA1 (**p<0.005 vs SiRNA CT), y se observó una prevención en la disminución de la proteína de BRCA1 inducida por las PM_{2.5} (*p<0.05 vs siRNA CT PM_{2.5}), cuando se inhibió el AHR con siRNAs.

Los resultados muestran que en células MCF7 expuestas a PM_{2.5} durante 24 horas se disminuyen los niveles de mRNA de *BRCA1*, pero el efecto en la disminución de los niveles de la proteína de BRCA1 se observa en las células expuestas a PM_{2.5} durante 48 horas, y en ambos tiempos se observa que AHR interviene en la disminución de la expresión de BRCA1. Esto sugiere que AHR participa en la regulación negativa de la expresión de *BRCA1*.

Abstract

Airborne pollution with an aerodynamic diameter of 2.5 μm or less ($\text{PM}_{2.5}$) are a complex mixture of solid and/or liquid phase materials suspended in the air that originate mainly from combustion processes, which content is rich in organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). PM were classified by the International Cancer Research Agency as carcinogenic to humans, due to the evidence of its effect in lung cancer development; however, epidemiological studies also show that exposure to $\text{PM}_{2.5}$ may be a risk factor in the development of breast cancer.

The *BRCA1* gene is a tumor suppressor gene, and its germline mutations are associated with the development of hereditary breast cancer, however, it has been reported that the *BRCA1* gene is silenced without mutations in sporadic breast tumors, which has been linked with a decreased expression of its mRNA and protein. Studies have demonstrated that environmental pollutants (PAHs and dioxins) can downregulate the expression of *BRCA1* through activation of the pathway activation of aryl hydrocarbon receptor (AHR), this protein is capable of epigenetically suppressing the *BRCA1* promoter. The molecular mechanisms induced by $\text{PM}_{2.5}$ that may favor the development of breast cancer are still unknown. Because of this we decided to evaluate whether $\text{PM}_{2.5}$ reduces *BRCA1* expression levels, through the AHR pathway.

MCF7 cells were exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of $\text{PM}_{2.5}$ for 24 and 48 hours. Expression of *BRCA1* mRNA was evaluated by qRT-PCR and *BRCA1* protein levels were evaluated by western blot. To determine AHR involvement, AHR expression was inhibited by siRNA. $\text{PM}_{2.5}$ were found to increase AHR protein levels after 24 h (**p <0.0005 vs siRNA CT) and 48 h (*p <0.05 vs siRNA CT). $\text{PM}_{2.5}$ decrease the levels of *BRCA1* mRNA (*p <0.05 vs siRNA CT) at 24 h, and when cells were pre-treated with AHR siRNA and exposed to $\text{PM}_{2.5}$, prevention of PM-induced *BRCA1* mRNA decrease (+p <0.05 vs siRNA CT $\text{PM}_{2.5}$) was observed. At 48 h of exposure, $\text{PM}_{2.5}$ decreases *BRCA1* protein levels (**p <0.005 vs siRNA CT), and prevention was observed in the decrease of *BRCA1* protein induced by $\text{PM}_{2.5}$ (*p <0.05 vs siRNA CT $\text{PM}_{2.5}$), when AHR was inhibited with siRNAs.

These results show that in MCF7 cells exposed to PM_{2.5} for 24 hours the mRNA levels of *BRCA1* are decreased, but the effect on the decrease of BRCA1 protein levels is observed in exposed cells for 48 hours, and in both exposure times, it is observed that AHR intervenes in the decrease of the expression of BRCA1. This suggests that AHR is negatively involved in the regulation of BRCA1 expression.

Introducción

Contaminación del aire

El aire es una mezcla de gases que conforman la atmósfera terrestre y se compone principalmente por nitrógeno, oxígeno y argón con volúmenes del 78.08%, 20.95% y 0.93%, respectivamente. También contienen componentes como vapor de agua, dióxido de carbono, helio, ozono y metano, considerados elementos traza por encontrarse en muy bajas proporciones (Barry et al., 2003).

La contaminación atmosférica es una alteración de los componentes del aire y está dada por la presencia de gases o partículas que pueden producir efectos adversos en la salud de los seres vivos y en los ecosistemas (Seinfeld & Pandis, 2016). Los contaminantes emitidos a la atmósfera provienen de fuentes naturales como incendios forestales no provocados, erosión del suelo, erupciones volcánicas y aerosoles marinos. También se emiten a la atmósfera contaminantes de fuentes antropogénicas derivados de procesos industriales y agrícolas, que involucran la quema de combustibles fósiles para la generación de energía o por emisiones vehiculares (Jacobson, 2002).

Independientemente del origen, los contaminantes atmosféricos se dividen en contaminantes primarios y secundarios; los contaminantes primarios son emitidos directamente a la atmósfera como el metano (CH_4), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO_2) o partículas como el polvo suspendido del suelo. Mientras que los contaminantes secundarios se forman dentro de la atmósfera a través de reacciones químicas entre precursores primarios; por ejemplo, el ozono (O_3) es un gas secundario, y las partículas secundarias de sulfatos y nitratos son formadas a partir de la conversión de gas a partícula, proceso conocido como nucleación (Seinfeld & Pandis, 2016).

La contaminación del aire representa un problema ambiental y tiene un impacto en la salud del ser humano, como lo muestran datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual reportó que 4.2 millones de muertes prematuras al año pueden ser atribuidas a la contaminación del aire (WHO, 2018). Para evaluar la calidad del aire se estableció el monitoreo de seis contaminantes del aire, a los cuales se les nombró “contaminantes criterio” debido a que a través de

diversos estudios se demostró que tienen impacto en la salud de los humanos y del entorno (U.S. EPA., 2004). Los contaminantes criterio son: el dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), ozono (O₃), plomo (Pb) y partículas suspendidas (PM₁₀ y PM_{2.5}). Por medio de las guías de calidad del aire, la OMS establece los límites permisibles internacionales de los contaminantes criterio (WHO, 2006), y en México, los valores se encuentran publicados en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores límites permisibles para los contaminantes criterio estipuladas por las Normas Oficiales Mexicanas y por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

| Contaminante criterio | México (Normas Oficiales Mexicanas) | | OMS (Guías de la Calidad del Aire, 2015) |
|---|--|--|---|
| Dióxido de azufre (SO ₂) | NOM-022-SSA1-2010 | 0.110 ppm, máximo media de 24 horas 0.200 ppm, segundo máximo anual como media móvil de 8 horas 0.025 ppm, media anual | 20 µg/m ³ , media de 24 horas 500 µg/m ³ , media de 10 minutos |
| Monóxido de carbono (CO) | NOM-021-SSA1-1993 | 11.0 ppm, máximo anual como media móvil de 8 horas | |
| Dióxido de nitrógeno (NO ₂) | NOM-023-SSA1-1993 | 0.210 ppm, promedio horario | 40 µg/m ³ , media anual 200 µg/m ³ , media de una hora |
| Ozono (O ₃) | NOM-020-SSA1-2014 | 0.095 ppm, promedio horario 0.070 ppm, máximo anual del promedio móvil de 8 horas | 100 µg/m ³ , media de ocho horas |
| Plomo (Pb) | NOM-026-SSA1-1993 | 1.5 µg/m ³ , en un periodo de tres meses como promedio aritmético | |
| Partículas menores a 10 micrómetros (PM ₁₀) | NOM-025-SSA1-2014 | 75 µg/m ³ , promedio 24 horas 40 µg/m ³ , promedio anual | 20 µg/m ³ , media anual 50 µg/m ³ , media de 24 horas |
| Partículas menores a 2.5 micrómetros (PM _{2.5}) | NOM-025-SSA1-2014 | 45 µg/m ³ , promedio 24 horas 12 µg/m ³ , promedio anual | 10 µg/m ³ , media anual 25 µg/m ³ , media de 24 horas |

Los estándares para medir la calidad del aire definen las concentraciones límites permitidas de los contaminantes criterio, y su propósito es proteger la salud de la población, en particular de grupos vulnerables como niños, personas de la tercera edad y personas con enfermedades preexistentes, sin embargo, es importante mencionar que no existen umbrales discernibles de concentración por debajo de los cuales no se producen efectos adversos en la salud (WHO, 2006).

Dentro de los efectos a la salud asociados a los contaminantes criterio, se sabe que la exposición a SO₂, NO₂ y O₃ genera irritación e inflamación de las vías respiratorias, sintomatología respiratoria como tos, sibilancias, disnea y broncoespasmos, y exacerbación de enfermedades como asma y bronquitis (T.-M. Chen et al., 2007; Lippmann, 1989); la exposición a SO₂ afecta principalmente la función pulmonar, la exposición a NO₂ aumenta el riesgo de infecciones del tracto respiratorio y agrava enfermedades respiratorias, principalmente el asma (M. Chen et al., 2007). la exposición a O₃ reduce la función pulmonar, y genera síntomas como dificultad para respirar (Lippmann, 1989), la exposición al Pb genera problemas de comportamiento y aprendizaje en los niños (Assi et al., 2016), y cáncer de estómago (Rousseau et al., 2007). El CO genera sintomatologías como dolor de cabeza, mareo, náusea y pérdida de la conciencia (Manisalidis et al., 2020). Con respecto a las partículas contaminantes se sabe que pueden afectar tanto al sistema respiratorio, exacerbando el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Brunekreef & Forsberg, 2005); así como al sistema cardiovascular desencadenando arritmias, infartos, insuficiencia cardíaca y eventos cerebrovasculares (Bourdrel et al., 2017). Además, se sabe que las partículas contaminantes son un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón (Loomis et al., 2013), por lo que en este trabajo estamos interesados en conocer el potencial carcinogénico de las partículas.

Partículas suspendidas

Las partículas suspendidas (PM, por sus siglas en inglés “Particulate matter”), también conocidas como aeropartículas o material particulado, son una mezcla compleja de materiales en fase sólida y/o líquida que se encuentran suspendidas en el aire. Las PM tienen diversas formas, tamaños y composición química (Jacobson, 2002). Para su estudio, las PM se clasifican de acuerdo con su diámetro aerodinámico en: partículas suspendidas totales (TSP) con diámetro aerodinámico de hasta $100\ \mu\text{m}$, partículas PM_{10} con diámetro aerodinámico $\leq 10\ \mu\text{m}$, partículas finas con diámetro aerodinámico $\leq 2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) y partículas ultrafinas con diámetro aerodinámico $\leq 0.1\ \mu\text{m}$ (UFP). Como se muestra en la figura 1, cada fracción de PM contienen a las partículas de menor tamaño, es decir, las PM_{10} contienen a $\text{PM}_{2.5}$ y a su vez a UFP (U.S. EPA., 2004).

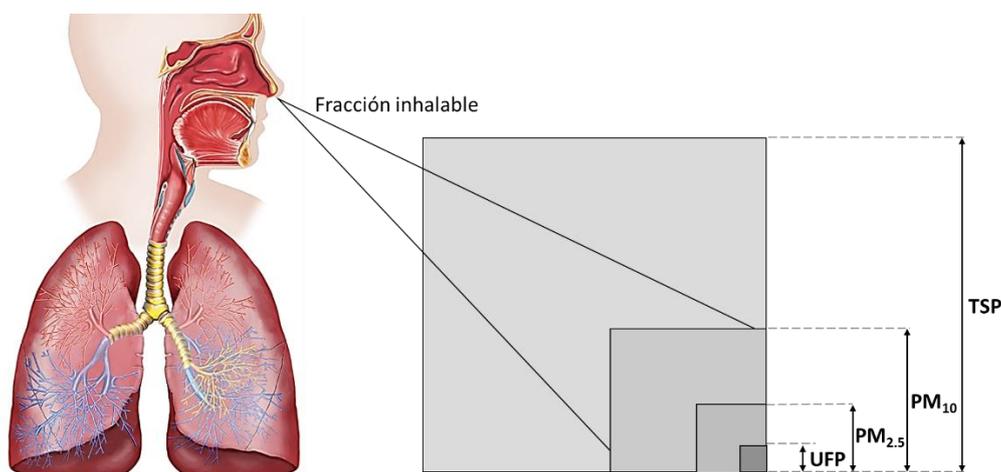


Figura 1. Clasificación de las PM de acuerdo con su diámetro aerodinámico

Las PM se clasifican en partículas suspendidas totales (TSP), partículas con diámetro aerodinámico $\leq 10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) y partículas con diámetro aerodinámico $\leq 2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) y partículas ultrafinas con diámetro aerodinámico $\leq 0.1\ \mu\text{m}$ (UFP), como se muestra en la imagen cada fracción de PM contienen a las partículas de menor tamaño, es decir, las PM_{10} contienen a $\text{PM}_{2.5}$ y a su vez a UFP. La fracción inhalable (PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$, UFP) es capaz de ingresar a las vías respiratorias profundas. Tomada y modificada de García-García, 2014.

Debido a su tamaño, las PM con diámetro aerodinámico $\leq 10\ \mu\text{m}$ (PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$ y UFP) son conocidas como la fracción inhalable ya que son capaces de ingresar a las vías respiratorias profundas, y se ha demostrado que entre más pequeño sea el diámetro aerodinámico de la partícula, más profundo es su sitio de deposición en el tracto respiratorio y más lenta su velocidad de remoción, por lo que la probabilidad de interacción con la célula aumenta (Zereini & Wiseman,

2011). Las PM_{2.5}, y especialmente las UFP, pueden penetrar profundamente en las vías respiratorias, depositarse en los alvéolos e ingresar a torrente sanguíneo y, por tanto, pueden llegar a órganos extrapulmonares como hígado, riñón y bazo (Li et al., 2019; Shimada et al., 2006; X. Zhang et al., 2018). Las vías por las que las PM pueden ingresar al torrente sanguíneo son: 1) la translocación, las PM pueden atravesar la barrera epitelial y cruzar sucesivamente la membrana basal entre las células endoteliales y finalmente ingresar al torrente sanguíneo; 2) la disolución de los componentes solubles de las PM y su absorción en el surfactante alveolar, favoreciendo su translocación hacia la barrera alveolo-capilar, y 3) por macrófagos alveolares que fagocitan y transportan las PM, la principal vía del aclaramiento es por transporte mucociliar; sin embargo los macrófagos que contienen las PM pueden volver a entrar en el intersticio y pasar de allí al sistema linfático o sanguíneo (Li et al., 2019; Mills et al., 2006; Shimada et al., 2006; Stone et al., 2017; X. Zhang et al., 2018).

Debido a que las PM pueden alcanzar diversos órganos, su composición es muy importante, la cual depende de su origen, ya sea de origen natural o antropogénico. Las partículas finas y ultrafinas se originan principalmente de la combustión de combustibles fósiles y de materia orgánica para la producción de la electricidad, en procesos industriales como los metalúrgicos, y en el uso de automóviles. Las partículas de mayor tamaño como las PM₁₀ se generan por procesos de disrupción mecánica como la suspensión del polvo y suelo por acción del viento (Seinfeld & Pandis, 2016).

La composición de las PM está caracterizada por ser una mezcla compleja de contaminantes que incluye diversos componentes de origen biológico como el polen, esporas, endotoxina, virus, hongos y bacterias (Cao et al., 2014); compuestos inorgánicos como el carbono elemental, nitratos, sulfatos y metales como hierro, aluminio, níquel, titanio, plomo, cromo, manganeso, entre otros (Chirino et al., 2015; U.S. EPA., 2004); y compuestos orgánicos como las dioxinas, compuestos orgánicos volátiles (VOC), aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (U.S. EPA., 2004).

Efectos de las PM en la salud

A partir de estudios epidemiológicos, se sabe que el incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la concentración de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ en la atmósfera está asociado con el aumento del 23.5% y 19.6%, respectivamente, de ingresos hospitalarios y visitas a urgencias por enfermedades respiratorias y enfermedades cardiovasculares (Ferreira et al., 2016). Además, el aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en los niveles de exposición a $\text{PM}_{2.5}$ conlleva a un aumento del 11% en la mortalidad por problemas cardiovasculares como desarrollo de aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca aguda (Bourdrel et al., 2017). También se ha demostrado que el aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} está asociado a un aumento del 1% y 1.2% en el riesgo de admisión hospitalaria por exacerbación de enfermedades respiratorias como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, respectivamente (Atkinson et al., 2001). Además, se reportó que por cada incremento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ existe un incremento del 6% en el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiopulmonares y un incremento del 8% en mortalidad por cáncer de pulmón (Pope et al., 2002).

De acuerdo con la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) la contaminación del aire extramuros y las PM pertenecen al grupo 1, considerándolos como carcinógenos para el ser humano (IARC, 2016; Loomis et al., 2013). Esta clasificación se dio en el 2013, después de la revisión de evidencia científica que incluyó estudios epidemiológicos y estudios experimentales sobre los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de cáncer, determinando así que existe evidencia suficiente del potencial carcinogénico de la contaminación del aire en los humanos (IARC, 2016; Loomis et al., 2013).

Las PM fueron clasificadas por la IARC como un carcinógeno para los humanos basándose en la evidencia que existe en torno al cáncer de pulmón principalmente (X. Chen et al., 2016; Pope et al., 2002), y al cáncer de vejiga (Castano-Vinyals et al., 2008). Por otro lado, evidencia reciente señala una asociación entre la contaminación del aire y el desarrollo de cáncer de mama (Bonner et al., 2005; Hwang et al., 2020; Parikh & Wei, 2016), en la cual se ha mostrado que los HAPs que se encuentran en las PM juegan un papel importante en el desarrollo de esta neoplasia. Sin embargo, aún no se han descrito los

mecanismos moleculares por los cuales las PM favorecen el desarrollo del cáncer de mama, y es de interés de este trabajo, elucidar mecanismos mediante los cuales las PM_{2.5} favorecen el desarrollo de cáncer de mama.

Se ha reportado que aproximadamente 88% de los HAPs atmosférico se encuentran adsorbidos en las PM_{2.5}, entre los que se encuentran el benzo(ghi)perileno (BghiP), benzo(a)pireno (BaP), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(a)antraceno (BaA) y dibenzo(ah)antraceno (DahA) (Jakovljević et al., 2018), además, los HAPs con potencial carcinogénico (como el BaP) pueden representar hasta el 47% de las concentraciones totales de HAP en las PM_{2.5} (Hassanvand et al., 2015). Algunos de los HAPs son compuestos pro-carcinógenos y son activados metabólicamente por los citocromos P450, CYP450 (enzimas de la fase I del metabolismo de xenobióticos), estos citocromos son activadas por la vía del receptor de aril hidrocarburos (AHR). Esta vía da como resultado compuestos intermediarios capaces de unirse al DNA, y de no ser eliminados apropiadamente pueden generar mutaciones en genes, lo que puede favorecer el desarrollo de cáncer (Moorthy et al., 2015).

Receptor de aril hidrocarburos (AHR)

El AHR es un factor de transcripción que pertenece al grupo bHLH-PAS (basic helix loop helix-PER ARNT-SIM), una característica importante del receptor es su activación dependiente de ligando, su función es la activación de la expresión de numerosos genes, entre ellos destacan los genes que codifican para enzimas del metabolismo de xenobióticos (Denison & Nagy, 2003).

Los ligandos del AHR se caracterizan por tener una estructura planar y de naturaleza hidrofóbica. Se han identificado diversos ligandos endógenos como metabolitos del triptófano, e incluso fitoquímicos como los flavonoides e indoles (Murray et al., 2014). También existen ligandos xenobióticos que se unen al AHR por ejemplo, los HAPs como BaP y 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, hidrocarburos aromáticos halogenados como dibenzofuranos, bifenilos y dioxinas como 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Nguyen & Bradfield, 2008).

La proteína de AHR está conformada por: 1) un dominio bHLH N-terminal que permite la unión con el DNA y con la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) y la

dimerización con el translocador nuclear de AHR (ARNT), 2) un dominio PAS A que también permite la dimerización con el ARNT, 3) un dominio PAS B que contiene el dominio de unión al ligando, y permite la unión con la proteína de interacción con AHR [Aip (también XAP2)] y con Hsp90, y 4) un dominio C-terminal del AHR de activación transcripcional (TAD) (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010).

Vía canónica del AHR

Una de las funciones del AHR es la activación de la transcripción de genes que codifican enzimas del metabolismo de xenobióticos como los citocromos P450 1A1 (CYP1A1), CYP1B1, glutatión S-transferasas (GST), UDP-glucuronosil transferasa (UGT1A6), NAD(P)H dependiente de quinona oxidorreductasa-1 (NQO1), aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1), entre otras (Feng et al., 2013; Jackson et al., 2015). En ausencia de su ligando, el AHR se encuentra en el citoplasma formando un complejo con las proteínas Hsp90, Aip y p23, este complejo permite la estabilidad del AHR y evita su degradación. La vía se activa cuando el ligando se une a la proteína AHR en el citoplasma, esto provoca cambios conformacionales que exponen la señal de localización nuclear (NLS) y que permiten la disociación del complejo citoplasmático. Estos cambios permiten la translocación nuclear de AHR, y se forma el heterodímero AHR-ARNT, el cual se une a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE: 5'-GCGTG-3') presentes en los promotores de los genes blanco del AHR, lo que lleva a la activación transcripcional de los genes encargados de la detoxificación y metabolismo de xenobióticos, como los CYPs, y esta vía se denomina la vía canónica de AHR (Denison & Nagy, 2003).

Vías no canónicas del AHR

Adicionalmente, se sabe que el AHR, a través de vías no canónicas, está implicado en procesos de proliferación celular, diferenciación celular, inflamación y carcinogénesis (Dietrich & Kaina, 2010; Feng et al., 2013). Uno de los mecanismos a través de los cuales el AHR está implicado en los procesos carcinogénicos, es por medio de la activación de la transcripción de genes como JNK, Slug, VEGFA, etc (Murray et al., 2014).

Además, el AHR también puede regular de forma negativa la transcripción de genes mediante una regulación epigenética, como es la regulación de la expresión de genes mediante metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas, complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y organización nuclear (Felsenfeld & Groudine, 2003).

Se sabe que los componentes orgánicos de las PM_{2.5}, como los HAPs y las dioxinas, son capaces de regular negativamente al gen de *BRCA1* a través de regulación epigenética (Jeffy et al., 1999; Papoutsis et al., 2010; Romagnolo et al., 2015). En células de cáncer de mama se ha observado que la dioxina TCDD activa al AHR, el cual trasloca a núcleo, uniéndose al traslocador nuclear del AHR (ARNT), formando el heterodímero AHR/ARNT, este heterodímero interactúa con diversas proteínas, entre las que se encuentran proteínas modificadoras de la cromatina como las DNA metil transferasas (DNMT) DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, la Proteína 2 con dominio de unión a metil-CpG (MBD2) y la histona desacetilasa 1 (HDAC1) (Hockings et al., 2006), para así unirse a los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) presentes en el promotor del gen *BRCA1*, la unión de AHR/ARNT en XRE favorece la metilación del DNA, el enriquecimiento de H3K9me3, reducción de H4ac y de H3K9Ac en el promotor del gen, que en conjunto, regulan de forma negativa la transcripción de *BRCA1* (Papoutsis et al., 2010, 2012). Por otro lado, en un modelo *in vivo* de carcinogénesis de mama inducido por el HAPs 7,12-dimethylbenzo(a)anthraceno (DMBA), se reportó disminución en la expresión de *BRCA1*, derivado de la metilación de su promotor y se observó una mayor expresión y activación del AHR (Romagnolo et al., 2015), lo que sugiere la participación del AHR en la regulación de este gen.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una neoplasia de gran interés debido a que mundialmente ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad en las mujeres (GLOBOCAN, 2020).

Esta neoplasia es causada por una combinación de factores de riesgo genéticos, hormonales y ambientales (McPherson et al., 2000). Entre los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de cáncer de mama se encuentran la menarca

temprana, menopausia tardía, nuliparidad, edad del primer parto y periodo largo de lactancia (McPherson et al., 2000). Además, los factores de riesgo de historia familiar predisponen genéticamente al individuo a mutaciones, como es el caso de mutaciones en los genes de susceptibilidad de cáncer de mama (*BRCA1* y *BRCA2*), que se asocian con el inicio temprano de cáncer de mama hereditario (B. E. Henderson & Feigelson, 2000). Por otro lado, existen factores ambientales asociados al desarrollo de esta neoplasia, como son los relacionados al estilo de vida, como el alto índice de masa corporal (sobrepeso u obesidad), sedentarismo, dieta, alcohol y tabaco (Irigaray et al., 2007; Khan et al., 2010; McPherson et al., 2000). Además, existen factores asociados al entorno del individuo, esto es la exposición a contaminantes ambientales como solventes (Hansen, 1999), bisfenol A (Shafei et al., 2018), dioxinas (Warner et al., 2002), hidrocarburos aromáticos policíclicos (White et al., 2016) y metales como cadmio, antimonio y cobalto (Kresovich et al., 2019).

El 95% de los casos de cáncer de mama son adenocarcinomas y se derivan de las células epiteliales de la unidad lobulillar ductal terminal y su evolución histológica va desde la hiperplasia, hiperplasia con atipia, carcinoma *in situ*, hasta la invasión a través de la membrana basal del conducto (Makki, 2015).

Por un lado, como se muestra en la figura 2, el cáncer de mama se clasifica en subtipos histológicos y en subtipos moleculares. Los carcinomas *in situ* son aquellos con una proliferación intraductal de células epiteliales que se limita a los conductos y lóbulos, y los carcinomas invasivos son aquellos cuyas células neoplásicas han penetrado a través de la pared del conducto hacia el estroma de la mama (Harbeck et al., 2019; Makki, 2015). Además, el cáncer de mama se puede clasificar en subtipos moleculares, en función de los perfiles de expresión génica, en luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo (Harbeck et al., 2019; Perou et al., 2000). La clasificación del cáncer de mama con base en las características moleculares e histológicas tienen importantes implicaciones para el tratamiento de la enfermedad permitiendo una medicina personalizada con el uso de terapias blanco, por ejemplo, la terapia con 4-hidroxitamoxifeno es empleada en pacientes con cáncer de mama luminal, mientras que la terapia con trastuzumab es utilizada en pacientes con cáncer de mama HER+.

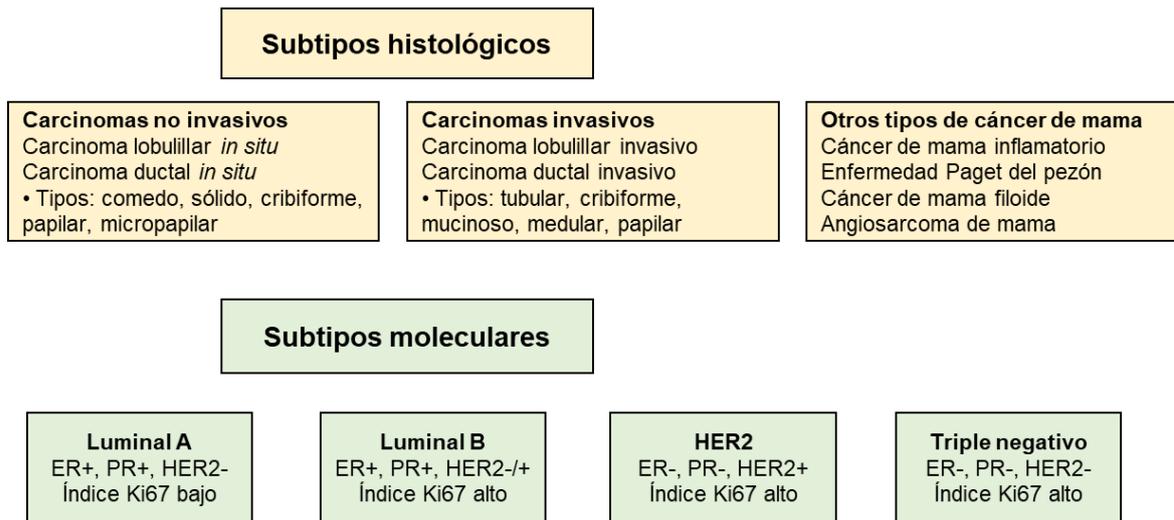


Figura 2. Clasificación histológica y molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama puede clasificarse con base en las características histológicas y moleculares del tumor. De acuerdo con su histología, son clasificados en carcinomas no invasivos y carcinomas invasivos, y en otros tipos de cáncer de mama menos comunes. Los análisis moleculares han definido al menos cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama, dos tipos luminales (luminal A y luminal B), el tipo enriquecido en HER2 y el tipo triple negativo.

Por otro lado, de manera general el cáncer de mama puede ser clasificado en cáncer hereditario y cáncer esporádico, dependiendo de los factores de riesgo predominantes en el desarrollo de la enfermedad. A nivel mundial, el cáncer de mama hereditario representa entre el 5 al 15 % de los casos de cáncer de mama, y este se asocia a mutaciones en los genes de *BRCA1* y *BRCA2*, principalmente, y en menor grado los genes *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C* y *TP53* (Apostolou & Fostira, 2013; Slavin et al., 2017; Venkatraman & Klenova, 2015).

Gen de *BRCA1*

BRCA1 es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 17 (17q21), en la figura 3 se muestra que el gen cuenta con 24 exones que codifican para una proteína de 1863 aminoácidos (Miki et al., 1994), y participa en la reparación de DNA por recombinación homóloga, arresto del ciclo celular y en la ubiquitinación de proteínas como CtIP (Huen et al., 2010; Wu et al., 2008).

La proteína *BRCA1* contiene dos dominios funcionales de gran importancia: en el extremo amino terminal presenta el dominio RING que permite la formación de un heterodímero con la proteína *BARD1*, el dominio carboxilo terminal *BRCT*

interactúa con diversas proteínas como BRCA2, CtIP, Abraxas, entre otras (B. R. Henderson, 2012).

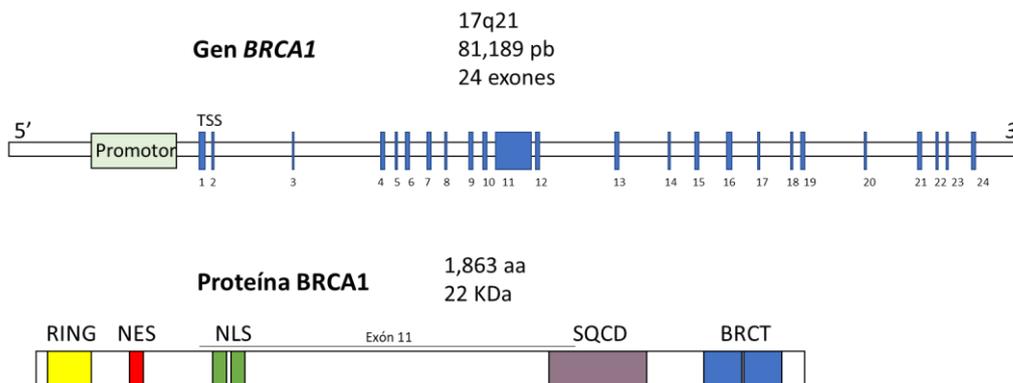


Figura 3. BRCA1: gen y proteína

El gen *BRCA1* está localizado en el cromosoma 17 (17q21), su tamaño es de 81,189 pb y cuenta con 24 exones que codifican para una proteína de 1,863 aminoácidos, la proteína contiene un dominio amino terminal RING, y un dominio carboxilo terminal BRCT, cuenta con una señal de exportación nuclear NES y señal localización nuclear NLS, también contiene el dominio de serina y treonina (SQCD) de sitios de fosforilación.

Si bien, las mutaciones en *BRCA1* juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama hereditario, el gen de *BRCA1* también puede participar en el desarrollo de cáncer de mama esporádico, esto se debe a que este gen puede ser regulado epigenéticamente, lo que lleva a una disminución en los niveles de la proteína de BRCA1, sin que exista una mutación en su gen (Catteau & Morris, 2002).

Asociación de las PM con el cáncer de mama

Debido a que el cáncer de mama hereditario explica solo una pequeña parte del porcentaje de esta neoplasia, existe el interés de comprender mejor el papel de los factores ambientales en el riesgo de desarrollo del cáncer de mama.

Diversos estudios demuestran que las PM_{2.5} y UFP inhaladas pueden llegar a órganos extrapulmonares como hígado, riñón y bazo (Li et al., 2019; Shimada et al., 2006; X. Zhang et al., 2018), sin embargo no existe evidencia que demuestre que las PM lleguen directamente al tejido mamario. No obstante, se sabe que las PM al ingresar al tracto respiratorio experimentan disgregación en partículas más pequeñas y se pueden liberar compuestos individuales, como compuestos lipofílicos, que tendrían mayor oportunidad de llegar a órganos extrapulmonares (Kreyling et al., 2013). Se ha propuesto que sustancias lipofílicas pueden migrar al tejido adiposo de la mama, en donde pueden metabolizarse *in situ* y

posteriormente excretarse a los sistemas ductales donde estarán en contacto con el parénquima mamario durante el tiempo suficiente que permita el desarrollo de cáncer (Labrèche & Goldberg, 1997). Por lo anterior, los HAPs son los componentes de la contaminación del aire que más se han relacionado con el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama (Rodgers et al., 2018) y debido a su carácter lipofílico, los HAPs pueden unirse a lipoproteínas plasmáticas en el torrente sanguíneo (Plant et al., 1987) y de esta manera ser transportados hasta órganos con alto contenido graso, donde son capaces de entrar a las células por difusión a través de las membranas celulares y depositarse en las vesículas lipídicas dentro de la célula (Penn et al., 2005), y se ha demostrado que los HAPs se almacenan y concentran en el tejido adiposo de la mama debido a su carácter lipofílico, lo que puede favorecer el desarrollo de cáncer en el tejido mamario (Brody et al., 2007; Morris & Seifter, 1992; Rudel et al., 2007). Las muestras de leche materna se han establecido como un indicador preciso del estado de la glándula mamaria (Quezada & Vafai, 2014), y estudios demuestran la presencia de HAPs y sus metabolitos en muestras de leche materna (Oliveira et al., 2020) e incluso se han encontrado niveles altos de PAHs en muestras de leche materna provenientes de mujeres con obesidad (Acharya et al., 2019). Sin embargo, no se sabe si las PM logran llegar al tejido de la mama o qué componentes son los que llegan.

Actualmente, existe evidencia epidemiológica que demuestra que las PM_{2.5} están asociadas al desarrollo de cáncer de mama, sin embargo, se desconocen los mecanismos por lo que las PM_{2.5} favorecen el desarrollo de cáncer de mama. En 1996 Lewis-Michl y colaboradores reportaron un riesgo significativo de desarrollar cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas que estaban expuestas a emisiones de industrias químicas (Lewis-Michl et al., 1996). Posteriormente, se demostró que la exposición a altos niveles de TSP (mayores a 140 µg/m³) incrementaba 2.42 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas comparado con mujeres expuestas a niveles bajos de TSP (menores a 84 µg/m³) (Bonner et al., 2005). Además, la exposición a altas concentraciones de emisiones del tráfico vehicular, principalmente HAPs, está asociada con un incremento de 2.5 y 2.57 veces en el riesgo a desarrollar

cáncer de mama en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas, respectivamente (Nie et al., 2007).

También se ha demostrado que el riesgo a desarrollar cáncer de mama es mayor en mujeres que viven en zonas urbanas donde la contaminación del aire es alta, por ejemplo, Parikh y colaboradores demostraron que existe una asociación con las altas emisiones de HAPs y PM_{2.5} con la incidencia de cáncer de mama en el área metropolitana de Atlanta, en contraste con la zona rural de Georgia (Parikh & Wei, 2016). Por otro lado, diversos estudios reportan un incremento en el riesgo de mortalidad por cáncer de mama asociado al incremento en la exposición a HAPs, PM_{2.5} y PM₁₀ (Hu et al., 2013; Hung, 2012; Hwang et al., 2020; Tagliabue et al., 2016), y en un estudio de meta análisis, en el que se analizaron 14 trabajos publicados, se encontró que por cada incremento de 10 µg/m³ de PM_{2.5} y PM₁₀ se incrementaba un 17% y 11% el riesgo de mortalidad por cáncer de mama, respectivamente (Z. Zhang et al., 2019).

En estudios *in vitro* se ha reportado que la exposición a extractos orgánicos de TSP induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño al DNA en células MCF7 (S.-T. Chen et al., 2013), y que la exposición a la fracción soluble de las PM_{2.5} (enriquecida con metales de cadmio, cobre, plomo, zinc y cromo) incrementa la proliferación celular, la capacidad de migración, y los niveles de proteínas involucradas en la transición epitelio mesénquima en células MDA-MB-231 (Cheng et al., 2021). Diversos estudios han mostrado la inducción de los CYP1A1 y CYP1B1 en células MCF7 y MCF10A expuestas a TSP y partículas de escape de diésel (DEPs) (S.-T. Chen et al., 2013; Courter et al., 2007; Mahadevan et al., 2005), estos estudios sugieren que las PM activan el AHR, el cual podría jugar un papel importante en regular de forma negativa genes como el de *BRCA1* y de esta forma favorecer el desarrollo de cáncer de mama.

La línea celular MCF7 es una de las líneas celulares de cáncer de mama más utilizadas en la investigación del cáncer (Comşa et al., 2015) así como en el estudio toxicológico de las PM (Chen et al., 2013; Mahadevan et al., 2005; Matsumoto et al., 2005; Okamura et al., 2002; Ueng et al., 2004). Esta línea celular se estableció en 1973 en la Fundación de Cáncer de Michigan (de ahí el nombre por sus siglas en inglés, Michigan Cancer Foundation), las células

proviene del derrame pleural de una mujer con enfermedad metastásica con un origen primario de adenocarcinoma mamario, esta línea celular cuenta con características de un epitelio mamario diferenciado (Soule et al., 1973) y ha sido clasificada molecularmente dentro del tipo Luminal A, ya que expresa las proteínas ER y PR (Subik et al., 2010), y cuenta con el gen de BRCA1 sin alteraciones (Elstrodt et al., 2006).

A pesar de que las células fueron aisladas de una metástasis, la línea celular no es invasiva y representa un modelo de estadio temprano, esto por su estado funcional del ER y por su dependencia de estrógenos para el crecimiento, y también tiene la ventaja de que la cantidad mínima de estrógeno presente en el suero es suficiente para asegurar el crecimiento celular. Por lo anterior, esta línea celular facilita el estudio para los procesos carcinogénicos en otros subtipos moleculares del cáncer de mama, incluido el cáncer de mama ER- y el triple negativo (Comşa et al., 2015).

Un punto importante a considerar para elegir las células MCF7 como modelo de estudio es que la expresión de BRCA1 tiene una relación estrecha con la señalización del receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), esto es, que la estimulación con estrógenos aumenta la expresión de BRCA1 a nivel de RNA y proteína y, a la inversa, BRCA1 induce la expresión del mRNA de $ER\alpha$, y actúa como un regulador negativo de la señalización de $ER\alpha$ (Gorski et al., 2009). Además, se ha reportado que la exposición a BaP reprime la transcripción de *BRCA1* en células de cáncer de mama ER+, pero no genera cambios en células ER- (Jeffy et al., 2002).

Justificación

Se ha encontrado una asociación entre la exposición a $PM_{2.5}$ con el desarrollo de cáncer de mama, sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares inducidos por las PM que puedan favorecer el desarrollo de esta neoplasia. Los HAPs representan el 88% de las $PM_{2.5}$ y son compuestos lipofílicos, lo que les permite unirse a lipoproteínas plasmáticas y almacenarse y concentrarse en el tejido adiposo, lo que puede inducir daño y favorecer el desarrollo de cáncer en el tejido mamario.

Los HAPs juegan un papel importante a través de la formación de aductos voluminosos en el DNA. Además, se sabe que los HAPs pueden regular de manera negativa la expresión del gen *BRCA1*, lo que podría alterar la respuesta de reparación del DNA y contribuir al desarrollo del cáncer. Debido a que existe el interés de comprender mejor el papel de los factores ambientales en el riesgo de desarrollo del cáncer de mama, el estudio del impacto de las $PM_{2.5}$ en el desarrollo de cáncer de mama será de gran relevancia, ya que nos permitirá entender el potencial carcinogénico de las $PM_{2.5}$.

Pregunta de investigación

¿Disminuirán los niveles de expresión de *BRCA1* a través del AHR en células de cáncer de mama expuestas a $PM_{2.5}$?

Hipótesis

La exposición a $PM_{2.5}$ disminuirá los niveles de expresión del gen *BRCA1*, a través del AHR, en células de cáncer de mama MCF7.

Objetivo general

- Evaluar los cambios en los niveles de expresión del gen *BRCA1*, vía AHR en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a PM_{2.5}.

Objetivos particulares

En células MCF7 expuestas a 10 µg/cm² de PM_{2.5} por 24 y 48 horas:

- Evaluar los niveles de la proteína AHR
- Evaluar los niveles del mRNA de BRCA1
- Evaluar los niveles de la proteína de BRCA1
- Analizar la participación del AHR en la regulación de BRCA1

Metodología

Colecta de PM_{2.5}

Se utilizaron PM_{2.5} colectadas en una zona residencial de la Ciudad de México utilizando un muestreador de grandes volúmenes con un flujo de 1.13 m³/min (Sierra Andersen, GA, USA). Las PM_{2.5} se colectaron en filtros de nitrocelulosa de 3.0 µm (Sartorius AG, Goettingen, Alemania), tres días por semana. Los filtros se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta el momento que se recuperaron las partículas. Para remover las partículas del filtro se utilizó un cepilló y con una hoja quirúrgica se recuperaron y se colocaron en viales de vidrio libres de endotoxina, enseguida los viales con las PM fueron almacenados en oscuridad a 4°C hasta su uso (Alfaro-Moreno et al., 2009).

Cultivo celular

Las células MCF7 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), esta línea celular proviene de un adenocarcinoma de mama esporádico, y molecularmente están clasificadas como “Luminal A”, receptor de estrógeno (ER) y progesterona (PR) positivos (Holliday & Speirs, 2011), además, la línea celular cuenta con el gen de *BRCA1* wild type, y su promotor no presenta metilación (Elstrodt et al., 2006).

Las células fueron cultivadas con medio Eagle modificado por Dulbecco's con mezcla de nutrientes F12: DMEM/12 (GIBCO, 11330-032) suplementado con 10% v/v de SFB (GIBCO, 16000-044) (medio suplementado) y fueron mantenidas en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C, siguiendo las recomendaciones de la ATCC.

Los experimentos se realizaron con células MCF7 de pases tempranos, las cuales se sembraron en placas de cultivo de 6 y 12 pozos (Costar, 3516 y 3513). Después de 24 h, previo a exponer las células a las partículas, las PM_{2.5} se prepararon de la siguiente manera: se pesaron y se esterilizaron por calor húmedo en autoclave durante 15 minutos a 121°C, 15 psi. Posteriormente, se suspendieron en medio suplementado (1 mg/mL) y se mezclaron en vortex a baja velocidad hasta su homogenización. Las células fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM_{2.5} y a 1µM de BaP (el cual fue utilizado como control positivo de la activación del AHR).

Transfección de siRNAs

Para determinar la participación del AHR en los efectos inducidos por las partículas, se realizó la transfección con siRNAs dirigidos al mensajero del gen *AHR*. Para ello, se sembraron células MCF7 en placas de cultivo de 6 y 12 pozos, a una confluencia del 70% con medio completo por 24 horas. Después de las 24 h se realizó la transfección del siRNA, utilizando el kit Xfect RNA Transfection Reagent (Clontech, 631450), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prepararon dos mezclas, la primera consistió en la mezcla del siRNA y el amortiguador de reacción Xfect, con una concentración final del siRNA de 20 nM; por otro lado, la segunda mezcla fue el polímero de transfección de RNA Xfect y amortiguador de reacción Xfect, ambos tubos se mezclaron con un vórtex y la mezcla del polímero de transfección se transfirió al tubo con siRNA. La mezcla nueva se agitó con un vórtex y se incubó durante 10 minutos para permitir que los complejos de nanopartículas se formen. Mientras tanto, se cambió el medio en cada pozo teniendo un volumen final de 500 o 1000 μL (placa de 12 y 6 pozos, respectivamente). Se adicionaron lentamente 50 o 100 μL (placa de 12 y 6 pozos, respectivamente) de la solución con los complejos de nanopartículas al medio de cultivo, inmediatamente se movió suavemente la placa para mezclar los complejos. El cultivo fue incubado a 37°C durante 4 horas, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se procedió a la exposición a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{PM}_{2.5}$ y a 1 μM de BaP (el cual fue utilizado como control positivo de la activación del AHR). En paralelo y bajo las condiciones previamente mencionadas, se realizaron transfecciones con un siRNA que no tiene blanco molecular, denominado siRNA no target (siRNA CT), estas células fueron expuestas a $\text{PM}_{2.5}$ y BaP y para determinar la participación de AHR, los análisis de los resultados se hicieron entre siRNA CT versus el siRNA de AHR.

Extracción de proteína

Se sembraron células MCF7 (5x10⁵ células/pozo) en placas de cultivo de 6 pozos (Costar, 3516), 24 horas posteriores se transfectaron con el siRNA dirigido a AHR y 4 horas después las células fueron expuestas a $\text{PM}_{2.5}$.

Transcurrido el tiempo de incubación de los tratamientos previamente mencionados, las células fueron lavadas con PBS y la lisis celular se realizó

utilizando 150 μ L de amortiguador de lisis frío (20 mM Tris, 1% NP-40, and 150 mM NaCl, pH 8 con una mezcla de inhibidores de proteasas) en agitación durante 10 min a 4°C, y se colectaron las células en microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso. La cuantificación de proteínas se realizó con el método del ácido bicinonínico (Smith et al., 1985), utilizando una curva de albúmina sérica bovina de 1.25-10 μ g/ μ l, las muestras fueron leídas en un lector de placas a 570 nm (Tecan GENios Plus).

Western blot

Los niveles de las proteínas de AHR y de BRCA1 en células MCF7 expuestas a PM_{2.5} por 24 y 48 horas, se realizó mediante western blot. La electroforesis de las muestras fue realizada en un gel de poliacrilamida-SDS de gradientes del 6-10% (para BRCA1) y al 10% (para AHR), con 30 μ g de proteína por tratamiento, el corrimiento electroforético se hizo por aproximadamente 90 minutos a 170 V. Posteriormente, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.45 μ m (Millipore, IPVH00010) utilizando una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Trans-Blot Turbo) con amortiguador de transferencia (Tris 2mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3) durante 30 min a 25V. Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, las membranas se bloquearon por 1 hora con 5% de BSA, 5% leche descremada en TBS-Tween-20 al 0.2% para la proteína de AHR, y con leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 al 0.2% para BRCA1. Posteriormente, se incubaron los anticuerpos anti-AHR (Santa Cruz, sc-5579) dilución 1:1000, anti-BRCA1 (Millipore, 07-434) dilución 1:1000 utilizando amortiguador de bloqueo, durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron lavados de 10 min con TBS-Tween-20 al 0.2% para posteriormente incubar las membranas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Amersham, NA934V) para AHR y BRCA1 a una dilución de 1:3000, y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham, NA931V) 1:5000; todos en amortiguador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Nuevamente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos. Como control de carga se utilizó la proteína β -actina, por lo que las membranas se incubaron con el anticuerpo anti- β -actina (anticuerpo

monoclonal producido y donado por el Dr. Manuel Hernández, Cinvestav) 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. La inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia con el kit de detección del sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano (HRP) (Millipore, WBKLS0100). Las imágenes fueron visualizadas y capturadas con el equipo ChemiDoc-It®^{TS3} Imager UVP. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageJ.

Extracción de RNA

Una vez transcurrido el tiempo de exposición, las células fueron lavadas con PBS y se extrajo el RNA total utilizando trizol (Ambion, 15596026) de la siguiente manera: Las células fueron lisadas directamente en la placa añadiendo 1 mL de trizol, el lisado se recuperó en un microtubo de 2 mL, para la separación de la fase acuosa y de la fase orgánica se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de trizol utilizado, las muestras fueron agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 3 min, pasado el tiempo se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un nuevo microtubo y fue precipitado el RNA con 500 µL de isopropanol por cada mL de trizol utilizado, durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 15 min a 13,000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el botón de RNA obtenido fue lavado con 1 mL de etanol al 75% por cada mL de trizol utilizado y se centrifugó a 7,000 rpm durante 5 min a 4°C, nuevamente, se retiró el sobrenadante para posteriormente secar el botón de RNA, para disolver el botón en agua libre de RNAsas. Las muestras de RNA se cuantificaron utilizando NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), además se evaluó su pureza con el mismo aparato. De manera cualitativa, se corroboró la integridad de las muestras de RNA cargando 500 ng de RNA total por pozo en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador Tris-borato-EDTA (TBE) teñido con Gel Red. La imagen fue visualizada y capturada con el equipo ChemiDoc-It®^{TS3} Imager UVP

Evaluación de los niveles del mensajero de BRCA mediante qRT-PCR

La evaluación de los niveles del mensajero de BRCA1 se realizó por q-RT-PCR, utilizando el kit FastGene® IC Green One Step Mix (Nippon genetics, LS4301HR) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparó a un volumen final por reacción de 20 µL, la combinación de 5.4 µL de ddH₂O, 10 µL de 2X

FastGene IC Green One Step Mix, 1 μ L de 20X FastGene Scriptase, 0.8 μ L de oligo sentido 10 μ M, y 0.8 μ L de oligo antisentido y 2 μ L de templado de RNA (10ng/ μ L). Cada muestra se analizó por triplicado.

Los oligos para evaluar BRCA1 y GAPDH fueron diseñados con una temperatura de alineación de 59 y 60° C, respectivamente. Las secuencias se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados.

| | |
|-------|---|
| BRCA1 | Forward 5'- TGGACCTTGGTGGTTTCTTC-3' Reverse 5'- CGGGAGGAAAATGGGTAGTT -3' |
| GAPDH | Forward 5'-GCAAATTCCATGGCACCGTC-3' Reverse 5'-AGCATCGCCCCACTTGATTT-3' |

Para la realización de la PCR cuantitativa, se utilizó el termociclador StepOne plus (Applied biosystems, 4376600) siguiendo el programa descrito a continuación:

- Transcripción reversa: 1 ciclo de 45°C por 10 minutos.
- Desnaturalización inicial: 1 ciclo de 95°C por 2 minutos.
- Amplificación: 40 ciclos con una etapa de 95°C por 5 segundos y una segunda etapa de 59-60°C por 30 segundos.

La expresión del mRNA de BRCA1 fue calculada por el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta}$), por lo que se utilizó la amplificación del gen endógeno GAPDH como parámetro para la normalización de los resultados.

Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y el análisis estadístico se realizó por análisis de varianza de una vía seguido por múltiples comparaciones por Bonferroni con el software GraphPad PRISM® versión 5.01. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Resultados

Las PM_{2.5} aumentaron los niveles de la proteína AHR

Para determinar la activación de AHR por la exposición a PM_{2.5} se evaluaron los niveles de proteína de AHR en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a 10 µg/cm² de PM_{2.5} durante 24 y 48 horas, y se utilizó 1 µM de BaP como control positivo de la activación del AHR.

A las 24 h, las PM_{2.5} aumentaron 27% los niveles de proteína del AHR ($***p < 0.0005$ vs siRNA CT) (Figura 4a). Cuando las células fueron pretratadas con el siRNA contra AHR y expuestas a PM_{2.5}, se observó una prevención del 90% en los niveles de proteína del AHR ($***p < 0.0005$ vs siRNA CT + PM_{2.5}). En las células expuestas a BaP durante 24 horas se observó un aumento del 21% en los niveles de proteína del AHR ($**p < 0.005$ vs siRNA CT), y se previno el aumento en un 95% ($***p < 0.0005$ vs siRNA CT + BaP) cuando las células fueron transfectadas con siRNA (Figura 4a). En las células expuestas durante 48 horas a PM_{2.5} se observó un comportamiento similar (Figura 4b), con un incremento del 38% ($*p < 0.05$ vs siRNA CT) de los niveles de proteína del AHR y en las células expuestas a BaP por 48 h se observó un incremento del 40% de la proteína del AHR ($**p < 0.005$ vs siRNA CT) y cuando las células fueron transfectadas con siRNA AHR, los niveles de proteína de AHR fueron prevenidos un 90% ($***p < 0.0005$ vs siRNA CT).

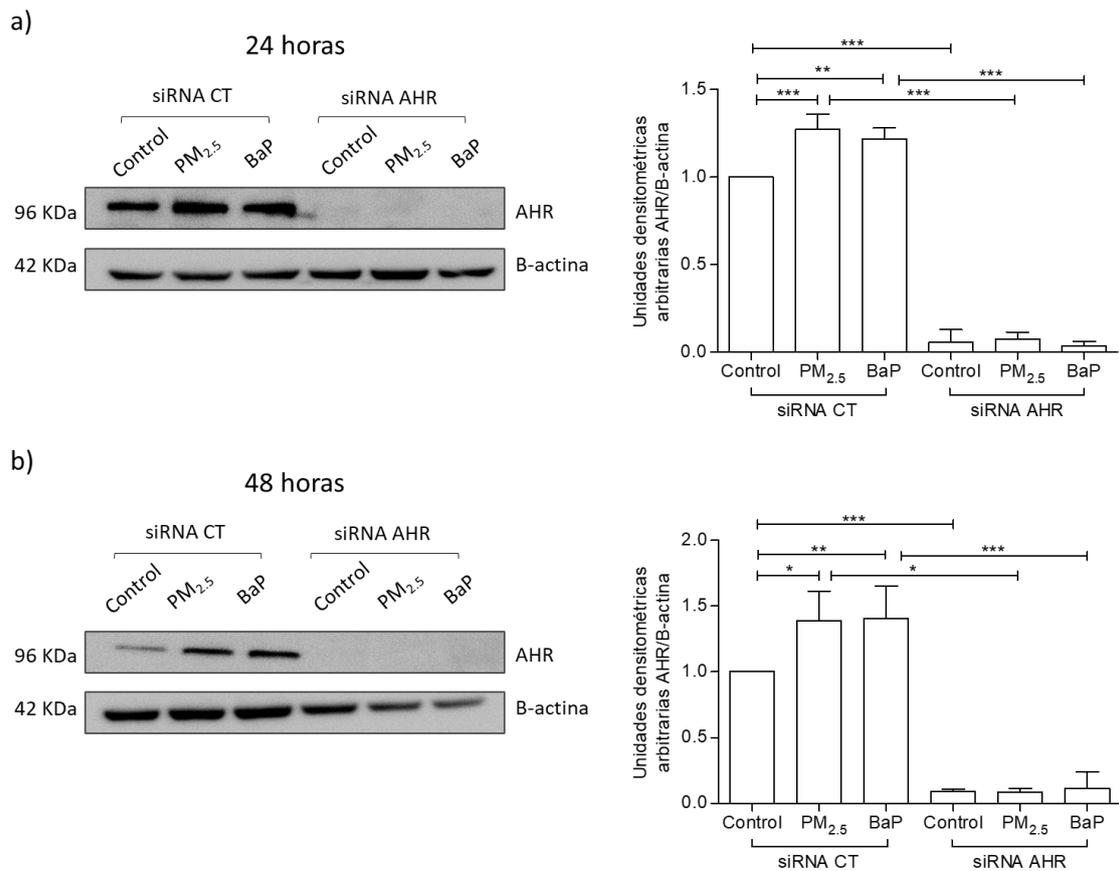


Figura 4. Las PM_{2.5} aumentaron los niveles de proteína del AHR en células MCF7.

Las células MCF7 transfectadas con 20 nM de siRNA CT o con siRNA dirigido a AHR (siRNA AHR) fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM_{2.5} y 1 µM de BaP durante 24 o 48 h, y mediante western blot se evaluaron los niveles de proteína del AHR por 24 h (a) y 48 horas (b). Los cambios en los niveles del AHR se realizaron mediante análisis densitométrico, utilizando β-actina como control de carga. n=3 (*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.005).

Las PM_{2.5} disminuyeron los niveles de mRNA y proteína de BRCA1, a través de AHR

Se evaluaron los niveles de RNA mensajero y proteína de BRCA1 en células MCF7 expuestas a 10 µg/cm² de PM_{2.5} por 24 horas y 48 horas (Figura 5). Para determinar la participación del AHR en la regulación del mRNA y la proteína de BRCA1, las células fueron pre-tratadas con siRNA AHR para la inhibición de la expresión de AHR como se menciona en métodos.

En las células expuestas a PM_{2.5} durante 24 horas, los niveles del mRNA de *BRCA1* disminuyeron un 20% con respecto a las células siRNA CT (*p<0.05 vs siRNA CT); y en las células que fueron pre-tratadas con siRNA de AHR y expuestas a PM_{2.5} se observó una prevención de la disminución del mRNA de *BRCA1* inducida por las PM_{2.5} (+p<0.05 vs siRNA CT PM_{2.5}). En las células expuestas a BaP durante 24 horas se observó una disminución del 27% de la expresión del mRNA de *BRCA1* (**p<0.005 vs siRNA CT), y el siRNA de AHR previno la inhibición inducida por BaP (#p<0.05 vs siRNA CT BaP) (Figura 5a).

En células expuestas a PM_{2.5} y BaP durante 48 horas, los cambios inducidos muestran que el mRNA de *BRCA1* disminuyó en células expuestas tanto a PM_{2.5} como a BaP y el siRNA de AHR previenen esta disminución, sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

Se evaluaron los niveles de la proteína de BRCA1 para determinar si los cambios en el mRNA tienen impacto en la proteína; asimismo, las células fueron pre-tratadas con siRNA AHR con el fin de determinar si los cambios de la proteína de BRCA1 están relacionados con la actividad del AHR.

En las células expuestas a PM_{2.5} y BaP durante 24 horas no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de la proteína de BRCA1 (Figura 4c y e). Interesantemente, en las células expuestas a PM_{2.5} durante 48 horas se observó una disminución del 27% en la proteína de BRCA1 (**p<0.005 vs SiRNA CT) (Figura 5d y f), mientras que en las células pretratadas con siRNA AHR y expuestas a PM_{2.5} se observó una prevención en la disminución de la proteína de BRCA1 inducida por las PM_{2.5} (*p<0.05 vs siRNA CT PM_{2.5}, Figura 5b y d). En las células expuestas a BaP durante 48 horas se observó una

disminución del 21% en la proteína BRCA1 ($+p<0.05$ vs siRNA CT, Figura 5d y f).

Los resultados muestran que, a las 24 horas de exposición, las $PM_{2.5}$ reducen los niveles de mRNA de *BRCA1*, pero el efecto en la disminución de los niveles de la proteína de BRCA1 se observa hasta las 48 horas de exposición, y en ambos casos se observa la participación de AHR en los efectos inducidos por las $PM_{2.5}$. Esto sugiere que existe una regulación transcripcional del gen de *BRCA1* y que posiblemente sea a través del AHR.

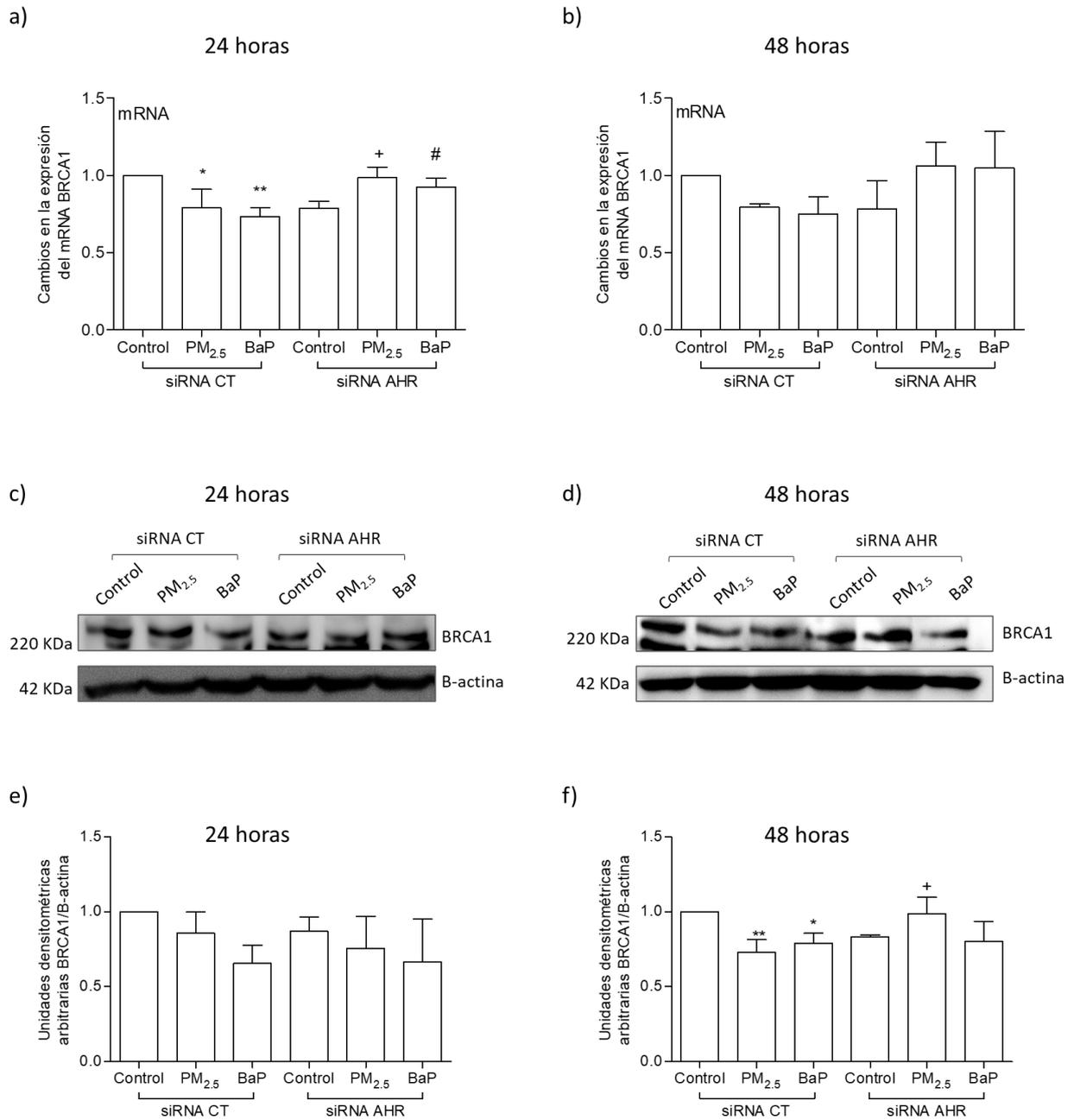


Figura 5. Las PM_{2.5} disminuyeron los niveles de mRNA y proteína de BRCA1 a través del AHR. Las células MCF7 transfectadas con 20 nM de siRNA CT o con siRNA AHR fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM_{2.5} y 1 µM de BaP. Se evaluaron los niveles del mRNA de BRCA1 mediante q-RT-PCR en células expuestas durante 24 horas (a) y 48 horas (b) n=3 (*p<0.05 vs siRNA CT, **p<0.005 vs siRNA CT, +p<0.05 vs siRNA CT PM_{2.5}, #p<0.05 vs siRNA CT BaP). Se evaluaron los niveles de la proteína BRCA1 mediante western blot en células expuestas durante 24 horas (c) y 48 horas (d). Los cambios en los niveles de BRCA1 se calcularon mediante análisis densitométrico utilizando β-actina como control de carga para 24 horas (e) y 48 horas (f). n=3 (**p<0.005 vs siRNA CT, *p<0.05 vs siRNA CT, +p<0.05 vs siRNA CT PM_{2.5}).

Discusión

La exposición a $PM_{2.5}$ se ha considerado un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama, y alteraciones el gen de *BRCA1* están relacionadas con el desarrollo de esta neoplasia. En este trabajo evaluamos si las $PM_{2.5}$ regulan la expresión del gen de *BRCA1* a través de la vía del AHR; y encontramos que las $PM_{2.5}$ inducen al AHR y disminuyen tanto los niveles del mRNA como de la proteína de *BRCA1*, además, en células *knockdown* para AHR (mediante el uso de siRNA) se previene la disminución tanto del mRNA y como de la proteína de *BRCA1*. Estos resultados sugieren que existe una regulación transcripcional del gen de *BRCA1* mediada por el receptor AHR.

En las mujeres, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer (GLOBOCAN, 2020), y se ha demostrado que las $PM_{2.5}$ son un factor de riesgo en el desarrollo de esta neoplasia. El cáncer es una enfermedad multifactorial y entre los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama se encuentran los intrínsecos de la mujer, los relacionados con el estilo de vida como la exposición a contaminantes ambientales, y los factores genéticos como las mutaciones en el gen de *BRCA1*. Mutaciones en este gen son un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama en las mujeres con un 65% de riesgo a desarrollarlo a los 70 años, y con mayor riesgo de mortalidad en comparación del cáncer de mama esporádico (Huszno et al., 2019). Además, hasta el 75% de los cánceres de mama con *BRCA1* mutado son del tipo invasivo ductal y un 66-100% son del tipo triple negativo, de alto grado histológico (grado III), y con mal pronóstico (Lee et al., 2020). Por otro lado, se ha reportado la disminución en la expresión de *BRCA1* en individuos con cáncer de mama, sin que se establezcan mutaciones en el gen, y en estos pacientes se encontró que el gen estaba silenciado a través de la metilación del promotor de *BRCA1* (Niwa et al., 2000; Rice et al., 2000). Como se ha mencionado, existen factores ambientales asociados al desarrollo esporádico del cáncer de mama, y entre ellos está la exposición a contaminantes ambientales como: solventes (Hansen, 1999), bisfenol A (Shafei et al., 2018), metales como cadmio, antimonio y cobalto (Kresovich et al., 2019), dioxinas (Warner et al., 2002) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (White et al., 2016).

Las PM_{2.5} son consideradas un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, y se ha descrito que este potencial podría estar relacionado con el contenido de HAPs (Hu et al., 2013; Hung, 2012; Tagliabue et al., 2016). Las PM_{2.5} cuentan con hasta un 88% de los HAPs atmosféricos, además los HAPs carcinógenos pueden representar hasta el 47% de las concentraciones totales de HAPs en el PM_{2.5} (Hassanvand et al., 2015). La Ciudad de México presenta altos niveles de PM_{2.5} anualmente, rebasando los límites permisibles por 24 horas (45 µg/m³) en el 9% de los días del año (32 días), es importante mencionar que la “NOM-025-SSA1-2014”, establece que el valor límite permisible no debe rebasarse ni una sola vez en un año (INECC, 2019; SEDEMA, 2020). Datos reportados sobre el contenido de HAPs muestran que las PM_{2.5} de la Ciudad de México contienen benzo(ghi)perileno el cual es el más abundante de los HAPs, seguido del criseno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno, benzo[k]fluoranteno y BaP (Amador-Muñoz et al., 2011), y se sabe que estos HAPs son ligandos del AHR, activando la vía canónica del receptor (Machala et al., 2001; Zaragoza-Ojeda et al., 2016). Además, el AHR, a través de su vía no canónica, puede regular de forma negativa y positiva diferentes genes, como el de *BRCA1* (Papoutsis et al., 2012; Romagnolo et al., 2015) por lo que decidimos en este trabajo evaluar si las PM_{2.5} alteran la expresión de *BRCA1* a través del AHR.

Los HAPs están asociados al desarrollo de cáncer debido a que algunos de ellos son promutágenos, por lo que deben de ser metabolizados para tener el potencial carcinogénico, y esto se da a través de la vía canónica de AHR, que conlleva a la formación de metabolitos diol epóxidos con propiedades electrofílicas que propician la formación de enlaces covalentes con el DNA, conocidos como aductos de HAPs-DNA o aductos voluminosos (Baird et al., 2005; Ewa & Danuta, 2017). La generación de aductos de HAPs-DNA es un evento iniciador importante en el proceso carcinogénico (Poirier, 2004). Además, la presencia de aductos HAPs-DNA en linfocitos se considera un biomarcador de exposición a estos compuestos (Perera & Weinstein, 1982; Taioli et al., 2007), así como un indicador de riesgo de cáncer de pulmón (Bak et al., 2006; Munnia et al., 2017), cáncer de vejiga (Veglia et al., 2003) y cáncer de mama (Agudo et al., 2017).

Las PM generan efectos a lo largo del tracto respiratorio y pueden tener consecuencias significativas tanto a nivel local como sistémico (Molina et al., 2020). Las PM induce inflamación sistémica (Badyda et al., 2020; Chciałowski et al., 2019), esto mediado en parte por la inflamación inducida por las PM en los pulmones, que hace que los macrófagos liberen especies reactivas de oxígeno (ROS), y en parte por metales de transición en la superficie de las PM capaces de generar ROS a través de reacciones tipo Fenton (Donaldson et al., 1997; X. Y. Li et al., 1997). Las PM_{2.5} inducen la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-1 β , lo que resulta en inflamación en las vías respiratorias y a nivel sistémico (R. Li et al., 2015). Se sabe que la inflamación sistémica influye en la configuración del tejido mamario y contribuye de manera importante en la progresión del cáncer de mama (Cruz & Balkwill, 2015).

Las células MCF7 provienen de un adenocarcinoma mamario (Soule et al., 1973) y pertenecen al tipo molecular Luminal A (ER+ y PR+) (Subik et al., 2010). Diversos estudios muestran que existe un “crosstalk” entre AHR y ER α en células de cáncer de mama ER α +, y se sugiere que la actividad de AHR en las células de cáncer de mama ER+ difiera de las células ER- (Ohtake et al., 2003; Safe et al., 2000; Wormke et al., 2000), por ejemplo, en células MCF7 la exposición a TCDD aumenta los niveles de mRNA de CYP1A1 y CYP1B1, en cambio en células MDA-MB-231 (ER-) expuestas a TCDD únicamente aumentan los niveles de mRNA de CYP1B1 (Döhr et al., 1995). El crosstalk entre AHR y ER α también se ha observado en células CL1-5 de adenocarcinoma de pulmón, en donde los niveles expresión de AHR y ER α , los niveles de estrógeno y el contexto del promotor determinan el desenlace genómico de la exposición a TCDD en las células (Kuo et al., 2013), esto es muy parecido a lo que se observa en las células de cáncer de mama. Es importante señalar que también existe un crosstalk entre BRCA1 y ER α , debido a que ER α modula la transcripción de *BRCA1* y es dependiente de la estimulación estrogénica en las células (Jeffy et al., 2005; Wang & Di, 2014), además se sabe que en células MCF7 el AHR modula el estado del promotor de *BRCA1* a través del ER α (Hockings et al., 2006), por esto consideramos importante utilizar una línea celular ER+ para el desarrollo de este trabajo, ya que si se utilizara una línea celular ER- o triple negativo no existiría el crosstalk entre BRCA1 y ER α , por lo que la expresión de BRCA1 no se vería

modificada tras la exposición a PM, puesto que la activación de la vía no canónica de AHR interfiere con la activación de la transcripción de BRCA1 dependiente de estradiol (Papoutsis et al., 2010) y por lo tanto, se necesita un estado ER+ para estudiar los mecanismos de silenciamiento de BRCA1.

La activación de la vía de AHR por PM previamente ha sido reportada en células MCF7 expuestas a partículas de referencia 1649a (provenientes de TSP urbanas, con un tamaño de hasta 100 μM), incrementando la expresión de CYP1B1 (Mahadevan et al., 2005), y se ha reportado la expresión de CYP1A1 en células MCF7 expuestas a extractos orgánicos de TSP de zonas urbanas (S.-T. Chen et al., 2013), también se reportó la expresión de CYP1B1 en células MCF10A expuestas a extractos orgánicos de partículas de referencia 1975 (partículas de escape de diesel, DEPs) (Courter et al., 2007). En células A549 expuestas a PM₁₀ de la Ciudad de México se reportó que las PM₁₀ incrementan la proteína CYP1B1, así como su actividad enzimática, demostrando que la exposición a PM₁₀ activa la vía canónica del AHR (Salcido-Neyoy et al., 2015). En este trabajo observamos que las PM_{2.5} aumentan los niveles de la proteína de AHR, lo que sugiere una activación de la vía canónica del AHR a través de los HAPs contenidos en las PM_{2.5}.

También determinamos que las PM_{2.5} disminuyen significativamente la expresión de *BRCA1* a las 24 horas y de su proteína a las 48 horas, lo que sugiere que la disminución en los niveles de la proteína de BRCA1 está relacionada con la regulación de la expresión del mRNA de BRCA1 en tiempos tempranos. Por otro lado, cuando abatimos el aumento de AHR con siRNA dirigido, tanto la disminución de los niveles del mensajero de *BRCA1* como de la proteína de BRCA1 inducidos por las PM_{2.5} se previnieron, por lo que estos resultados sugieren que el receptor AHR podría estar participando en la regulación negativa del BRCA1. Previamente se demostró que el BaP y el TCDD, dos ligandos del AHR, disminuyen tanto el mRNA como la proteína de BRCA1 (Jeffy et al., 1999; Papoutsis et al., 2010), y en ambos trabajos los autores proponen que la represión de BRCA1 es dependiente del AHR.

En este trabajo se decidió utilizar PM_{2.5} para evaluar los cambios en los niveles de expresión de *BRCA1*, sin embargo, no se descarta que se puedan encontrar efectos similares utilizando PM₁₀, debido a que las PM₁₀ también cuentan con

HAPs y se debe considerar que las PM₁₀ contienen a las PM_{2.5}: en la Ciudad de México, desde un 42% hasta 52% de la fracción PM₁₀ es PM_{2.5} (Vega et al., 2004). Si bien en este trabajo utilizamos PM_{2.5}, cabe destacar que previamente hemos reportado que en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a PM₁₀ colectadas en una zona residencial de la Ciudad de México durante 2007, se ven disminuidos los niveles de la proteína BRCA1 a las 24 horas de exposición (Tesis: Bautista-Ocampo Yanueh A, 2018). Se decidió trabajar con PM_{2.5} debido a la evidencia epidemiológica que demuestra la asociación de las PM_{2.5} y HAPs con el riesgo de desarrollar de cáncer de mama (Hu et al., 2013; Hung, 2012; Parikh & Wei, 2016; Tagliabue et al., 2016; Villeneuve et al., 2018) y que además el PM_{2.5} tiene mayor contenido de HAPs a diferencia del PM₁₀ (Hassanvand et al., 2015), no obstante, evidencia de los últimos años retoma la importancia de estudiar las PM₁₀ y demuestra la asociación de la exposición de PM₁₀ en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Cheng et al., 2020; Hwang et al., 2020; Zhang et al., 2019), por lo que consideramos que no se debe descartar la participación de PM₁₀ en la regulación de la expresión de *BRCA1*.

El promotor del gen de *BRCA1* cuenta con tres elementos de respuesta a xenobióticos (XRE: GCGTG) (Hockings et al., 2006), y el heterodímero AHR/ARNT se une a esta región, lo que favorece el reclutamiento de HDAC1, DNMT1, 3a y 3b, y estas proteínas reprimen la expresión de *BRCA1* (Papoutsis et al., 2012). Esta regulación se denomina regulación epigenética, debido a que, a pesar de no contar con mutaciones en el gen, la expresión de *BRCA1* se ve alterada.

La represión de *BRCA1* ya sea por mecanismos epigenéticos o por mutaciones puede favorecer el desarrollo de cáncer hereditario en mama y ovario (Ramus & Gayther, 2009), aunque se ha ligado mayormente al cáncer de mama (Turner et al., 2004). *BRCA1* es una proteína cuya función principal es mantener la integridad genómica, y en cáncer de mama hereditarios, este gen esta mutado, importantemente, entre 11 y 31% de los casos de cáncer de mama esporádico, *BRCA1* se encuentra ausente o disminuida (Niwa et al., 2000) y se sabe que esto se da porque su promotor se encuentra metilado, provocando la inhibición transcripcional del gen (Catteau et al., 1999; Rice et al., 1998; Rice et al., 2000).

Debido a que los factores ambientales se han asociado al desarrollo de cáncer de mama, existe el interés de comprender mejor el papel de las PM_{2.5} en el desarrollo de esta neoplasia. De manera importante, los HAPs y las dioxinas son los componentes de las PM_{2.5} que más se han relacionado con el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama (Rodgers et al., 2018) y son capaces de regular de forma negativa el gen de *BRCA1* por medio de la activación de AHR a través de su vía no canónica, a través de la metilación de su promotor, así como por la metilación de histonas y el reclutamiento de diversas proteínas modificadoras de la cromatina como DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, MBD2 y HDAC1 (Jeffy et al., 1999; Papoutsis et al., 2010; Romagnolo et al., 2015).

Con base en los resultados obtenidos en esta tesis, en donde observamos que las PM_{2.5} disminuyen tanto los niveles de expresión, como de la proteína de *BRCA1* vía AHR, es importante continuar profundizando sobre los posibles eventos inducidos por las PM_{2.5} que puedan estar participando en la regulación negativa de *BRCA1* o de otros genes, lo que permitiría entender potenciales mecanismos por los cuales las PM puedan estar participando en el desarrollo esporádico de cáncer de mama.

Es importante continuar investigando la participación de las alteraciones epigenéticas en el promotor de *BRCA1*, como metilación del DNA y modificaciones postraduccionales en histonas, y analizar la participación del AHR en la regulación epigenética del promotor de *BRCA1* mediada por la exposición a las PM_{2.5}.

Al utilizar un modelo *in vitro* se logró observar el efecto de las PM_{2.5} a nivel molecular, sin embargo se debe considerar la búsqueda de estrategias que permitan extrapolar los resultados en pacientes con cáncer de mama: Por un lado, un modelo *in vivo* nos permitiría dilucidar si la exposición a PM_{2.5} es un factor de riesgo importante para el desarrollo de tumores en mama. Y por otro lado, en pacientes con cáncer de mama, estudiando la exposición a PM_{2.5} que tuvieron durante su historia de vida, así como analizando muestras del tejido tumoral en busca de alteraciones en la regulación de *BRCA1*, y buscando una huella molecular asociada a exposición ambiental, específicamente de partículas.

La evidencia científica, principalmente epidemiológica, que demuestra la asociación entre la contaminación del aire y el desarrollo de cáncer de mama va en aumento, sin embargo, aún no se han descrito los mecanismos moleculares por los cuales las PM favorecen el desarrollo del cáncer de mama, y lo más importante, todavía no se ha demostrado de manera contundente como es que las PM o sus componentes pueden alcanzar tejido mamario, por lo que aún quedan muchas áreas de conocimiento que se deben de seguir explorando en esta área. El presente trabajo contribuye en la evidencia para elucidar mecanismos mediante los cuales las PM_{2.5} podrían favorecer el desarrollo esporádico de cáncer de mama, orientado específicamente en la regulación del gen supresor tumoral *BRCA1*, a través de vías no canónicas del AHR. Por lo que considero importante darle continuidad a esta línea de investigación, que en un futuro junto con otras investigaciones permita la implementación de cambios en el estilo de vida y de un mejor control en la reducción de contaminantes atmosféricos, y en consecuencia se pueda mitigar la incidencia y mortalidad en pacientes con cáncer de mama.

Conclusiones

Las $PM_{2.5}$ disminuyen los niveles del mRNA y proteína de BRCA1. La inhibición del mensajero de AHR previene la disminución de los niveles de BRCA1, sugiriendo la participación de AHR de manera negativa en la regulación de BRCA1 en células de cáncer de mama. Esto se esquematiza en la figura 6.

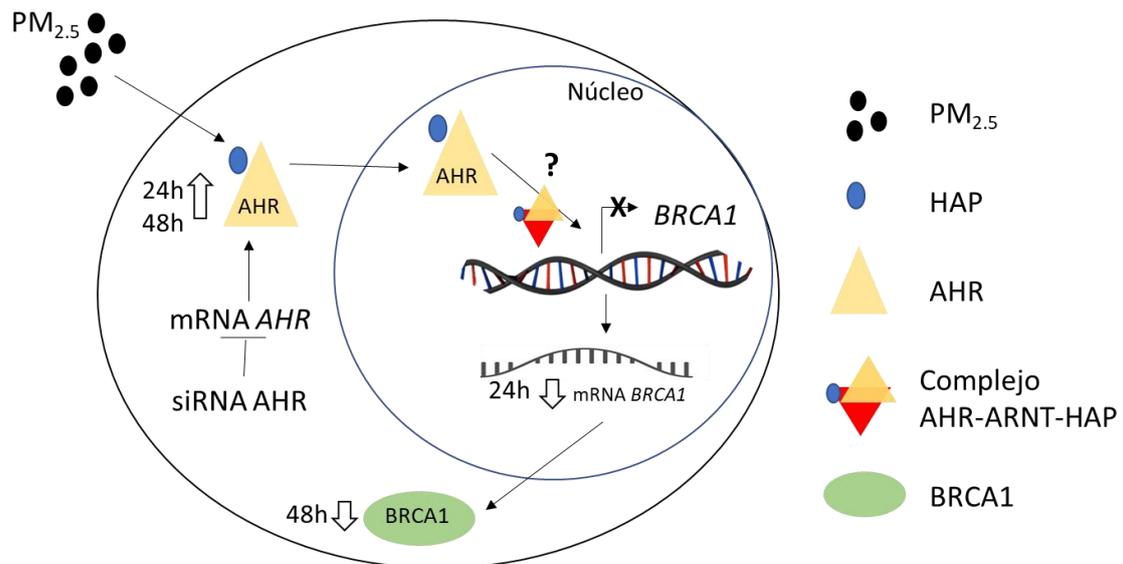


Figura 6. Las $PM_{2.5}$ disminuyeron los niveles de BRCA1 a través del AHR. Las $PM_{2.5}$ aumentan los niveles de proteína del AHR y sugiere la activación probable de la vía del AHR. Las $PM_{2.5}$ disminuyen la expresión del mRNA de *BRCA1* en células expuestas por 24 horas y disminuyen los niveles de proteína de BRCA1 hasta las 48 horas. Se propone la posible participación del AHR debido a que cuando se inhibe su expresión con siRNAs, se previene la disminución del mRNA y proteína de BRCA1 inducida por las $PM_{2.5}$, por lo que se sugiere que las $PM_{2.5}$ inducen la represión en la expresión de BRCA1 a través del AHR.

Perspectivas

- Evaluar la activación del AHR a través de la expresión de CYP1A1 y CYP1B1 en células MCF7 expuestas a PM_{2.5}.
- Determinar la unión del AHR en el promotor de *BRCA1* mediante inmunoprecipitación de cromatina, en células MCF7 expuestas a PM_{2.5}.
- Evaluar la metilación del promotor de *BRCA1* en células MCF7 expuestas a PM_{2.5}.
- Evaluar modificaciones postraduccionales en histonas asociadas al promotor de *BRCA1* en células MCF7 expuestas a PM_{2.5}.

Referencias bibliográficas

Abel, J., & Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry*, 391(11).

Agudo, A., Peluso, M., Munnia, A., Luján-Barroso, L., Barricarte, A., Amiano, P., Navarro, C., Sánchez, M.-J., Quirós, J. R., Ardanaz, E., Larrañaga, N., Tormo, M.-J., Chirlaque, M.-D., Rodríguez-Barranco, M., Sánchez-Cantalejo, E., Cellai, F., Bonet, C., Sala, N., & González, C. A. (2017). Aromatic DNA adducts and breast cancer risk: A case-cohort study within the EPIC-Spain. *Carcinogenesis*, 38(7), 691–698.

Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martínez, L., García-Cuellar, C., Nawrot, T. S., Vanaudenaerde, B., Hoet, P., Ramírez-López, P., Rosas, I., Nemery, B., & Osornio-Vargas, A. R. (2009). Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environmental Research*, 109(5), 528–535.

Apostolou, P., & Fostira, F. (2013). Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Research International*, 2013, 1–11.

Acharya, N., Gautam, B., Subbiah, S., Rogge, M. M., Anderson, T. A., & Gao, W. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in breast milk of obese vs normal women: Infant exposure and risk assessment. *The Science of the Total Environment*, 668, 658–667.

Assi, M. A., Hezmee, M. N. M., Haron, A. W., Sabri, M. Y., & Rajion, M. A. (2016). The detrimental effects of lead on human and animal health. *Veterinary World*, 9(6), 660–671.

Atkinson, R. W., Anderson, H. R., Sunyer, J., Ayres, J., Baccini, M., Vonk, J. M., Boumghar, A., Forastiere, F., Forsberg, B., Touloumi, G., Schwartz, J., & Katsouyanni, K. (2001). Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: Results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(10 Pt 1), 1860–1866.

Badyda, A., Chciałowski, A., Dąbrowiecki, P., Stańczyk, A., & Czechowski, P. O. (2020). Exposure to PM_{2.5} and PM_{2.5}-bound PAHs and its influence on respiratory tract function and cytokines concentrations changes in healthy adults. *European Respiratory Journal*, 56(suppl 64).

Baird, W. M., Hooven, L. A., & Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2–3), 106–114.

Bak, H., Autrup, H., Thomsen, B. L., Tjønneland, A., Overvad, K., Vogel, U., Raaschou-Nielsen, O., & Loft, S. (2006). Bulky DNA adducts as risk indicator of lung cancer in a Danish case-cohort study. *International Journal of Cancer*, 118(7), 1618–1622.

Barry, R., Chorley, R., Barry, R. G., & Chorley, T. late R. (2003). *Atmosphere, Weather and Climate*.

Bautista-Ocampo Yanueh A. (2018). El material particulado (PM10) altera los niveles de BRCA1 y CTCF vía AHR en células de cáncer de mama. Universidad Nacional Autónoma de México.

Bonner, M. R., Han, D., Nie, J., Rogerson, P., Vena, J. E., Muti, P., Trevisan, M., Edge, S. B., & Freudenheim, J. L. (2005). Breast cancer risk and exposure in early life to polycyclic aromatic hydrocarbons using total suspended particulates as a proxy measure. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(1), 53–60.

Bourdrel, T., Bind, M.-A., Béjot, Y., Morel, O., & Argacha, J.-F. (2017). Cardiovascular effects of air pollution. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 110(11), 634–642.

Brody, J. G., Moysich, K. B., Humblet, O., Attfield, K. R., Beehler, G. P., & Rudel, R. A. (2007). Environmental pollutants and breast cancer: Epidemiologic studies. *Cancer*, 109(12 Suppl), 2667–2711.

Brunekreef, B., & Forsberg, B. (2005). Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *The European Respiratory Journal*, 26(2), 309–318.

Cao, C., Jiang, W., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., Jiang, J., & Zhu, T. F. (2014). Inhalable Microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ Pollutants during a Severe Smog Event. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1499–1507.

Castano-Vinyals, G., Cantor, K. P., Malats, N., Tardón, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Rothman, N., Vermeulen, R., Silverman, D., Dosemeci, M., & Kogevinas, M. (2008). Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. *Occupational and Environmental Medicine*, 65(1), 56–60.

Catteau, A., & Morris, J. R. (2002). BRCA1 methylation: A significant role in tumour development? *Seminars in Cancer Biology*, 12(5), 359–371.

Chciałowski, A., Dąbrowiecki, P., Stańczył, A., Jahnz-Różyk, K., Czechowski, P. O., & Badyda, A. (2019). Fine particulate matter (PM_{2.5}) influence on respiratory tract function and systemic inflammation parameters in healthy adults. *European Respiratory Journal*, 54(suppl 63).

Chen, S.-T., Lin, C.-C., Liu, Y.-S., Lin, C., Hung, P.-T., Jao, C.-W., & Lin, P.-H. (2013). Airborne particulate collected from central Taiwan induces DNA strand breaks, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and estrogen-disrupting activity in human breast carcinoma cell lines. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 48(2), 173–181.

Chen, T.-M., Kuschner, W. G., Gokhale, J., & Shofer, S. (2007). Outdoor Air Pollution: Nitrogen Dioxide, Sulfur Dioxide, and Carbon Monoxide Health Effects. *The American Journal of the Medical Sciences*, 333(4), 249–256.

Chen, X., Zhang, L., Huang, J., Song, F., Zhang, L., Qian, Z., Trevathan, E., Mao, H., Han, B., Vaughn, M., Chen, K., Liu, Y., Chen, J., Zhao, B., Jiang, G., Gu, Q., Bai, Z., Dong, G., & Tang, N. (2016). Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: A 12-year cohort study in Northern China. *Science of The Total Environment*, 571, 855–861.

Cheng, I., Tseng, C., Wu, J., Yang, J., Conroy, S. M., Shariff-Marco, S., Li, L., Hertz, A., Gomez, S. L., Le Marchand, L., Whittemore, A. S., Stram, D. O., Ritz, B., & Wu, A. H. (2020). Association between ambient air pollution and breast cancer risk: The multiethnic cohort study. *International Journal of Cancer*, 146(3), 699–711.

Cheng, C.-W., Sheu, G.-T., Chou, J.-S., Wang, P.-H., Cheng, Y.-C., & Lai, C.-Y. (2021). Fine particulate matter PM_{2.5} generated by building demolition increases the malignancy of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Chemosphere*, 265, 129028.

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(Supplement C), 353–356.

Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.

Courter, L. A., Musafia-Jeknic, T., Fischer, K., Bildfell, R., Giovanini, J., Pereira, C., & Baird, W. M. (2007). Urban Dust Particulate Matter Alters PAH-Induced Carcinogenesis by Inhibition of CYP1A1 and CYP1B1. *Toxicological Sciences*, 95(1), 63–73.

Crusz, S. M., & Balkwill, F. R. (2015). Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(10), 584–596.

Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). ACTIVATION OF THE ARYL HYDROCARBON RECEPTOR BY STRUCTURALLY DIVERSE EXOGENOUS AND ENDOGENOUS CHEMICALS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 309–334.

Dietrich, C., & Kaina, B. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*, 31(8), 1319–1328.

Döhr, O., Vogel, C., & Abel, J. (1995). Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321(2), 405–412.

Donaldson, K., Brown, D. M., Mitchell, C., Dineva, M., Beswick, P. H., Gilmour, P., & MacNee, W. (1997). Free radical activity of PM₁₀: Iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environmental Health Perspectives*, 105(Suppl 5), 1285–1289.

Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J. H. A., Gorin, M., Wasielewski, M., Ouweland, A. van den, Merajver, S. D., Ethier, S. P., & Schutte, M. (2006). BRCA1 Mutation Analysis of 41 Human Breast Cancer Cell Lines Reveals Three New Deleterious Mutants. *Cancer Research*, 66(1), 41–45.

Ewa, B., & Danuta, M.-Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics*, 58(3), 321–330.

Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448–453.

Feng, S., Cao, Z., & Wang, X. (2013). Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1836(2), 197–210.

Ferreira, T., Forti, M., de Freitas, C., Nascimento, F., Junger, W., & Gouveia, N. (2016). Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10), 947.

GLOBOCAN. (2020). *Cancer Today subsection of the Global Cancer Observatory*. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/>

Gorski, J. J., Kennedy, R. D., Hosey, A. M., & Harkin, D. P. (2009). The Complex Relationship between BRCA1 and ER α in Hereditary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(5), 1514–1518.

Hansen, J. (1999). Breast cancer risk among relatively young women employed in solvent-using industries. *American Journal of Industrial Medicine*, 36(1), 43–47.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66.

Hassanvand, M. S., Naddafi, K., Faridi, S., Nabizadeh, R., Sowlat, M. H., Momeniha, F., Gholampour, A., Arhami, M., Kashani, H., Zare, A., Niazi, S., Rastkari, N., Nazmara, S., Ghani, M., & Yunesian, M. (2015). Characterization of PAHs and metals in indoor/outdoor PM₁₀/PM_{2.5}/PM₁ in a retirement home and a school dormitory. *Science of The Total Environment*, 527–528, 100–110.

Henderson, B. E., & Feigelson, H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427–433.

Henderson, B. R. (2012). The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica*, 2012, 1–15.

Hockings, J. K., Thorne, P. A., Kemp, M. Q., Morgan, S. S., Selmin, O., & Romagnolo, D. F. (2006). The Ligand Status of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Modulates Transcriptional Activation of BRCA-1 Promoter by Estrogen. *Cancer Research*, 66(4), 2224–2232.

Hockings, J. K., Thorne, P. A., Kemp, M. Q., Morgan, S. S., Selmin, O., & Romagnolo, D. F. (2006). The Ligand Status of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Modulates Transcriptional Activation of BRCA-1 Promoter by Estrogen. *Cancer Research*, 66(4), 2224–2232.

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research: BCR*, 13(4), 215.

Hu, H., Dailey, A. B., Kan, H., & Xu, X. (2013). The effect of atmospheric particulate matter on survival of breast cancer among US females. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(1), 217–226.

Huen, M. S. Y., Sy, S. M. H., & Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(2), 138–148.

Hung, L.-J. (2012). Traffic Air Pollution and Risk of Death from Breast Cancer in Taiwan: Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) as a Proxy Marker. *Aerosol and Air Quality Research*.

Huszno, J., Kołosza, Z., & Grzybowska, E. (2019). BRCA1 mutation in breast cancer patients: Analysis of prognostic factors and survival. *Oncology Letters*, 17(2), 1986–1995.

Hwang, J., Bae, H., Choi, S., Yi, H., Ko, B., & Kim, N. (2020). Impact of air pollution on breast cancer incidence and mortality: A nationwide analysis in South Korea. *Scientific Reports*, 10(1).

IARC. (2016). *Outdoor air pollution*. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.

INECC. (2019). *Informe Nacional de Calidad del Aire 2018, México*. Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental, Dirección de Investigación de Calidad del Aire y Contaminantes Climático.

Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., & Belpomme, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 61(10), 640–658.

Jackson, D. P., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2015). Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs. *Toxicology Research*, 4(5), 1143–1158.

Jacobson, M. Z. (2002). *Atmospheric pollution: History, science, and regulation*. Cambridge University Press.

Jakovljević, I., Pehneć, G., Vadić, V., Čačković, M., Tomašić, V., & Jelinić, J. D. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons in PM₁₀, PM_{2.5} and PM₁ particle fractions in an urban area. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 11(7), 843–854.

Jeffy, B. D., Schultz, E. U., Selmin, O., Gudas, J. M., Bowden, G. T., & Romagnolo, D. (1999). Inhibition of BRCA-1 expression by benzo[a]pyrene and its diol epoxide. *Molecular Carcinogenesis*, 26(2), 100–118.

Jeffy, B. D., Chirnomas, R. B., Chen, E. J., Gudas, J. M., & Romagnolo, D. F. (2002). Activation of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Pathway Is Not Sufficient for Transcriptional Repression of BRCA-1: Requirements for Metabolism of Benzo[a]pyrene to 7r,8t-Dihydroxy-9t,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Cancer Research*, 62(1), 113–121.

Jeffy, B. D., Hockings, J. K., Kemp, M. Q., Morgan, S. S., Hager, J. A., Beliakoff, J., Whitesell, L. J., Bowden, G. T., & Romagnolo, D. F. (2005). An Estrogen Receptor- α /p300 Complex Activates the BRCA-1 Promoter at an AP-1 Site That Binds Jun/Fos Transcription Factors: Repressive Effects of p53 on BRCA-1 Transcription. *Neoplasia*, 7(9), 873–882.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., & Möller, W. (2013). Differences in the Biokinetics of Inhaled Nano- versus Micrometer-Sized Particles. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 714–722.

Khan, N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2010). Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Letters*, 293(2), 133–143.

Kresovich, J. K., Erdal, S., Chen, H. Y., Gann, P. H., Argos, M., & Rauscher, G. H. (2019). Metallic air pollutants and breast cancer heterogeneity. *Environmental Research*, 177, 108639

Kuo, L.-C., Cheng, L.-C., Lin, C.-J., & Li, L.-A. (2013). Dioxin and Estrogen Signaling in Lung Adenocarcinoma Cells with Different Aryl Hydrocarbon

Receptor/Estrogen Receptor α Phenotypes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(6), 1064–1073.

Labrèche, F. P., & Goldberg, M. S. (1997). Exposure to organic solvents and breast cancer in women: A hypothesis. *American Journal of Industrial Medicine*, 32(1), 1–14.

Lee, A., M.D, Ph.D, Moon, B.-I., M.D, Ph.D, Kim, and T. H., M.D, & Ph.D. (2020). BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Annals of Laboratory Medicine*, 40(2), 114–121.

Lewis-Michl, E. L., Melius, J. M., Kallenbach, L. R., Ju, C. L., Talbot, T. O., & Orr, M. F. (1996). Breast Cancer Risk and Residence near Industry or Traffic in Nassau and Suffolk Counties, Long Island, New York. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 51(4), 255–265.

Li, R., Kou, X., Xie, L., Cheng, F., & Geng, H. (2015). Effects of ambient PM_{2.5} on pathological injury, inflammation, oxidative stress, metabolic enzyme activity, and expression of c-fos and c-jun in lungs of rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(24), 20167–20176.

Li, X. Y., Gilmour, P. S., Donaldson, K., & MacNee, W. (1997). In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀). *Environmental Health Perspectives*, 105 Suppl 5, 1279–1283.

Li, D., Li, Y., Li, G., Zhang, Y., Li, J., & Chen, H. (2019). Fluorescent reconstitution on deposition of PM_{2.5} in lung and extrapulmonary organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), 2488–2493.

Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., and Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* 343, 78–85.

Lippmann, M. (1989). HEALTH EFFECTS OF OZONE A Critical Review. *JAPCA*, 39(5), 672–695

Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet. Oncology*, 14(13), 1262–1263.

Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Cigánek, M., & Neča, J. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497(1–2), 49–62.

Mahadevan, B., Keshava, C., Musafia-Jeknic, T., Pecaj, A., Weston, A., & Baird, W. M. (2005). Altered Gene Expression Patterns in MCF-7 Cells Induced by the Urban Dust Particulate Complex Mixture Standard Reference Material 1649a. *Cancer Research*, 65(4), 1251–1258.

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8, CPath.S31563.

Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2020). Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Frontiers in Public Health*, 8.

McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 321(7261), 624–628.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., & Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5182), 66–71.

Mills, N. L., Amin, N., Robinson, S. D., Anand, A., Davies, J., Patel, D., de la Fuente, J. M., Cassee, F. R., Boon, N. A., MacNee, W., Millar, A. M., Donaldson, K., & Newby, D. E. (2006). Do Inhaled Carbon Nanoparticles Translocate Directly into the Circulation in Humans? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(4), 426–431.

Molina, C., Toro A., R., Manzano, C., Canepari, S., Massimi, L., & Leiva-Guzmán, Manuel. (2020). Airborne Aerosols and Human Health: Leapfrogging from Mass Concentration to Oxidative Potential. *Atmosphere*, 11(9), 917.

Moorthy, B., Chu, C., & Carlin, D. J. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons: From metabolism to lung cancer. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 145(1), 5–15.

Morris, J. J., & Seifter, E. (1992). The role of aromatic hydrocarbons in the genesis of breast cancer. *Medical Hypotheses*, 38(3), 177–184.

Munnia, A., Giese, R. W., Polvani, S., Galli, A., Cellai, F., & Peluso, M. E. M. (2017). Bulky DNA Adducts, Tobacco Smoking, Genetic Susceptibility, and Lung Cancer Risk. En *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 81, pp. 231–277). Elsevier.

Murray, I. A., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, 14(12), 801–814.

Nguyen, L. P., & Bradfield, C. A. (2008). The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 102–116.

Nie, J., Beyea, J., Bonner, M. R., Han, D., Vena, J. E., Rogerson, P., Vito, D., Muti, P., Trevisan, M., Edge, S. B., & Freudenheim, J. L. (2007). Exposure to traffic emissions throughout life and risk of breast cancer: The Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. *Cancer Causes & Control: CCC*, 18(9), 947–955.

Niwa, Y., Oyama, T., & Nakajima, T. (2000). BRCA1 Expression Status in Relation to DNA Methylation of the BRCA1 Promoter Region in Sporadic Breast Cancers. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann*, 91(5), 519–526.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., & Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423(6939), 545–550

Oliveira, M., Duarte, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., & Morais, S. (2020). Exposure of nursing mothers to polycyclic aromatic hydrocarbons: Levels of un-metabolized and metabolized compounds in breast milk, major sources of exposure and infants' health risks. *Environmental Pollution*, 266, 115243.

Papoutsis, A. J., Borg, J. L., Selmin, O. I., & Romagnolo, D. F. (2012). BRCA-1 promoter hypermethylation and silencing induced by the aromatic hydrocarbon receptor-ligand TCDD are prevented by resveratrol in MCF-7 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(10), 1324–1332.

Papoutsis, A. J., Lamore, S. D., Wondrak, G. T., Selmin, O. I., & Romagnolo, D. F. (2010). Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. *The Journal of Nutrition*, 140(9), 1607–1614.

Parikh, P. V., & Wei, Y. (2016). PAHs and PM_{2.5} emissions and female breast cancer incidence in metro Atlanta and rural Georgia. *International Journal of Environmental Health Research*, 26(4), 458–466.

Penn, A., Murphy, G., Barker, S., Henk, W., & Penn, L. (2005). Combustion-Derived Ultrafine Particles Transport Organic Toxicants to Target Respiratory Cells. *Environmental Health Perspectives*, 113(8), 956–963.

Perera, F. P., & Weinstein, I. B. (1982). Molecular epidemiology and carcinogen-DNA adduct detection: New approaches to studies of human cancer causation. *Journal of Chronic Diseases*, 35(7), 581–600.

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752.

Plant, A. L., Knapp, R. D., & Smith, L. C. (1987). Mechanism and rate of permeation of cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(6), 2514–2519.

Poirier, M. C. (2004). Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature Reviews. Cancer*, 4(8), 630–637.

Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9), 1132–1141.

Quezada, A., & Vafai, K. (2014). Modeling and analysis of transport in the mammary glands. *Physical Biology*, 11(4), 045004.

Ramus, S. J., & Gayther, S. A. (2009). The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer. *Molecular Oncology*, 3(2), 138–150.

Rice, J. C., Ozcelik, H., Maxeiner, P., Andrulis, I., & Futscher, B. W. (2000). Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*, 21(9), 1761–1765.

Rodgers, K. M., Udesky, J. O., Rudel, R. A., & Brody, J. G. (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environmental Research*, 160, 152–182.

Romagnolo, D. F., Papoutsis, A. J., Laukaitis, C., & Selmin, O. I. (2015). Constitutive expression of AhR and BRCA-1 promoter CpG hypermethylation as biomarkers of ER α -negative breast tumorigenesis. *BMC Cancer*, 15, 1026.

Rousseau, M.-C., Parent, M.-E., Nadon, L., Latreille, B., & Siemiatycki, J. (2007). Occupational Exposure to Lead Compounds and Risk of Cancer among

Men: A Population-based Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology*, 166(9), 1005–1014.

Rudel, R. A., Attfield, K. R., Schifano, J. N., & Brody, J. G. (2007). Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer*, 109(12 Suppl), 2635–2666.

Safe, S., Wormke, M., & Samudio, I. (2000). Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(3), 295–306.

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 (PM₁₀) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 203, 175–182.

SEDEMA. (2020). *Calidad del aire en la Ciudad de México, Informe 2018*. Dirección General de Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo de Calidad del Aire.

Seinfeld, J. H., & Pandis, S. N. (2016). *Atmospheric chemistry and physics: From air pollution to climate change* (Third edition). John Wiley & Sons, Inc.

Shafei, A., Matbouly, M., Mostafa, E., Al Sannat, S., Abdelrahman, M., Lewis, B., Muhammad, B., Mohamed, S., & Mostafa, R. M. (2018). Stop eating plastic, molecular signaling of bisphenol A in breast cancer. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(24), 23624–23630.

Shimada, A., Kawamura, N., Okajima, M., Kaewamatawong, T., Inoue, H., & Morita, T. (2006). Translocation Pathway of the Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Blood Circulation in the Mouse. *Toxicologic Pathology*, 34(7), 949–957.

Slavin, T. P., Maxwell, K. N., Lilyquist, J., Vijai, J., Neuhausen, S. L., Hart, S. N., Ravichandran, V., Thomas, T., Maria, A., Villano, D., Schrader, K. A., Moore, R., Hu, C., Wubbenhorst, B., Wenz, B. M., D'Andrea, K., Robson, M. E., Peterlongo, P., Bonanni, B., ... Couch, F. J. (2017). The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *Npj Breast Cancer*, 3(1), 22.

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. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.

Stone, V., Miller, M. R., Clift, M. J. D., Elder, A., Mills, N. L., Møller, P., Schins, R. P. F., Vogel, U., Kreyling, W. G., Alstrup Jensen, K., Kuhlbusch, T. A. J., Schwarze, P. E., Hoet, P., Pietroiusti, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Baeza-Squiban, A., Teixeira, J. P., Tran, C. L., & Cassee, F. R. (2017). Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environmental Health Perspectives*, 125(10), 106002.

Tagliabue, G., Borgini, A., Tittarelli, A., van Donkelaar, A., Martin, R. V., Bertoldi, M., Fabiano, S., Maghini, A., Codazzi, T., Scaburri, A., Favia, I., Cau, A., Barigelletti, G., Tessandori, R., & Contiero, P. (2016). Atmospheric fine

particulate matter and breast cancer mortality: A population-based cohort study. *BMJ Open*, 6(11), e012580.

Taioli, E., Sram, R. J., Garte, S., Kalina, I., Popov, T. A., & Farmer, P. B. (2007). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage (EXPAH project): Description of the population under study. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 620(1–2), 1–6.

Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Opinion: Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 814–819.

U.S. EPA. (2004). *Air Quality Criteria for Particulate Matter (Final Report, 2004)*. U.S. Environmental Protection Agency.

Vega, E., Reyes, E., Ruiz, H., García, J., Sánchez, G., Martínez-Villa, G., González, U., Chow, J. C., & Watson, J. G. (2004). Analysis of PM 2.5 and PM 10 in the Atmosphere of Mexico City during 2000-2002. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 54(7), 786–798.

Veglia, F., Matullo, G., & Vineis, P. (2003). Bulky DNA Adducts and Risk of Cancer: A Meta-Analysis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(2), 157–160.

Venkatraman, B., & Klenova, E. (2015). Role of CTCF poly(ADP-Ribosylation) in the regulation of apoptosis in breast cancer cells. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 36(1), 49.

Villeneuve, P. J., Goldberg, M. S., Crouse, D. L., To, T., Weichenthal, S. A., Wall, C., & Miller, A. B. (2018). Residential exposure to fine particulate matter air pollution and incident breast cancer in a cohort of Canadian women. *Environmental Epidemiology*, 2(3), e021.

Warner, M., Eskenazi, B., Mocarelli, P., Gerthoux, P. M., Samuels, S., Needham, L., Patterson, D., & Brambilla, P. (2002). Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women’s Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 110(7), 625–628.

Wang, L., & Di, L.-J. (2014). BRCA1 And Estrogen/Estrogen Receptor In Breast Cancer: Where They Interact? *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 566–575.

White, A. J., Bradshaw, P. T., Herring, A. H., Teitelbaum, S. L., Beyea, J., Stellman, S. D., Steck, S. E., Mordukhovich, I., Eng, S. M., Engel, L. S., Conway, K., Hatch, M., Neugut, A. I., Santella, R. M., & Gammon, M. D. (2016). Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environment International*, 89–90, 185–192.

WHO. (2006). *Air quality guidelines: Global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide*. World Health Organization.

WHO. (2018). *Ambient (outdoor) air pollution*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)

Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., & Safe, S. (2000). Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Letters*, 478(1–2), 109–112.

Wu, W., Koike, A., Takeshita, T., & Ohta, T. (2008). The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Division*, 3(1), 1.

Zaragoza-Ojeda, M., Eguía-Aguilar, P., Perezpeña-Díazconti, M., & Arenas-Huertero, F. (2016). Benzo[ghi]perylene activates the AHR pathway to exert biological effects on the NL-20 human bronchial cell line. *Toxicology Letters*, 256, 64–76.

Zereini, F., & Wiseman, C. L. S. (Eds.). (2011). *Urban Airborne Particulate Matter: Origin, Chemistry, Fate and Health Impacts*. Springer Berlin Heidelberg.

Zhang, X., Kang, J., Chen, H., Yao, M., & Wang, J. (2018). PM2.5 Meets Blood: In vivo Damages and Immune Defense. *Aerosol and Air Quality Research*, 18(2), 456–470.

Zhang, Z., Yan, W., Chen, Q., Zhou, N., & Xu, Y. (2019). The relationship between exposure to particulate matter and breast cancer incidence and mortality: A meta-analysis. *Medicine*, 98(50), e18349.