



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“Expresión de enzimas del metabolismo de xenobióticos y de reparación de ADN en placentas y su relación con los niveles de PM2.5 y PM10 en la Zona Metropolitana del Valle de México”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Claudia Viridiana Huitrón Román

TUTOR PRINCIPAL

María Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Claudia María García Cuéllar  
Instituto Nacional de Cancerología

Jesús Javier Espinosa Aguirre  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Feb, 2023



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.

## ***Agradecimientos***

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Gracias por diseñar, continuamente mejorar y poner a la disposición de la población un programa de posgrado de alta calidad que me permitió expandir los límites de mi conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado, indispensable para la manutención y desarrollo mío y de las personas detrás de este escrito (CVU: 858855).

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por aceptarme como miembro de su grupo de investigación y por sus importantes contribuciones intelectuales en el desarrollo de esta tesis. Mi más sincero agradecimiento por su apoyo e interés durante los momentos difíciles de mi carrera, muchas gracias por involucrarse. Usted me mostró que ser un investigador principal y estar entregado al desarrollo de la ciencia no está peleado con reconocer a los alumnos como personas con necesidades, miedos y aspiraciones. Le tengo una profunda admiración.

Al Dr. Pavel Petrosyan por todo su apoyo con el diseño y estandarización de los experimentos. Le agradezco las observaciones, las críticas, por el rigor y por las largas jornadas de debate en el laboratorio.

A la Dra. Claudia María García Cuellar y al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por formar parte de mi Comité Tutoral. Gracias por dar seguimiento a mis resultados, por sus valiosas críticas y sugerencias en el desarrollo de esta investigación. Sus aportaciones fueron de vital ayuda en mi formación como científica.

A la Dra. Tzipe Govezensky por sus valiosas aportaciones en el análisis estadístico de datos, por sus sugerencias y las explicaciones prácticas relacionadas con el uso de las pruebas estadísticas y en el manejo de la base de datos.

Al Dr. Jorge A. Maciel Ruiz por llevarme de la mano durante el desarrollo de este proyecto, por las explicaciones y las largas discusiones. Sin duda tu conocimiento y pasión en el tema me brindaron mucha claridad en el desarrollo de esta investigación.

A la Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda, por el apoyo técnico brindado durante el análisis de proteínas y actividad enzimática incluido en el proyecto de investigación. Te agradezco Sandy por mostrarme una manera amable y elegante de realizar experimentos, por tu guía y amistad.

Le agradezco a los investigadores que conformaron mi jurado, a la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez (presidenta), a la Dra. Verónica Pérez de la Cruz (secretaria), a la Dra. Martha Menjivar Iraheta (vocal), al Dr. José Pedraza Chaverri (vocal) y a la Dra. Aliesha González Arena (vocal). Por sus observaciones en el trabajo escrito y su tiempo invertido. Gracias por sus valiosas observaciones y críticas, por compartir su conocimiento conmigo en esta etapa tan importante.

## ***A mi familia y amigos***

A mi mamá, Claudia Román por incentivar mi curiosidad, por financiar mi examen de admisión al posgrado y por mostrarme que significa la fortaleza al imprimirla en tu persona. Sin ti, esta investigación simplemente no se hubiera realizado.

A mi hermana, Vanessa Huitrón por siempre acompañarme, por ayudarme a controlar las frustraciones y siempre hacerme sonreír.

A Filiberto A. Bautista por acompañarme en cada momento de la realización de esta investigación. Gracias por ser asesor de redacción, por tu buen gusto en la edición de imágenes y por las infinitas discusiones de absolutamente todo. Te agradezco por los desvelos, las horas juntos, los consuelos, las comidas que me hiciste y por cuidar de mí. ¡Seguimos siendo un gran equipo!

A mis compañeros del laboratorio Luis Salgado, Jorge Maciel, David Rodríguez, Erik Castillo, Wendy L. González, Ángel Albarrán y Daniela Silva por su apoyo en mis presentaciones tanto de licenciatura como de maestría, por compartir sus variados y valiosos conocimientos conmigo. ¡Gracias por todos los buenos momentos en el laboratorio y en los congresos chicos!

## ***Financiamiento***

Este proyecto fue financiado a través de los siguientes programas o instituciones. Programa Salud y Ambiente del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Red SAI CONACYT 293450, PAPIIT IN208914, CONACYT 219887 y por la Fundación Miguel Alemán. La alumna Claudia Viridiana Huitrón Román recibió una beca de maestría por medio de CONACYT con número 858855.

# Índice

Resumen.....	10
Abstract.....	12
1. Introducción.....	14
1.1 Contaminación atmosférica y daños a la salud.....	14
1.2 Evidencia epidemiológica del daño a la salud por PM y exposición gestacional.....	14
1.3 Papel metabólico de la placenta.....	16
1.4 Activación metabólica y formación de aductos en el ADN por Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).....	17
1.5 Formación de aductos derivados de N-nitrosaminas.....	23
1.6 Biomarcadores de riesgo a la salud por material particulado.....	24
1.7 El origen del material particulado y compuestos asociados.....	26
1.7.1 Composición del material particulado en la Zona Metropolitana del Valle de México.....	28
1.8 Las características geográficas de la ZMVM y su emisión de material particulado..	31
2. Justificación.....	34
3. Hipótesis.....	36
4. Objetivos.....	36
5. Métodos.....	37
5.1 Sujetos de estudio.....	37
5.2 Extracción de ARN de muestras de cara fetal de placenta.....	38
5.3 Integridad de las muestras de ARN.....	39
5.4 Retrotranscripción.....	40
5.5 Oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de amplicones.....	41
5.6 Estandarización de qPCR con <i>Sybr green</i> .....	45
5.7 Determinación de aductos de ADN.....	48
5.8 Purificación de microsomas y cuantificación de proteína.....	48
5.9 Inmunodetección por Western Blot.....	49
5.10 Determinación de la actividad EROD.....	50
5.11 Monitoreo ambiental.....	51
5.12 Análisis estadísticos.....	52

6. Resultados.....	53
6.1 Población de estudio .....	53
6.2 Las concentraciones de partículas son fluctuantes a través de las estaciones .....	53
6.3 Las madres voluntarias estuvieron expuestas a altas concentraciones de partículas durante el embarazo .....	55
6.4 CYP1A1 es poco abundante en placenta a término.....	57
6.5 Los niveles de expresión de CYP1A1 y CYP1B1 correlacionan con la exposición materna a PM .....	58
6.6 Los aductos en sangre materna y fetal correlacionan con la expresión de CYP1A1 y MGMT.....	60
6.7 La expresión de los citocromos 1A1 y 1B1 varía con respecto a la estación en la que ocurre el parto.....	65
6.8 La expresión de los genes de reparación del ADN correlacionan entre sí al momento del nacimiento.....	67
6.9 CYP1B1, pero no CYP1A1, es detectado en placenta a término.....	69
7. Discusión .....	72
8. Conclusiones.....	83
9. Perspectivas.....	84
Anexo 1 .....	94
Anexo 2.....	95
Anexo 3.....	96
Anexo 4.....	97
Anexo 5.....	99

# Índice de figuras

Figura 1. Bioactivación metabólica de los HAPs.....	20
Figura 2. Activación metabólica del BAP. ....	22
Figura 3. Formación de aductos derivados de N-nitrosaminas. ....	25
Figura 4. Composición de HAPs en PM <sub>10</sub> y en la fase gaseosa de la CDMX. ....	30
Figura 5. Distribución de industrias de la ZMVM incluidas en el inventario de emisiones de la Secretaría de Medio Ambiente 2014. ZMVM: Zona Metropolitana del Valle de México. AZC: Azcapotzalco. ECA: Ecatepec de Morelos. IZT: Iztapalapa. NAU: Naucalpan de Juárez. TLA: Tlalnepantla de Baz.....	33
Figura 6. Distribución espacial de la emisión de PM <sub>10</sub> (izquierda) y PM <sub>2.5</sub> (derecha) en la ZMVM.....	33
Figura 7. Escala de integridad de ARN ordenada de menor a mayor número RIN. ....	40
Figura 8. Secuenciación y alineamiento de Actina-β en muestras de cDNA extraído de placenta.....	43
Figura 9. Secuenciación y alineamiento de AHR en muestras de cDNA extraído de placenta.....	43
Figura 10. Secuenciación y alineamiento de CYP1B1 en muestras de cDNA extraído de placenta.....	44
Figura 11. Secuenciación y alineamiento de MGMT en muestras de cDNA extraído de placenta.....	44
Figura 12. Secuenciación y alineamiento de ERCC1 en muestras de cDNA extraído de placenta.....	45
Figura 13. Secuenciación y alineamiento de CYP1A1 en muestras de cDNA extraído de placenta.....	46
Figura 14. Variación estacional del PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> durante los años 2014-2016 según la RAMA.....	55
Figura 15. Exposición materna a PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> en muestras de La Raza (puntos azules) y CIMIGen (puntos purpura) durante los tres trimestres de gestación y todo el embarazo. .	56
Figura 16. Electroforesis de los amplicones obtenidos por PCR punto final de muestras de cDNA de placenta. ....	57
Figura 17. Análisis de la expresión de CYP1A1 placenta. ....	61
Figura 18. Correlaciones entre la exposición materna a PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> y los valores de expresión (2-DeltaCT) de AHR, CYP1A1, CYP1B1, ERCC1 y MGMT en placenta de las voluntarias del hospital de La Raza y El CIMIGen.....	63
Figura 19. Correlación de los niveles de aductos de sangre de cordón umbilical contra la expresión de CYP1A1, CYP1B1, AHR, ERCC1 y MGMT en placentas de voluntarias del hospital de La Raza y CimiGEN .....	64

Figura 20. Comparación de los valores de aductos en sangre periférica de la madre y cordón umbilical en los binomios separados por estación seca contra húmeda según el último mes de embarazo. ....	66
Figura 21. Análisis de correlación de los genes en placenta a término en la población Raza+CimiGEN, y las sub-poblaciones de La Raza y CimiGEN por separado. ....	68
Figura 22. Análisis de la expresión a nivel proteína del CYP1A1 y CYP1B1 en placenta a término. ....	70
Análisis de componentes principales (PCA) de la expresión de AHR, CYP1A1, CYP1B1, ERCC1, MGMT, la exposición a PM en todas las etapas gestacionales, los parámetros perinatales, edad de la madre y niveles de aductos en la madre y cordón umbilical al momento del parto. ....	97

# Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión de las participantes en el estudio. ....	38
Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para qPCR .....	42
Tabla 3. Matriz de combinaciones de oligonucleótidos sentido y antisentido empleadas para estandarizar las condiciones de qPCR.....	47
Tabla 4. Características demográficas de la población de estudio. ....	54

# Índice de abreviaturas

µg/m <sup>3</sup>	Microgramos por metro cúbico
7-ER	7- etoxirresorufina
7-meG	7- metil guanina
8OHdG	8- hidroxideoxiguanosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHR	Receptor de arilos
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APHEA 2	<i>Air Pollution and Health: A European Approach</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNT	Proteína translocadora nuclear de AHR
AZC	Azcapotzalco
BAP	Benzo[a]pireno
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BPDE	BP-7,8- Dihidrodiol-9,10-epóxido
CDMX	Ciudad de México
cDNA	ADN codificante
CimiGEN	Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CPM	Conteos por minuto
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
CYP1B1	Citocromo P450 1B1
DDB2	<i>DNA damage-binding protein 2</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNasa1	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DRZ	Zona radiactiva diagonal

ECA	Ecatepec de Morelos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EH	Epóxido hidroxilasa
EPA	<i>Enviromental Protection Agency</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERalpha	Receptor a estrógenos
ERCC1	<i>Excision Repair Cross Complementing Group 1</i>
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
EROD	Actividad etoxirresorufina O-desetilasa
ESCAPE	<i>European Study of Cohorts for Air Pollution Effects</i>
GGR	Reparación global genómica
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HepG2	Línea celular de cáncer de hígado humano
hPL	Lactógeno placentario humano
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
Hsp90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IL-6	Interleucina-6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IZT	Iztapalapa
JEG-3	línea celular de coriocarcinoma humano
MCF7	Línea celular de cáncer de mama humano
MGMT	O6-metilguanina-ADN metiltransferasa
M-MLV	Transcriptasa inversa del Virus de Leucemia Murina
MMR	<i>Mismatch</i>
mRNA	ARN mensajero
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAU	Naucalpan de Juárez

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NFκB	Factor nuclear kappa B
NNAL	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil) -1-butanona
NNN	N'-nitrosonornicotina
NOx	Óxidos de nitrógeno
O4- meT	O4-metil timina
O6-meG	O6-metil guanina
O6pobG	Aductos de piridiloxobutilación
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	<i>Tumor suppressor p53</i>
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Material Particulado
PM0.1	Partículas ultrafinas de 0.1 micrómetros
PM <sub>10</sub>	Partículas gruesas de 10 a 2.5 micrómetros
PM <sub>2.5</sub>	Partículas finas de hasta 2.5 micrómetros
POB	Piridiloxobutil
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPIA	Peptidilprolil Isomerasa A
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
RAL	<i>Relative adduct labeling</i>
RAMA	Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
SCD1	<i>Hepatic stearyl-CoA desaturase 1</i>
SDS-	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
PAGE	
SMA	Secretaria del Medio Ambiente
SOx	Óxidos de sulfuro

SPP	<i>Osteopontin</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TLA	Tlalnepantla de Baz
TLC	Cromatografía líquida en capa fina multidireccional
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TYSND1	<i>Trypsin like peroxisomal matrix peptidase</i>
VEGF	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
VH10tert	Línea celular fibroblástica
XAP2	<i>Hepatitis B virus X-associated protein</i>
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum Group A Protein</i>
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum Group C Protein</i>
XPF	<i>Xeroderma Pigmentosum Group F Protein</i>
XPG	<i>Xeroderma Pigmentosum Group G Protein</i>
XRE	<i>Xenobiotic Response Element</i>
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

# Resumen

Los efectos de la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y a material particulado (PM) en las mujeres gestantes y los fetos es de particular interés médico, ya que se ha descrito que la etapa de desarrollo gestacional es de alta susceptibilidad. Estudios epidemiológicos han asociado efectos deletéreos en los recién nacidos a la contaminación atmosférica. Los HAPs presentes en el PM así como los óxidos de azufre y de nitrógeno son bioactivados por complejos enzimáticos celulares. Conocer los cambios en la expresión de RNA mensajero de enzimas importantes en el metabolismo de xenobióticos (*AHR*, *CYP1A1* y *CYP1B1*) y en la reparación del ADN (*ERCC1* y *MGMT*), y su relación con la exposición gestacional a contaminantes en el momento del nacimiento, podría darnos información sobre los efectos que tienen los contaminantes en el metabolismo fetal.

La Zona Metropolitana del Valle de México se encuentra altamente contaminada. Las razones que favorecen este hecho son por un lado sus características fisiográficas — las cuales evitan la disipación de los contaminantes —, y por el otro la alta densidad poblacional y la creciente concentración industrial que generan anualmente hasta 31,000 toneladas de material particulado. Dichas emisiones diarias de material particulado sobrepasan el límite anual recomendado por la Secretaría del Medio Ambiente, por lo que la población capitalina y de alrededores están expuestos de manera crónica a altas concentraciones de PM y HAPs, que son compuestos altamente carcinógenos.

En el presente trabajo observacional, exploramos los cambios en la expresión de los genes de enzimas clave en el metabolismo de xenobióticos y reparación de daño al DNA para evaluar la conveniencia de emplear la expresión de estos genes como un biomarcador de exposición a PM en placenta. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión de *CYP1A1* es poco abundante en placenta a término, mientras que en el caso de *CYP1B1* se observó una alta expresión de la proteína que podría estar relacionada mayormente con el metabolismo de estrógenos en la cara fetal de la placenta, esto es de suma importancia ya que la alta expresión de

*CYP1B1* podría representar repercusiones para la salud en la infancia y vida adulta del recién nacido. Por último, proponemos analizar con mayor profundidad las dinámicas que regulan la expresión de *MGMT*, ya que está asociada positivamente con la exposición a partículas y aductos de sangre de cordón umbilical, por lo que podría ser un buen indicador para determinar la exposición a PM durante el desarrollo fetal.

# Abstract

Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and particulate matter (PM) effects in pregnant women and fetuses is of particular medical interest, since it has been described that the gestational stage of development is highly susceptible. Epidemiological studies have associated deleterious effects on newborns because of the air pollution exposure. The PAHs present in PM as well as sulfur and nitrogen oxides are bioactivated by enzyme complexes in cells. Describing changes in messenger RNA expression of key enzymes in the metabolism of xenobiotics (AHR, CYP1A1 and CYP1B1) and in DNA repair (ERCC1 and MGMT), and its relationship with gestational exposure to contaminants at the time of birth, could give us valuable information about the effects that pollutants have on fetal metabolism. The Metropolitan Zone of the Valley of Mexico is highly contaminated. The reasons that favor this fact are, on the one hand, its physiographic characteristics—which prevent dissipation of pollutants—, and on the other hand, the high population density and the growing industrial concentration that annually generate up to 31,000 tons of particulate matter. These daily emissions of particulate matter exceed the annual limit recommended by the Ministry of the Environment, while population of the capital and its surroundings are chronically exposed to high concentrations of PM and HAPs, which are highly carcinogenic compounds.

In the present observational investigation, we explored the changes in the expression of key enzymes genes in the metabolism of xenobiotics and DNA damage repair in order to assess the convenience of using the expression of these genes as a biomarker of PM exposure in placenta. According to our results, the levels of expression of CYP1A1 is low in placenta at term, while we observed a higher expression of CYP1B1, that could be related to the metabolism of estrogens in the fetal side of the placenta. This fact is of importance since a high expression of CYP1B1 could represent repercussions for the health in childhood and adult life of the newborn, since the cytochrome metabolizes PAHs. Finally, we propose to analyze in greater depth the dynamics that regulate the expression of MGMT, since

it is positively associated with the exposure to particles and adducts of umbilical cord blood, so it could be a good indicator to determine the exposure to PM during fetal development.

# 1. Introducción

## 1.1 Contaminación atmosférica y daños a la salud

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (por sus inglés, OMS) el aire contaminado es responsable de 7 millones de muertes en el mundo cada año<sup>1,2</sup>.

Siendo el aire una mezcla de compuestos suspendidos y gases, la *Environmental Protection Agency* (EPA) así como otras agencias, han establecido estándares de calidad que regulan la presencia de los principales contaminantes en el aire asociados con daños en la salud, como son: el dióxido de azufre, óxido de nitrógeno, monóxido de carbono, plomo y material particulado (por sus siglas en inglés, PM), también llamados *contaminantes criterio*<sup>3,4</sup>.

## 1.2 Evidencia epidemiológica del daño a la salud por PM y exposición gestacional

El PM se refiere a todas las sustancias atmosféricas que no son gases. Pueden ser gotas, sólidos suspendidos o una combinación de ambos, compuestos por sustancias inertes y/o reactivas<sup>5</sup>. Probablemente la primera evidencia que se tiene del daño a la salud humana por PM es gracias a Sir Percival Pott, un cirujano que publicó un tratado en el que describe que la exposición a hollín era causa de altas incidencias de cáncer de escroto en hombres jóvenes, quienes se dedicaban a ser limpiadores de chimeneas<sup>6</sup>.

A principios de la segunda mitad del siglo XX, ocurrió lo que se conoce como el gran evento de smog en Londres, que se caracterizó por un aumento de los contaminantes del aire durante varios días y en el que murieron tres veces más personas de lo esperado, un exceso de 4000 decesos, sin embargo, la tasa de mortalidad se mantuvo alta durante varios meses, y se estima que el número de muertes adicionales debidas al episodio fue de aproximadamente 12 000 personas<sup>7</sup>.

Adicionalmente, estudios como los de Pope et. al. (1995) y Abbey et. al. (1999), han asociado la exposición a PM fino y otros componentes del aire contaminado como dióxido de nitrógeno y ozono, con una disminución en la esperanza de vida estimada en 1-2 años<sup>8</sup>. En el mismo trabajo de Abbey, se demostró que la cantidad de PM<sub>10</sub> al que se exponen los individuos aumenta la mortalidad por cáncer de pulmón y enfermedades cardiopulmonares<sup>9</sup>.

Estudios epidemiológicos como el de APHEA 2 (por sus siglas en inglés, *Air Pollution and Health: a European Approach*) project y ESCAPE (*European Study of Cohorts for Air Pollution Effects*) han registrado que con el aumento de 10 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>10</sub>, incrementó la admisión a hospitales por asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en adultos de 65 años y, además que la exposición a PM<sub>10</sub> se asocia con enfermedades cardiovasculares, mientras que el PM<sub>2.5</sub> correlaciona con derrames cerebrales<sup>10,11</sup>. Relacionado con la peligrosidad de ambos tamaños de partículas, en el estudio de Beelen R. et. al. (2014)<sup>10</sup>, también se estimó que para PM<sub>2.5</sub>, la relación de riesgo es de 1.21 (intervalo de confianza del 95% = 0.87–1.69) por 5 µg / m<sup>3</sup> y para PM<sub>10</sub>, 1.22 (0.91–1.63) por 10 µg / m<sup>3</sup>.

Un ejemplo de cómo es que afecta el PM<sub>10</sub>, pero en un grupo compuesto por niños (6-15 años) es el descrito por Braun F. et al. (1997), quienes reportaron que niños de diez comunidades suizas expuestos a un máximo de 33 ug/m<sup>3</sup> de PM<sub>10</sub> presentaron síntomas de bronquitis, pero no asma o alergia<sup>12</sup>. En un estudio similar, se describió que existía una asociación significativa entre la exposición a PM y su acidez con síntomas de bronquitis en niños de 24 comunidades de Canadá y Estados Unidos<sup>13</sup>.

Respecto al estadio más temprano de la vida - el desarrollo fetal - ha sido descrito como una ventana crítica de susceptibilidad pues, de acuerdo con la hipótesis de Barker o *Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis*, las alteraciones en el ambiente intrauterino pueden incrementar el riesgo a desarrollar enfermedades en la adultez. Este concepto de causalidad también plantea que un evento de exposición gestacional a agentes tóxicos podría implicar alteraciones transgeneracionales, debido a que los efectos adversos provocados por la

exposición prenatal a agentes tóxicos afectan tanto la madre como el feto, y que incluso las células reproductivas del feto pueden verse comprometidas<sup>14,15</sup>.

Diversos estudios han descrito la asociación entre la exposición a PM y defectos de nacimiento como el bajo peso al nacer y el parto pretérmino, efectos que podrían estar asociados al incremento de la morbilidad y mortalidad neonatal, así como posibles problemas de desarrollo durante la niñez e incluso problemas de depresión y otras condiciones psiquiátricas en la adultez. De acuerdo con el meta-análisis de diversos estudios, la exposición durante el embarazo completo supone un 23% de incremento al riesgo de nacimiento pretérmino por cada incremento de 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (microgramos/metro cúbico) de  $\text{PM}_{10}$ , e incluso se estimó que el tercer trimestre de embarazo podría ser una etapa crítica de susceptibilidad ya que está asociada con el incremento de riesgo a nacimiento pretérmino, y de acuerdo a los datos de Lamichhane y colaboradores (2015), el peso al nacer puede disminuir de 10 a 22 gramos, esto relacionado con la exposición a  $\text{PM}_{10}$ ,  $\text{PM}_{2.5}$  durante el embarazo<sup>16,17</sup>.

Aunque no se conozca el mecanismo biológico por el que la exposición a PM provoque resultados adversos en el nacimiento, se cree que la inflamación intrauterina pueda cumplir un rol en la incidencia a partos pretérmino<sup>18</sup>. Anteriormente se había descrito que las respuestas inflamatorias en la madre y el recién nacido asociaban con un mayor riesgo de nacimiento pretérmino extremo (< 29 semanas) y de acuerdo con datos publicados con Nachman y colaboradores (2016), existe una relación con la inflamación intrauterina y la exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  ( $5.54 \mu\text{g}/\text{m}^3$  - $29 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) en cada uno de los tres trimestres de embarazo<sup>19,20</sup>.

### 1.3 Papel metabólico de la placenta

La placenta es un órgano de origen principalmente fetal cuyo desarrollo es crucial para el crecimiento, maduración y sobrevivencia del feto. Durante el embarazo, la placenta no solo permite la transferencia de oxígeno y de nutrientes de la madre al feto, sino también protege al feto de productos de desecho, actuando como un ruta

excretoria<sup>21,22</sup>. Para esto, la placenta se divide en dos partes: la superficie materna denominada “Plato basal”, y la superficie fetal denominada “Plato coriónico”<sup>21</sup>. El desarrollo de la placenta comienza después de 6 - 7 días de la fertilización, cuando el blastocito se diferencia en embrioblasto, (que da origen al embrión) y el trofoblasto (que da origen a la placenta)<sup>21</sup>.

La placenta es un importante órgano endocrino que regula la producción de hormonas como la progesterona, la gonadotropina coriónica humana (hCG) y el lactógeno placentario humano (hPL), para asegurar la continuación del embarazo<sup>23</sup>. Aunque el hígado posee el papel más importante como principal metabolizador de sustancias contaminantes, la placenta también expresa enzimas metabolizadoras de xenobióticos, tal como la familia de las CYPs, de la cual algunos miembros como el CYP1A1 (Citocromo P450 1A1) y CYP1B1 (Citocromo P450 1B1), son inducibles por exposición al humo de cigarro<sup>24,25</sup>.

#### 1.4 Activación metabólica y formación de aductos en el ADN por Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Los HAPs son compuestos producidos por procesos pirolíticos y especialmente de la combustión incompleta de materia orgánica, son contaminantes ubicuos en el aire contaminado y consisten en dos o más anillos aromáticos compuestos de átomos de carbón e hidrógeno y pueden ser encontrados en el ambiente en forma volátil y asociados a PM. Los compuestos orgánicos en el PM son liposolubles, característica que les permite ser absorbidos con facilidad por los pulmones y epitelio<sup>26,27</sup>. En particular, el Benzo[a]pireno (BAP), que es el HAP más ampliamente utilizado para el estudio de efectos y metabolismo de los HAPs, ha sido catalogado como un compuesto carcinógeno del grupo 1 por la IARC<sup>28</sup>.

Independientemente de la ruta de administración, la distribución de los HAPs es generalizada en órganos internos en cuestión de minutos; El BAP es absorbido por

el tejido adiposo y tejidos ricos en lípidos. En mujeres gestantes, el BAP incluso puede cruzar la barrera placentaria y llegar al feto<sup>29,30</sup>.

Estudiar la exposición a HAPs es de importancia ya que se ha establecido una relación entre exposición a HAPs en el aire y el potencial para generar cáncer en humanos lo que podría estar relacionado con la capacidad de estos compuestos de interactuar con el ADN y generar aductos, una relación que ha sido estudiada desde 1993 por Beland y Poirier que expusieron continuamente a aflatoxinas, aminas aromáticas o HAPs a modelos murinos y observaron una relación directa con exposición y respuesta tumorigénica<sup>31</sup>.

Una vez que entra a las células, el BAP es metabolizado por diversas enzimas. Este proceso comienza cuando el BAP se une a el receptor de arilos (AHR), el cual se encuentra en el citoplasma unido a un dímero de Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*) y a XAP2 (*Hepatitis B virus X-associated protein*). Una vez que el BAP se une a AHR, este complejo proteico migra al interior del núcleo, donde la proteína translocadora nuclear de AHR (ARNT) desplaza al complejo HSP90-XAP2 formando el heterodímero AHR-ARNT. Este complejo es capaz de reconocer elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) en el ADN con la secuencia 5'-T/G/TCGTGA/CG/TA/T-3'. Posteriormente el heterodímero recluta coactivadores de la transcripción génica de genes de respuesta a xenobióticos, entre los que destaca CYP1A1, que se expresa en el retículo endoplasmático (Figura 1, A)<sup>27,32,33</sup>. En el retículo endoplasmático las moléculas de BAP son sustrato de enzimas oxidativas pertenecientes a la Fase I del metabolismo de xenobióticos: los citocromos P450 (Figura 2). Este proceso es conocido como la bioactivación del BAP y ha sido atribuida principalmente a los citocromos CYP1A1 y al CYP1B1, que oxidan la molécula de BAP para formar el BP-7,8-epóxido. El metabolito oxidado es sustrato de una epóxido hidroxilasa (EH) que reduce el oxígeno produciendo grupos hidroxilo (BP-7,8-Dihidrodiol), en este paso el metabolito puede ser conjugado con glutatión por las glutatión-S-transferasas (principalmente la GST M1, T1 y P1), una enzima de la Fase II del metabolismo de xenobióticos, resultando en un compuesto

mucho más soluble en agua que es más fácilmente excretado de la célula por medio de transportadores de membrana ABC<sup>27,32,34</sup>.

Por otra parte, entre las reacciones ocurridas en este proceso se crean intermediarios que migran al núcleo e interactúan con el ADN, especialmente después de la generación de dihidrodioles por la epóxido hidrolasa (EH). Estas moléculas son nuevamente oxidadas por los citocromos generando BP-7,8-Dihidrodiol-9,10-epóxido (BPDE), compuesto que se estabiliza en forma de un carbocatión capaz de reaccionar con el ADN formando enlaces covalentes con las bases nitrogenadas (Figura 2). La formación de aductos preferencialmente se genera por unión a nucleótidos de guanina (con 5 sitios de ataque nucleofílico) y adenina (4 sitios de ataque nucleofílico). Una vez formados, los aductos pueden interferir con el proceso de replicación e inducir mutaciones tales como transversiones tipo C > A, una firma mutacional observada en células cancerígenas de fumadores y células expuestas a BAP, además de pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) en células somáticas. Finalmente, se ha descrito que estas lesiones pueden desencadenar cáncer si afectan protooncogenes o genes supresores de tumores<sup>35,36</sup>.

Los aductos generados por la bioactivación de BAP son voluminosos ("*bulky*", en inglés) y son detectados por el sistema de identificación de daño y reparación. Los mecanismos de reparación más comunes después de la exposición a HAPs son las vías NER –*Nucleotide Excision Repair*– y BER de *Base Excision Repair*. La vía BER interviene en la reparación del ADN, sustituyendo aquellos nucleótidos con depurinaciones, desaminaciones, alquilaciones y oxidaciones mediadas por especies reactivas de oxígeno. Por su parte, la vía de reparación NER es la vía más importante de remoción de aductos voluminosos del ADN<sup>37-39</sup>.

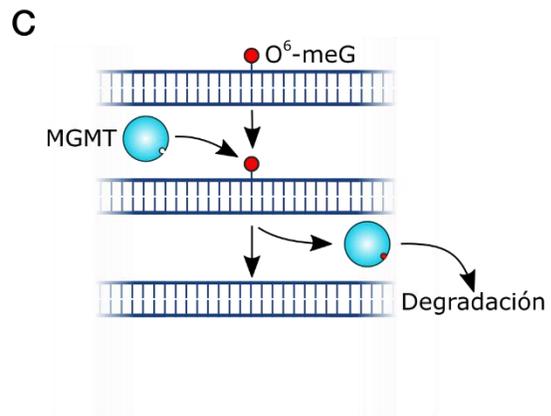
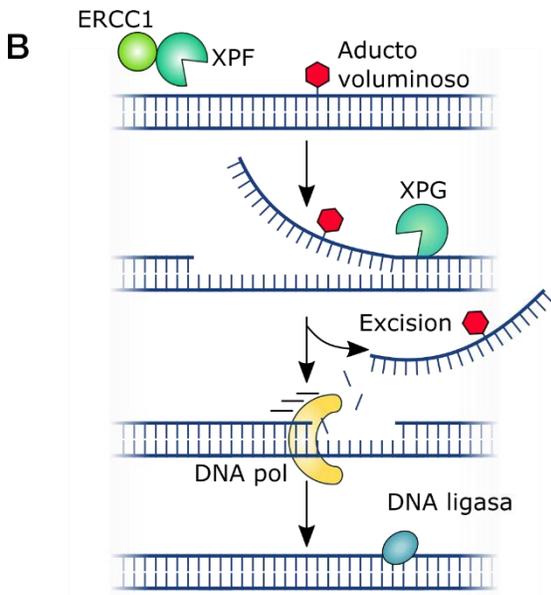
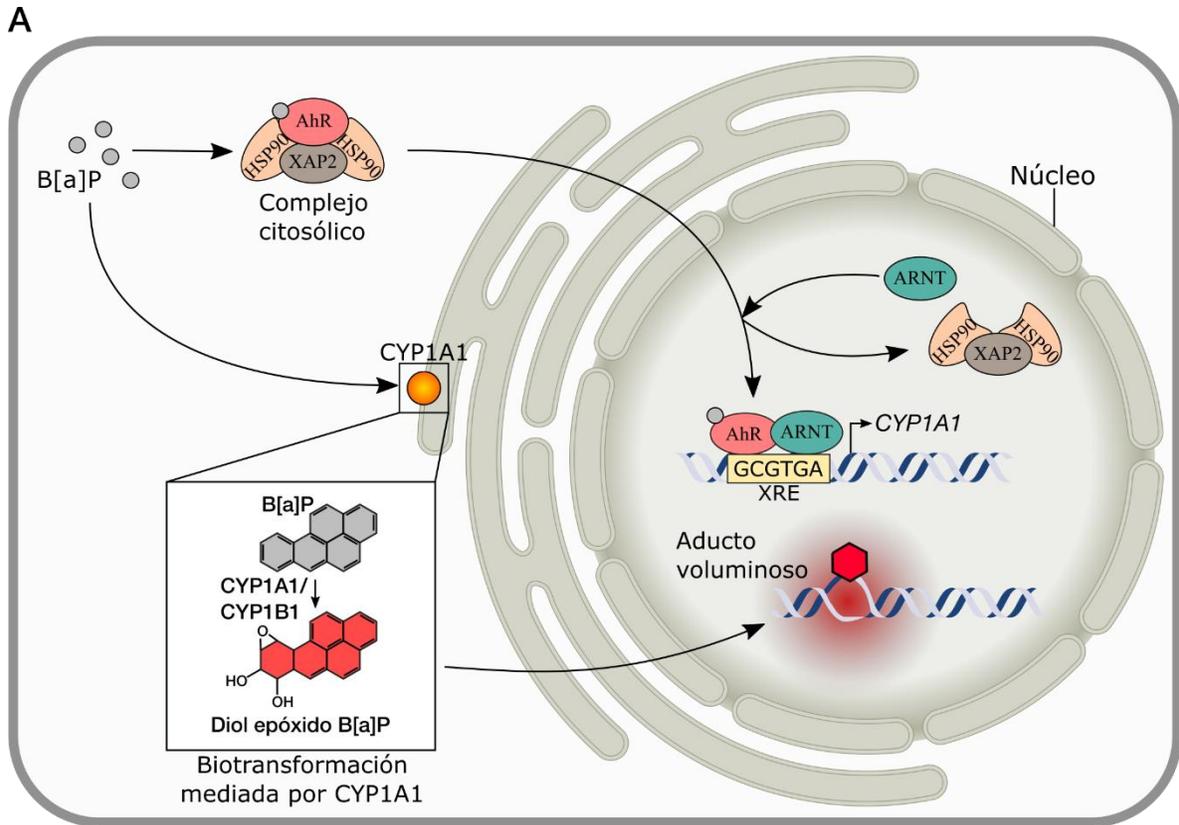


Figura 1. A) Bioactivación metabólica de los HAPs. Posterior a entrada del BAP a la célula (círculos grises, esquina superior izquierda), este xenobiótico puede unirse al AHR, que al acoplarse con ARNT reconocen secuencias de XRE para promover la expresión de genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos, tal como el citocromo *CYP1A1*. El *CYP1A1* se expresa en el retículo endoplásmico donde es capaz de metabolizar el BAP para producir Diol epóxidos que son

metabolitos reactivos capaces de unirse al ADN generando aductos voluminosos, B) Principal vía de reparación de aductos voluminosos: NER. La *Nucleotide Excision Repair pathway*, es un mecanismo de reparación en el que intervienen de entre 24-32 proteínas para identificar el daño, remover el oligonucleótido dañado y reparar el *gap* creado en el proceso. ERCC1 es el componente no catalítico del complejo XPG-ERCC1 encargado de crear la escisión 5' en el ADN, posterior a la remoción del oligonucleótido, el *gap* creado es reparado por la ADN polimerasa y por la acción de la ADN ligasa. C) Vía de reparación de O<sup>6</sup>metG mediada por MGMT. La proteína O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa repara este daño a través del mecanismo *mismatch* que consiste en remover el grupo metilo del ADN y auto-transferirlo a su residuo aminoácido de cisteína, posterior a la transferencia, MGMT es ubiquitinada y degradada. HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos. BAP: Benzo[a]pireno. XRE: Xenobiotic Response Element. AHR: Receptor de arilos. ARNT: Proteína translocadora nuclear de AHR. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ADN: Ácido desoxirribonucleico. NER: Nucleotide Excision Repair. ERCC1: Excision Repair Cross Complementing Group 1. XPG: Xeroderma Pigmentosum Group G Protein. MGMT: O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa.

Los aductos voluminosos son reparados por la vía NER (Figura 1, B), un proceso que en organismos eucariontes es llevada a cabo por alrededor de 20-30 proteínas<sup>40,41</sup> y que incluye un paso inicial de reconocimiento del daño en el ADN, una incisión de 24-32 nucleótidos donde se encuentra el daño, la remoción del oligonucleótido dañado, la síntesis de ADN y la catálisis de los enlaces 3'-5' de la cadena polinucleotídica por la ADN ligasa.

Existen dos vías alternativas en NER: la vía de reparación global genómica (GGR) y la reparación acoplada a la transcripción (TCR), las cuales difieren en la modalidad en la que se reconoce el daño en el ADN pero ambas vías finalmente convergen en la incisión de la cadena dañada en una reacción catalizada por *Xeroderma Pigmentosum Group G Protein* (XPG) y *XPF-Excision Repair Cross Complementing Group 1* (ERCC1). En el 2007, Yang y colaboradores evaluaron cambios la expresión in vitro de las enzimas involucradas en las vías GGR y TCR en células de epitelio bronquial humano expuestas a dosis variables de BAP. En este trabajo observaron que ERCC1 fue la proteína cuyos niveles de expresión correlacionaron de manera más fuerte con el daño al ADN causado por exposición a BAP. Por lo tanto, se cree que esta proteína puede ser empleada como biomarcador para determinar niveles de exposición a HAPs<sup>42</sup>.

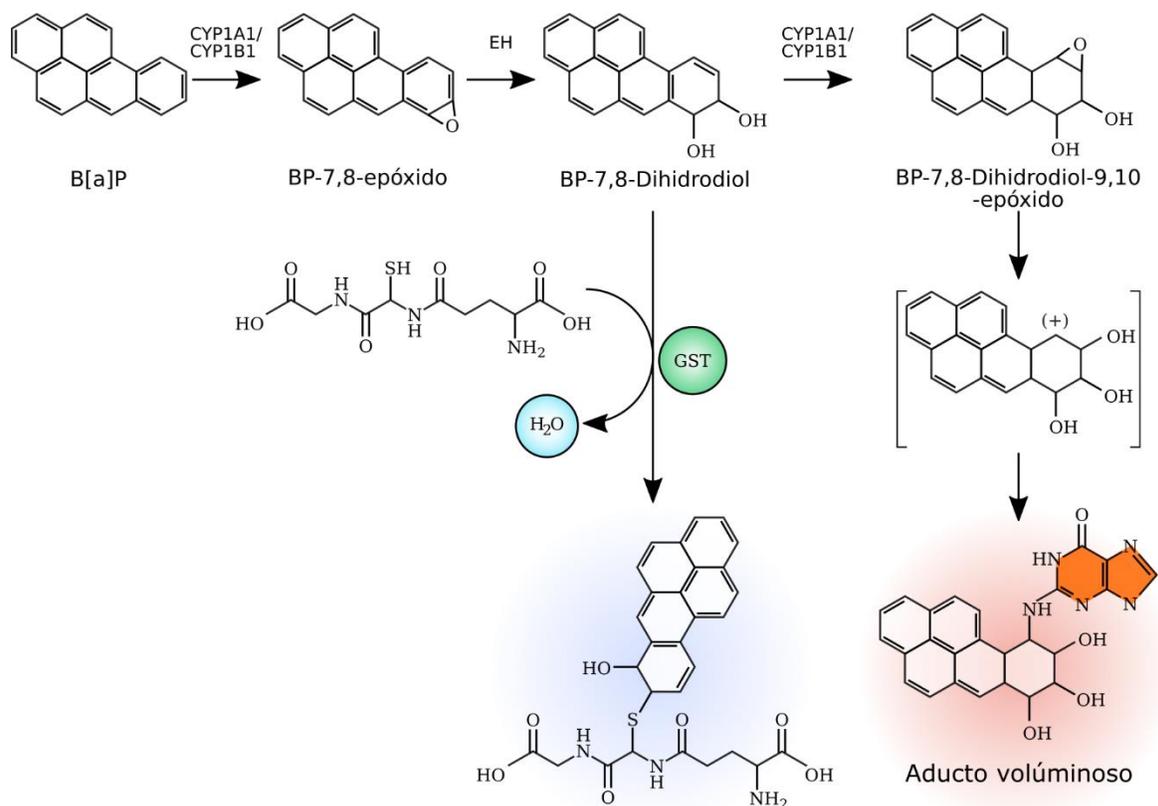


Figura 2. Activación metabólica del BAP. Una vez que el BAP entra al citoplasma es oxidado por los citocromos CYP1A1/CYP1B1 para formar BP-7,8-epóxido, posteriormente este compuesto es sustrato de la EH, epóxido hidrolasa que forma BP-7,8-Dihidrodiol, en este punto de la vía los metabolitos formados pueden seguir por el camino de la detoxificación al ser unido una molécula de glutatión por las glutatión-S-transferasas, o bien puede ser nuevamente oxidado por los citocromos CYP1A1/CYP1B1 para formar BP-7,8-Dihidrodiol-9,10-epóxido, la acumulación de este compuesto puede provocar la ruptura del epóxido, formándose un carbocatión reactivo que puede reaccionar con el ADN formando enlaces covalentes con las bases nitrogenadas como la guanina. [ Philips D. et al 2005]. BAP: Benzo[a]pireno. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

## 1.5 Formación de aductos derivados de N-nitrosaminas

Las N-nitrosaminas son compuestos orgánicos de nitrógeno capaces de alquilar el ADN que comúnmente se encuentran en el ambiente asociados a PM. Estos compuestos se forman a partir de procesos industriales, de la combustión incompleta de productos de tabaco, de la preparación de alimentos, de emisiones vehiculares y también son formadas en la atmósfera a través de la oxidación o reacciones de nitrosación de sus aminas precursoras<sup>43,44</sup>.

Las N-nitrosaminas son de particular interés debido a que han sido clasificadas como carcinógenos potentes en humanos por la IARC, siendo las nitrosaminas específicas de tabaco las que tienen mayor capacidad carcinogénica, tal como la N'-nitrosornicotina (NNN), la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y su metabolito, la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL)<sup>43-45</sup>.

La  $\alpha$ -hidroxilación es catalizada por una amplia variedad de citocromos P450 y es la vía metabólica de activación del NNK, el NNAL y otras nitrosaminas. Esta activación consiste en la hidroxilación de los carbonos adyacentes del grupo N-nitroso que el caso del NNK, la hidroxilación se puede producir en el grupo metil o el carbón metileno. Los citocromos 1A2 en el hígado y 2A6 en pulmón humano, catalizan la  $\alpha$ -hidroxilación en el carbón metil formando  $\alpha$ -hidroximetil NNK, que espontáneamente pierde su grupo formaldehído produciendo un piridiloxobutildiazohidróxido, que reacciona con el ADN produciendo aductos de piridiloxobutilación en el ADN (O6pobG)<sup>43</sup>. Por otra parte, cuando la  $\alpha$ -hidroxilación ocurre en el carbono metileno del NNK, catalizada por los citocromos 2A6 y 3A4, produce  $\alpha$ -metilenhidroxi NNK que se disocia espontáneamente formando metanodiazohidróxido, posteriormente este compuesto se descompone en un ion metanodiazonio que metila el ADN, formando las lesiones 7-metil guanina (7-meG), O6-metil guanina (O<sup>6</sup>-meG) y O4-metil timina (O<sup>4</sup>-meT) (Figura 3). Entre estas lesiones de alquilación introducidas en el ADN, se ha descrito que la más mutagénica es la alquilación en la posición O6 de la guanina, que posteriormente pueden resultar en errores de apareamiento (*mismatches*) formándose transiciones

GC->AT con alta frecuencia<sup>43,46</sup>. La principal línea de defensa contra la carcinogénesis provocada por mutación causada por agentes alquilantes es la O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), una proteína que repara este daño a través del mecanismo de mal apareamiento. El mecanismo de reparación consiste en remover el grupo metilo del ADN y auto transferirlo a su residuo aminoacil de cisteína, posterior a la transferencia, MGMT es ubiquitinada y degradada (Figura 1, C)<sup>43,47,48</sup>. En ausencia de MGMT, las lesiones O<sup>6</sup>-meG puede generar roturas de doble cadena a través de la replicación celular y la reparación del ADN tipo *mismatch* (MMR) provocando muerte celular por apoptosis<sup>49,50</sup>.

## 1.6 Biomarcadores de riesgo a la salud por material particulado

Las asociaciones entre la exposición a contaminantes ambientales y su relación con el deterioro a la salud son identificadas a través del uso de biomarcadores de toxicidad. En el caso de los contaminantes atmosféricos, diversos biomarcadores de daño al ADN como los aductos, micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas, resultan tener asociaciones fuertes contra la exposición a componentes derivados de combustión de gasolinas y diésel. Diversos estudios epidemiológicos han validado su uso como las pruebas más directas de como componentes atmosféricos producen daños en el material genético y mutaciones que se asocian a un aumento en la morbilidad y mortalidad<sup>51</sup>.

Aunque sea una técnica costosa y laboriosa, <sup>32</sup>P-*postlabeling* (post-marcaje con fosforo 32), es la prueba más usada para identificar aductos voluminosos provocados por compuestos aromáticos en personas expuestas a compuestos derivados del tráfico vehicular<sup>51</sup>. Esta técnica puede alcanzar una sensibilidad de un aducto en 10<sup>10</sup> nucleótidos y de acuerdo con DeMarini et al. 2015, diversos estudios en los que emplean <sup>32</sup>P-*postlabeling*, han demostrado incrementos en aductos en poblaciones expuestas en comparación con las poblaciones con menor exposición o controles.

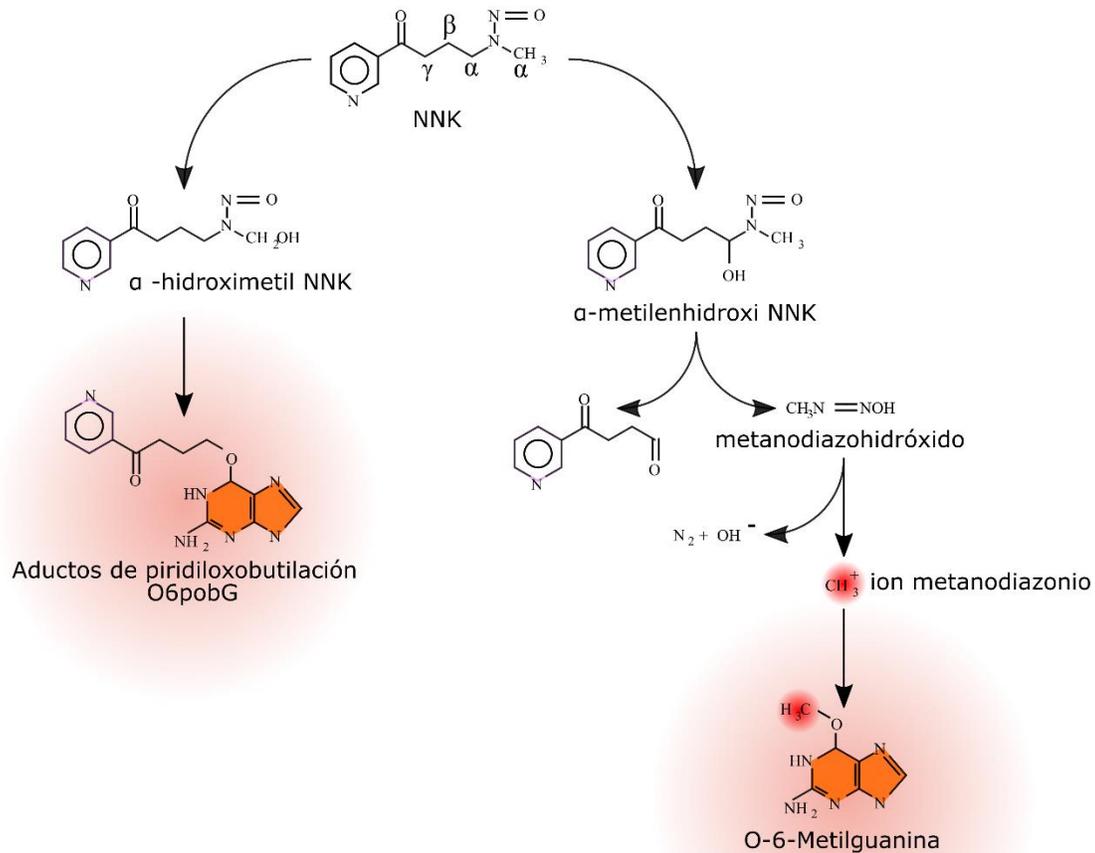


Figura 3. Formación de aductos derivados de N-nitrosaminas. Las N-nitrosaminas como la NNK son activadas a través de la  $\alpha$ -hidroxilación catalizada por citocromos P450. La activación consiste en la hidroxilación de los carbonos adyacentes del grupo N-nitroso y se puede producir en el grupo metil (hacia la izquierda), vía secundaria en la que se forman aductos de piridiloxobutilación o O<sup>6</sup>pobG, también la hidroxilación se puede producir en el carbón metileno (hacia la derecha), donde a través de la formación del ion metanodiazonio, se crean metilaciones en las guaninas llamadas O<sup>6</sup>meG. NNK: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil) -1-butanona. O<sup>6</sup>pobG: Aduetos de piridiloxobutilación. O<sup>6</sup>meG: O6-metil guanina.

Otro biomarcador de genotoxicidad ampliamente usado es el ensayo cometa (*Comet assay*), capaz de detectar diversos daños al ADN como las roturas de una o de las dos cadenas, sitios apurínicos y apiridínicos además de detectar lesiones, como las 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG), provocadas por compuestos oxidantes. La detección de la base libre derivada de esta lesión, la 8-hidroxiguanina,

es desechada en orina y también es empleada como un biomarcador de daño oxidante al ADN<sup>52,53</sup>.

La detección de micronúcleos en células es el segundo método más usado – después del <sup>32</sup>P-*postlabeling* – para evaluar la genotoxicidad en personas expuestas al tráfico vehicular. Puede identificar tanto rupturas cromosómicas y aneuploidías, aunque no ha mostrado ser tan predictiva para evaluar el riesgo a cáncer en comparación con el análisis de aberraciones cromosómicas<sup>54</sup>. Sin embargo, Pedersen y colaboradores (2019) demostraron que el conteo de micronúcleos es efectivo como biomarcador de exposición a compuestos derivados del tráfico vehicular. En su estudio, tanto el número de aductos y micronúcleos detectados en sangre periférica de las madres y sangre de cordón umbilical estaban significativamente incrementados ( $p < 0.01$  y  $p = 0.02$  respectivamente) en mujeres expuestas a alta densidad de tráfico vehicular<sup>55</sup>.

La expresión génica de diversos genes implicados en distintas vías como la de inflamación, respuesta al estrés oxidante, disfunción mitocondrial y la vía de degradación de proteínas, también han sido usados para evaluar la exposición al humo de diésel con una concentración de  $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{2.5}$ , en adultos de entre 21 y 44 años, en dicho estudio, los 9 genes evaluados mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) por A. P. Pettit y colaboradores, mostraron cambios de entre 3 – 30 veces más con respecto al grupo control expuesto a aire filtrado<sup>56</sup>.

## 1.7 El origen del material particulado y compuestos asociados

La presencia de PM en el aire es de importancia frente a los demás contaminantes criterio, pues es un agente más peligroso para la salud humana (2.1 millones de muertes anuales) que el ozono (0.47 millones de muertes al año) u otros contaminantes comunes del aire como el monóxido de carbono<sup>57</sup>. En octubre del 2013, la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), basándose en

estudios de exposición y posible carcinogenicidad en humanos provocado por la contaminación del aire, clasificó al PM, como carcinógeno humano dentro del Grupo 1<sup>4,58</sup>.

La clasificación del PM se basa principalmente en el diámetro aerodinámico, que es el diámetro de una partícula esférica que tiene la misma velocidad de sedimentación que otra partícula con diferente densidad y dimensiones. Siguiendo esta clasificación se identifican 3 categorías de partículas: PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>0.1</sub><sup>59</sup>.

Las partículas gruesas (PM<sub>10</sub>) tienen un diámetro aerodinámico de 10 µm a 2.5 µm y representa partículas que no penetran tan profundamente en los pulmones, pues se depositan en el árbol traqueobronquial, mientras que aquellas partículas entre 1 y 0.5 µm se depositan en los bronquiolos respiratorios y en los alvéolos donde se produce el intercambio de gases<sup>57</sup>. El PM<sub>10</sub> se deriva de la erosión del suelo y resuspensión de polvo, partículas provenientes de carreteras, agricultura, minería, actividad industrial, erupciones volcánicas, incendios, incluyendo biomasa como esporas, polen y partes de insectos<sup>2,59,60</sup>.

Las partículas finas (PM<sub>2.5</sub>) con diámetro aerodinámico ≤ 2.5 µm se originan en la atmósfera por la condensación de vapores a altas temperaturas provenientes de quema de combustibles fósiles, la combustión incompleta de biomasa, de la cocción de alimentos y de procesos industriales, pueden adsorber compuestos gaseosos como óxidos de sulfuro (SO<sub>x</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y compuestos orgánicos volátiles (COV)<sup>2,59,61-63</sup>. Por otra parte, las partículas ultrafinas (PM<sub>0.1</sub>) de diámetro aerodinámico menor a 0.1 µm, se originan a partir de procesos de nucleación de gases producidos por vaporización de sustancias y reacciones fotoquímicas en la atmósfera<sup>2,7</sup>, además, se ha probado que las partículas ultrafinas que se forman en las ciudades tienen un vínculo estrecho con la oxidación de los COV<sup>64-66</sup>. Estos dos últimos tipos de partículas son capaces de penetrar a las células de todo el tracto pulmonar incluyendo a las terminales nerviosas que las podrían conducir hasta el sistema nervioso central<sup>65</sup>. Sin embargo, más recientemente, Bové y colaboradores (2019), comprobaron que no necesariamente las partículas más pequeñas a 2.5 µm son las que exclusivamente atraviesan los alvéolos, ya que, en sus experimentos

empleando placentas a término, lograron detectar partículas de carbón negro de entre 1.0 y 9.78  $\mu\text{m}$ , evidenciando que las partículas atraviesan el tejido pulmonar e incluso la barrera placentaria.<sup>67</sup>

### 1.7.1 Composición del material particulado en la Zona Metropolitana del Valle de México.

El PM contiene un amplio repertorio de elementos químicos, se ha documentado que en la Ciudad de México (CDMX), independientemente de la fuente de emisión, contiene metales como aluminio, hierro, titanio, estroncio, circonio y cobre<sup>68,69</sup>. Además, se ha documentado que el PM contiene una miríada de elementos traza como, cadmio, berilio, cromo, zinc, níquel y vanadio, que representa el 0.4%-0.8% del peso total del PM<sup>62,69</sup>. También se ha reportado que el plomo, un metal considerado como un contaminante criterio que se asocia con la disminución en función cognitiva, disminución en el coeficiente intelectual, anemia y aumento en la presión sanguínea, también se encuentra asociado a PM derivado de calles pavimentadas y no pavimentadas<sup>68,70</sup>. Relativo a estos compuestos, se han propuesto mecanismos por los cuales causan daño a nivel celular y, consecuentemente, a la salud, por ejemplo, se ha descrito que los extractos solubles de PM<sub>2.5</sub> más que de PM<sub>10</sub>, inducen daño en el ADN (Ácido Desoxirribonucleico)<sup>69</sup>. Otro ejemplo, es el de los metales de transición como Cu, Fe y Zn contenidos en el PM que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando la liberación celular de mediadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) e interleucina-6 (IL-6), causando irritación e inflamación de las vías respiratorias, efecto también producido por la presencia de componentes biológicos como alérgenos o endotoxinas<sup>71,72</sup>.

Un trabajo publicado en el 2002 en el que se analizaron muestras de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), se describió que tanto PM<sub>10</sub> como PM<sub>2.5</sub> contienen nitratos, sulfatos, carbono orgánico y carbono elemental, aunque la

proporción de carbono para PM<sub>2.5</sub> representa un 45%-50% de la composición (31% carbono orgánico y 14% carbono elemental), mientras que el PM<sub>10</sub> se compone solo de un 28%-30% de carbono<sup>61,62,69,73,74</sup>.

Un análisis de la composición del extracto orgánico del PM reveló que existen distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), algunos de los cuales son carcinógenos que representan el 53.3%-73.3% del contenido total de HAPs en el PM<sup>69</sup>. Además, se ha documentado que la carga de HAPs en el PM cambia en relación con el clima, en la ZMVM se han identificado 3 condiciones climáticas, húmeda (mayo-octubre), seca-fría (noviembre-febrero) y seca-caliente (marzo-mayo) y es durante la época seca-fría cuando aumenta la concentración de HAPs y otros químicos mencionados<sup>62,69</sup>.

Un aspecto importante de los HAPs asociados al PM es que son de un elevado peso molecular, con 5 o más anillos aromáticos, como lo son el benzo[a]fluoranteno; indeno(1 2 3-cd)pireno y el benzo[ghi]perileno, mientras que los HAPs con 2 , 3 y 4 anillos (naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno) están mayormente representados en fase de vapor. El benzo[a]pireno (BAP), un HAPs catalogado como un compuesto carcinógeno del grupo 1 por la IARC se encuentra tanto en estado sólido unido a PM y en la fase volátil del aire de la CDMX<sup>75</sup>.

En el trabajo de Mugica et al., (2010) se describe que la composición los HAPs evaluados en el PM de la CDMX, además de variada, es constante en las tres estaciones antes mencionadas. El PM de la CDMX contiene HAPs como, BAP, benzo[a]antraceno y benzo[b]fluoranteno, que son catalogados por la EPA como probables carcinógenos y mutágenos para humanos. Por otra parte, la concentración del PM aumenta considerablemente (114 ug/m<sup>3</sup>) en la época seca fría, con relación a la época lluviosa (75 ug/m<sup>3</sup>). En cuanto a la fase gaseosa de la CDMX, los niveles de todos los HAPs evaluados aumentan en la estación seca fría, mientras que los niveles más bajos se reportan durante la estación lluviosa. En específico, los niveles de BAP en la estación seca-fría fueron 3.2 veces mayores con respecto a la estación seca-cálida y 2.8 veces mayores con respecto a la estación lluviosa<sup>75</sup>.

Para poder calcular el potencial daño a la salud por los HAPs en el aire, la Unión Europea estableció que el contenido de BAP en la atmósfera ha de ser considerado como un índice para estimar la carcinogenicidad de los HAPs, estableciendo como valor límite 1000 equivalentes de BAP por año, para 2010<sup>75</sup>. En ese mismo periodo Mugica et al. (2010) estimaron los equivalentes de BAP para la CDMX en 1250, casi un 30% por encima de lo recomendado por la Unión Europea. (Ver figura 4)

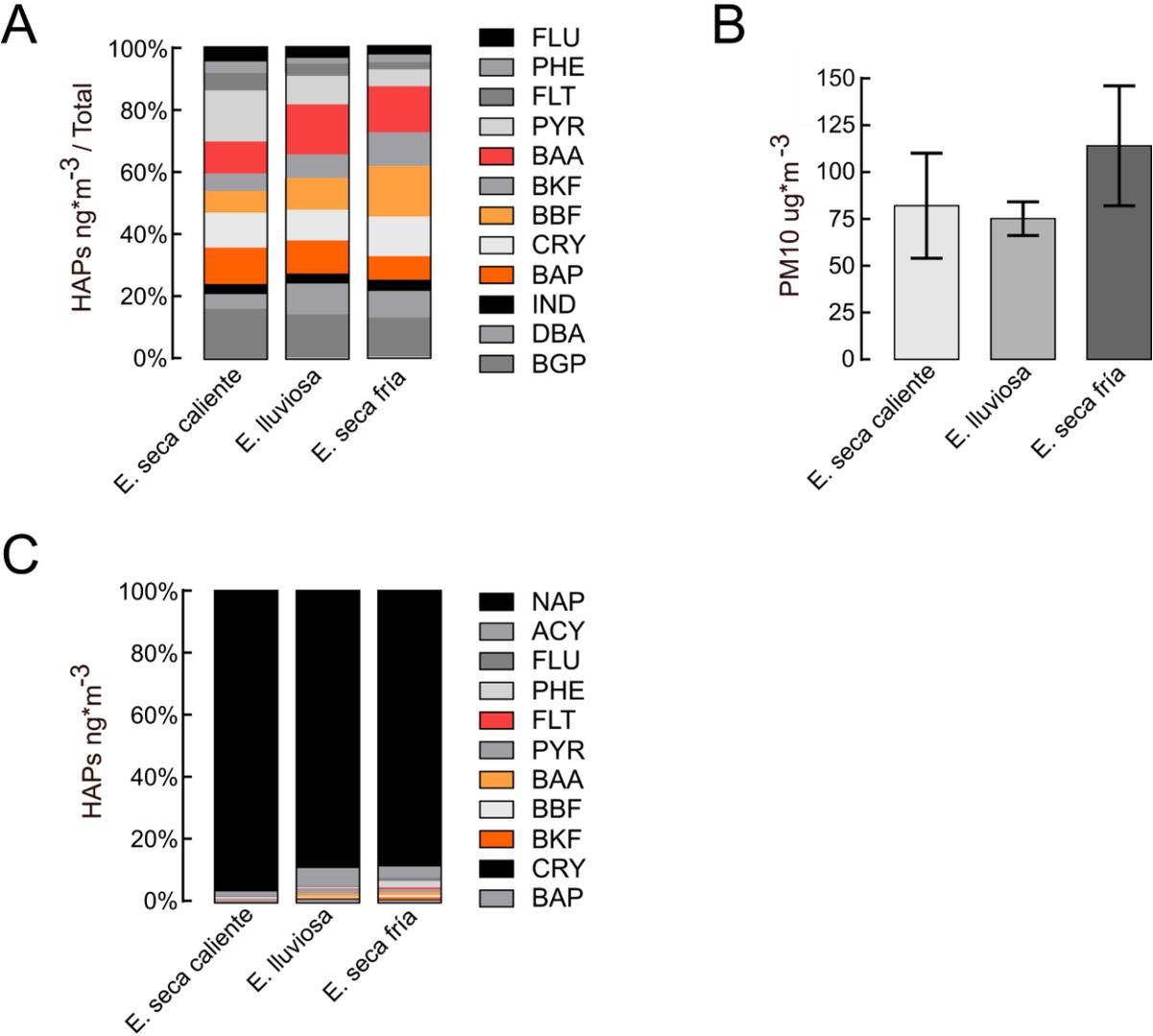


Figura 4. Composición de HAPs en PM<sub>10</sub> y en la fase gaseosa de la CDMX. A) Composición de HAPs en el PM<sub>10</sub> durante la época seca caliente, lluviosa y seca fría. En colores rojo, amarillo y naranja se muestra el aporte de HAPs probables carcinógenos y mutágenos para humanos según la EPA. B) Cambios en la concentración de PM<sub>10</sub> durante las diferentes épocas evaluadas. C) Composición de

HAPs en la fase gaseosa durante las 3 estaciones. Fluoreno (FLU), Fenantreno (PHE), Fluoranteno (FLT), Pireno (PYR), Benzo[a]antraceno (BAA), Benzo[k]fluorantreno (BKF), Benzo[b]fluorantreno (BBF), Criseno (CRY), Benzo[a]pireno (BAP), Indeno[1,2,3-cd]pireno (IND), Dibenzo[a,h]antraceno (DBA), Benzo[ghi]perileno (BGP), Naftaleno (NAP), Acenaftileno (ACY), Benzo[k]fluorantreno (BKF). Datos extraídos de Mugica (2010). HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos. EPA: *Environmental Protection Agency*. PM<sub>10</sub>: Partículas gruesas de 10 a 2.5 micrómetros.

## 1.8 Las características geográficas de la ZMVM y su emisión de material particulado

Según con la Secretaría de Medio Ambiente (SMA) del Gobierno de la CDMX, la ZMVM posee una superficie de 7,800 km<sup>2</sup> que comprende a la CDMX (19% área territorial) con sus 16 alcaldías y 59 municipios del Estado de México (81%). La zona se ubica al Este del Sistema Neovolcánico Transversal y posee una altitud promedio de 2240 metros sobre el nivel del mar (msnm) provocando que los procesos de combustión sean menos eficientes, pues a esta altitud hay 23% menos oxígeno en comparación con el nivel del mar<sup>76,77</sup>. Dichas características fisiográficas son inconvenientes cuando se habla de producción y acumulación de contaminantes, ya que la posición latitudinal de esta zona recibe radiación solar intensa que acelera la formación fotoquímica de contaminantes atmosféricos como el ozono, además, las cadenas montañosas que rodean a la ZMVM propician el estancamiento de contaminantes<sup>77</sup>.

Según los datos climatológicos de la SMA 2006, en la ZMVM se presentan varios subtipos de climas, como resultado de las diferencias de elevación y relieve del terreno: templado con lluvias en verano, templado húmedo y subhúmedo con lluvias en verano, por último, el clima seco<sup>76</sup>. A pesar de que en los últimos 20 años las condiciones climáticas del Valle de México han cambiado significativamente, aún se puede distinguir una temporada húmeda (lluvias) y una temporada seca. La temporada de lluvias y la humedad relativa alta inicia a mediados de mayo y se vuelve más evidente entre junio y octubre mientras que la temporada seca, por

variaciones en la temperatura de hasta 15°C se divide en, seca fría, de noviembre a febrero y seca caliente, que abarca de marzo a mayo<sup>77</sup>. Durante temporada húmeda, existe el aumento en la precipitación pluvial que propicia un efecto de “lavado troposférico”, lo cual favorece una mejor calidad del aire de la zona, puesto que disminuye la presencia de partículas en él aire<sup>76,77</sup>.

Con respecto a características ligadas con actividades antropogénicas, se sabe que en la ZMVM se generan más de 31 000 toneladas de PM<sub>10</sub> anuales, cantidad de la cual 41% corresponde a PM<sub>2.5</sub>. Las emisiones de PM<sub>10</sub> en la CDMX provienen de vialidades pavimentadas, mientras que en el caso del Estado de México las emisiones se originan de vialidades sin pavimentar, actividades de labranza y cosecha. Las mayores emisiones de PM<sub>2.5</sub> provienen de municipios conurbados en el Estado de México, siendo las actividades industriales, de construcción y vialidades pavimentadas las principales fuentes de emisión. Otra fuente de emisión de PM<sub>2.5</sub> es la combustión habitacional, debido a la quema de gas LP<sup>78</sup>. Además se ha contabilizado que en la ZMVM se encuentran registrados 70,000 establecimientos industriales, 32,000 se ubican en la CDMX y los 38,000 establecimientos restantes se encuentran en los 59 municipios conurbados del Estado de México, siendo las delegaciones de la CDMX: Azcapotzalco (AZC) e Iztapalapa (IZT) (en rojo) las regiones con mayor asentamiento industrial, mientras que en el caso del Estado de México, son Tlalnepantla de Baz (TLA), Naucalpan de Juárez (NAU) y Ecatepec de Morelos (ECA) (en naranja) (Figura 5)<sup>78</sup>.

Según los datos de la SMA del 2014, en la mayor parte de la extensión territorial de la ZMVM hay emisiones de entre 1-18 toneladas anuales de PM<sub>10</sub> y se puede observar una alta concentración de 19-198 toneladas anuales en la región central de la ZMVM (al norte de la CDMX) hasta alcanzar valores críticos de al menos 199 toneladas anuales (Figura 6). Para el caso de las PM<sub>2.5</sub>, la distribución espacial asemeja a la expuesta por el PM<sub>10</sub>, pero con puntos de altas emisiones, debido a que se conjuntan las actividades industriales, básicamente en Azcapotzalco y Tlalnepantla de Baz (Figura 6)<sup>76,78</sup>.

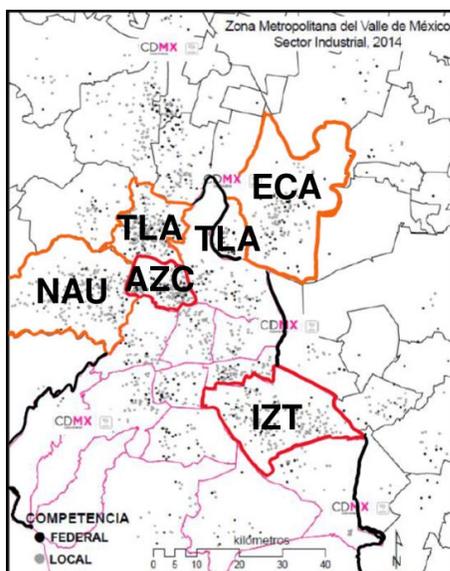


Figura 5. Distribución de industrias de la ZMVM incluidas en el inventario de emisiones de la Secretaría de Medio Ambiente 2014. ZMVM: Zona Metropolitana del Valle de México. AZC: Azcapotzalco. ECA: Ecatepec de Morelos. IZT: Iztapalapa. NAU: Naucalpan de Juárez. TLA: Tlalnebantla de Baz.

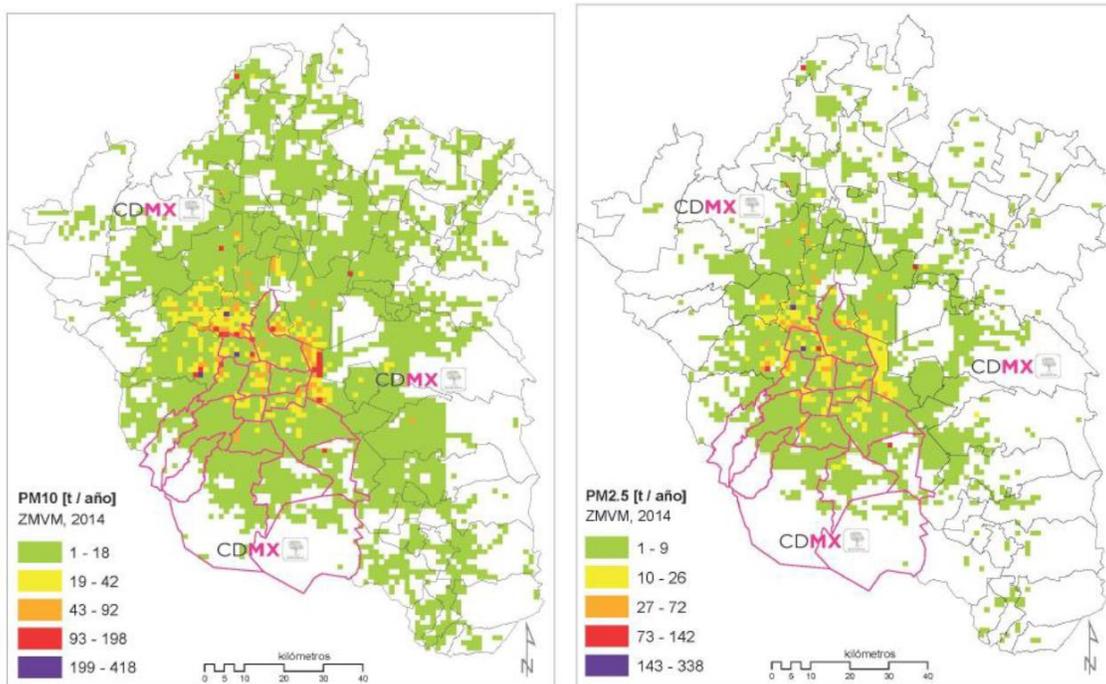


Figura 6. Distribución espacial de la emisión de PM<sub>10</sub> (izquierda) y PM<sub>2.5</sub> (derecha) en la ZMVM. Recuperado del Inventario de Emisiones de la CDMX 2014: Contaminantes Criterio, tóxicos y de efecto invernadero. PM<sub>10</sub>: Partículas gruesas de 10 a 2.5 micrómetros. PM<sub>2.5</sub>: Partículas finas de hasta 2.5 micrómetros. CDMX: Ciudad de México.

## 2. Justificación

En la ZMVM se generan anualmente 31,000 toneladas de  $PM_{10}$ , de las cuales 13,000 toneladas corresponden a  $PM_{2.5}$ . Según el Inventario de emisiones de la CDMX, éstas provienen en mayor medida de la quema de combustibles en vialidades por autos y autobuses, actividades industriales, de construcción y combustión habitacional, todas fuentes de emisión antropogénicas que explican la correspondencia entre la distribución espacial de  $PM_{2.5}$  y la densidad poblacional<sup>78</sup>.

La normativa vigente que regula las emisiones de PM es la NOM-025-SSA1-2014, que establece límites de emisión anuales de  $PM_{10}$  hasta el 50% mayores que las recomendadas por la OMS y según el informe anual de la calidad del aire, las emisiones diarias de  $PM_{10}$ , en México sobrepasan su límite de  $75 \mu g/m^3$  hasta llegar a valores de  $104 \mu g/m^3$  en el Estado de México y  $120 \mu g/m^3$  en la CDMX<sup>79</sup>.

En una zona con 21 millones de habitantes (12.2 millones de habitantes en municipios conurbados a la CDMX y 8.8 millones de habitantes de la ciudad), donde el mayor consumo de combustibles fósiles (58%) es demandado por el sector de transporte y donde además los procesos de combustión son menos eficientes, la cantidad de PM en el aire aun supera las normas de salud<sup>73</sup>.

Tales condiciones aumentan la exposición a PM y por lo tanto también a HAPs, como el BAP. Las exposiciones a contaminantes ambientales afectan además principalmente a la población infantil, ya que se exponen a los mismos niveles que los adultos y los fetos en desarrollo gestacional resultan también afectados por la contaminación atmosférica como muestran numerosos estudios<sup>11,13,15-19,80</sup>. En este último caso, la exposición se ha asociado con daños en el desarrollo fetal por su transferencia a través de la placenta, provocando una mayor presencia de aductos que en su madres<sup>81,82</sup>. La exposición a BAP y en general a HAPs también ha sido asociada a alteraciones epigenéticas en fetos por interrumpir patrones de metilación de citocinas en el genoma, resultando en hipometilación global, además que se han observado efectos adversos en el desarrollo de estructura cerebral y capacidad cognitiva y comportamiento<sup>80-86</sup>. Como indicador de exposición a PM también se han

encontrado relaciones directas entre la exposición a partículas de 2.5 micrómetros con reducción en la expresión de leptina (disrupción endocrina) y aumento en el marcador de estrés nitrosativo, 3- nitrotirosina<sup>85,86</sup>.

A pesar de que la exposición fetal a PM ha sido anteriormente abordada por diversos grupos de investigación no se han estudiado con detalle los cambios en la expresión génica de enzimas importantes en el metabolismo de xenobióticos por exposición a contaminantes ambientales en relación con su abundancia de los contaminantes como ocurre en épocas de alta (invierno) y menor (verano) contaminación o en la ZMVM, las temporadas de lluvias (verano-otoño) y secas (invierno-primavera). Aquí son de importancia los CYP1A1 y CYP1B1, por su participación en la activación de los HAPs y a su expresión no constitutiva en células, características que los posicionan como posibles biomarcadores de exposición a HAPs y otros xenobióticos capaces de unirse al receptor AHR. Por lo tanto, el conocer la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de xenobióticos, como los CYP1A1, CYP1B1 y su factor de transcripción AHR, así como de enzimas que participan en la reparación del daño a ADN asociado al PM como ERCC1 y MGMT, en placentas de recién nacidos de la CDMX nos dará indicio del impacto de la exposición a HAPs en fetos y los probables riesgos a la salud en poblaciones residentes en ciudades industrializadas.

## 3. Hipótesis

La exposición a material particulado de la ZMVM genera cambios en la expresión en proteínas implicadas en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación de daño al ADN, incrementando los niveles de aductos en los neonatos

## 4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la expresión de RNA mensajero (mRNA) y proteínas de enzimas clave del metabolismo de HAPs y de reparación del ADN en placentas de mujeres que vivieron en la ZMVM durante su periodo gestacional y buscar asociaciones por su exposición a PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub>.

Objetivos particulares:

- Purificar ARN total de las muestras de placenta y evaluar su integridad.
- Diseñar y estandarizar las condiciones de qPCR para medir niveles de expresión.
- Medir los niveles de expresión a nivel transcrito de los genes: CYP1A1 y CYP1B1, AHR, ERCC1 y MGMT en muestras de placenta.
- Analizar la relación entre los niveles de exposición a partículas PM<sub>10</sub> Y PM<sub>2.5</sub> y los valores de expresión de CYP1A1 y CYP1B1, AHR, ERCC1 y MGMT.
- Explorar la expresión de CYP1A1 y CYP1B1 a nivel proteína.

# 5. Métodos

## 5.1 Sujetos de estudio

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de la CDMX y del Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento (CimiGEN).

Las muestras de placenta fueron obtenidas del Hospital de Ginecología y Obstetricia No.3 “Dr. Víctor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez”, del Centro Médico Nacional de la Raza durante el periodo 2014-2015 y del CimiGEN en el periodo de 2016-2017. Se reclutaron mujeres embarazadas de entre 19 - 35 años que permanecieron en su residencia cercana al hospital durante los últimos 3 meses del embarazo. Las mujeres que aceptaron participar firmaron una carta de consentimiento informado y se les aplicó un cuestionario que incluía preguntas relacionadas con domicilio, edad, escolaridad, ocupación, ingreso mensual, factores de exposición, consumo de bebidas alcohólicas y otras drogas, consumo de alimentos, además, en el cuestionario se incluyó una sección donde un médico pediatra determinó el estado general de salud del recién nacido. Los criterios de inclusión y exclusión de las muestras se muestran en la Tabla 1. Las muestras fueron inmediatamente enfriadas y transportadas al laboratorio donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Adicionalmente, las madres donaron una muestra de orina en la cual se evaluó la presencia de cotinina para descartar una condición de tabaquismo activo o pasivo.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Feto vivo	Haberse expuesto a PM ocupacionalmente
>36 semanas de gestación	Haber fumado durante el embarazo o ser usuaria de drogas ilegales
Tener edad entre 19-35 años	Al presentarse enfermedades crónicas o malformaciones en los recién nacidos
Tener nacionalidad y ascendencia mexicana	Haber dado a luz a más de un recién nacido en el parto evaluado
Que acepten participar y firmen la carta de consentimiento de colaboración	Pacientes que presenten ruptura prematura de membranas asociada a un proceso infeccioso
Haber habitado en la ZMVM durante el periodo gestacional	

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión de las participantes en el estudio.

## 5.2 Extracción de ARN de muestras de cara fetal de placenta

El ácido desoxirribonucleico(ARN) fue aislado a partir de tejido congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  según el protocolo de *TRIzol Reagent* (cat. no. 15596-026). Los cortes de la cara fetal de la placenta (50-100 mg) se realizaron aun estando congelada y después se homogenizaron en tubos *Eppendorf* en presencia de 1 mL de TRIzol®. El homogenizado fue centrifugado a 12,000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (las siguientes centrifugaciones se realizaron en las mismas condiciones). Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo dejando incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la separación de fases orgánicas, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se mezcló suavemente durante 16 segundos, después se dejó incubar durante 3 minutos y la muestra se centrifugo a  $4^{\circ}\text{C}$ , una vez que se

separaron las fases se recuperó aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de fase incolora y se transfirieron en un nuevo tubo.

El ARN se precipitó después de agregar 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío al tubo con fase incolora e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después la mezcla fue centrifugada. El sobrenadante se removió del tubo sin perturbar el *pellet* de ARN en el fondo y se agregó 1 ml de etanol al 75%. EL ARN se agitó suavemente por 16 segundos y se centrifugó a 7,500 g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el etanol del tubo, el *pellet* de ARN fue secado durante 10 minutos y se agregaron de 50-200  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, las muestras se almacenaron a -80°C.

Posterior a su extracción, las 95 muestras de ARN se cuantificaron por NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 y se comprobó que la pureza tuviera valores mayores a 1.8 de relación 260/280 y 260/230.

### 5.3 Integridad de las muestras de ARN

Para observar la integridad de las muestras de ARN extraídas, 500 ng totales de cada muestra fueron cargados en gel de agarosa al 1% p/v. La electroforesis se realizó a 80 V durante 40 minutos en presencia de buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) y al finalizar el gel fue expuesto a una solución de bromuro de etidio 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 10 minutos. El gel se colocó sobre un transiluminador (Gel Logic 200 Imaging System) y se obtuvo el patrón de bandas de ARN. El patrón de bandas fue comparado con la escala de integridad armada con 10 muestras representativas de ARN degradado a las que se les midió el número de integridad de ARN (RIN) por el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (Figura 7, A). Brevemente, el número RIN es una estimación de la integridad de una muestra de ARN calculada a partir de los electroferogramas generados durante la separación electroforética de las bandas ribosomales, la escala va de 1, que corresponde a una muestra degradada hasta 10, que corresponde a una muestra de ARN altamente íntegra. Una muestra íntegra se destaca por dos picos de absorbancia que corresponden a las subunidades

ribosomales 18S y 28S, generalmente si la muestra esta degradada se observa un decremento en el radio de ARN 28S/18S ribosomal (Figura 7, B y C). A cada muestra de ARN extraída se le asignó un número de RIN aproximado, solo muestras con RIN igual o mayor a 4 (ARN parcialmente degradado) fueron incluidas en el estudio.

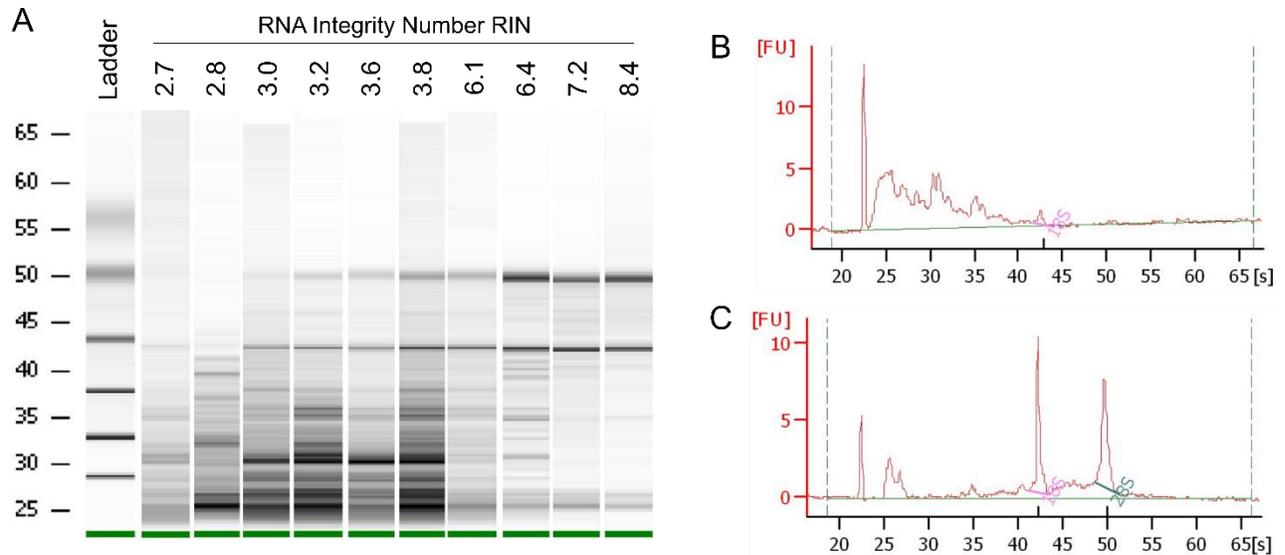


Figura 7. A) Escala de integridad de ARN ordenada de menor a mayor número RIN. B) Electroferograma correspondiente a la muestra de ARN con RIN 2.7 C) Electroferograma correspondiente a la muestra de ARN con RIN 8.4 [FU]: Fluorescencia, [s]: segundos. ARN: Ácido ribonucleico. RIN: RNA Integrity Number.

## 5.4 Retrotranscripción

Las muestras de ARN que cumplieron con las pruebas de pureza e integridad fueron empleadas para sintetizar cDNA (ADN codificante) con la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina (M-MLV) de Promega (cat. no. M1701) de la siguiente manera: partiendo de 1  $\mu\text{g}$  de ARN total por muestra se agregó 0.5  $\mu\text{g}$  de oligo dT (cat. no. C110A) y agua libre de ARNasas hasta un volumen de 18  $\mu\text{L}$ , posteriormente se homogenizó la mezcla con micropipeta. Cada muestra fue incubada a 70°C durante 7 minutos y rápidamente fue transferida a hielo. Posteriormente se agregó a cada tubo 5  $\mu\text{L}$  de M-MLV 5X *Reaction buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de

enzima M-MLV RT y 1  $\mu$ L de dNTPs (*Deoxynucleotide Triphosphates*) a 10 mM. Las muestras se incubaron a 37°C por 50 minutos, 50°C por 10 minutos. Posterior a la reacción las muestras se almacenaron a -20°C.

## 5.5 Oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de amplicones

Los oligonucleótidos para cada gen de interés junto los correspondientes para *actina- $\beta$*  fueron sintetizados por SIGMA y se diseñaron con *SnapGene full version* a partir de las secuencias de mensajeros reportadas por NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y *Ensembl*. Cada par de oligonucleótidos se diseñó para ser complementario en regiones inter-exónicas que amplificaran secuencias de ARN mensajero de 70-200 nucleótidos, que fueran de longitud  $\sim$  20 nucleótidos cada uno y se verificó que los oligos diseñados no tuvieran complementariedad con otra región del genoma con *Primer-BLAST*. Se procuró que cada par de oligos no tuviera una diferencia de temperatura *melting* mayor a 2°C y se verificó que cada oligo no formara homodímeros o heterodímeros altamente estables ( $\Delta G \geq -4$ ) con la herramienta *OligoAnalyzer* de *Integrated DNA Technologies* (IDT) (Ver Tabla 2).

Para comprobar que los oligonucleótidos amplifican la secuencia esperada se realizó una PCR punto final con Taq DNA polimerasa *Platinum* (cat. no. 10966-030), 10  $\mu$ L de cada reacción fueron cargados a un gel de agarosa al 2% p/v y las bandas se visualizaron en el transiluminador.

Gen	Secuencia 5'-3'	Longitud del oligo (nt)	Tm (°C)	Longitud del amplicón (nt)	Unión Exon-Exon
CYP1A1 (T1)	F: GGACATCACAGACAGCCTGA	20	59	148	Exón 3-4
	R: CCAGGAGATAGCAGTTGTGAC	21	55		
CYP1A1 (T2)	F: CAAGAGGAGCTAGACACAGTGATT	24	60	166	Exón 4-6
	R: AGCCTTTCAAACCTTGTGTCTCTTGT	25	61		
CYP1A1 (T3)	F: TTCCGACACTCTTCCTTCGT	20	58.6	368	Exón 5-7
	R: ATGGTTAGCCCATAGATGGG	20	56.4		
CYP1B1	F: CTGCTCCTCCTCTTCACCAG	20	59	95	Exón 1-2
	R: CCCATACAAGGCAGACGGT	19	59		
AHR	F: CCTTCTCAGTGACAGAGTCTG	22	57	131	Exón 5-6
	R: CGACATATGAAGCACCTCTCC	21	56		
MGMT	F: TACCAGCAATTAGCAGCCCT	20	58	116	Exón 4-5
	R: CTGCTGCAGACCACTCTGTG	20	59		
ERCC1	F: CTGGGAATTTGGCGACGTAA	20	57	103	Exón 3-4
	R: ATGGATGTAGTCTGGGTGCAG	21	57		
β ACTINA	F: CCAGGTCATCACCATTGGCAAT	20	58	144	Exón 4-5
	R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACG	20	60		
PPIA	F: ATGCTGGACCCAACACAAAT	20	58	97	
	R: TCTTTCACCTTGGCCAAACACC	21	58		

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para qPCR, los oligos para PPIA, incluyendo los primers T2 y T3 fueron empleados para explorar la presencia de posibles isoformas del gen de *CYP1A1*. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. PPIA: Peptidilprolil Isomerasa A. AHR: Receptor de arilos. *CYP1A1*: Citocromo P450 1A1. *CYP1B1*: Citocromo P450 1B1. *ERCC1*: Excision Repair Cross Complementing Group 1. *MGMT*: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa.

Los amplicones fueron purificados del gel de agarosa y enviados a secuenciar. Los alineamientos de los amplicones para *Actina-β*, *AHR*, *CYP1B1*, *MGMT* y *ERCC1* concordaron con la secuencia y tamaño esperado (Figura 8-12).

Por otra parte, los oligonucleótidos para *CYP1A1* generaron amplicones de ~235 nucleótidos y la secuencia indica que el amplicón contiene el intrón 3-4 (Figura 13).

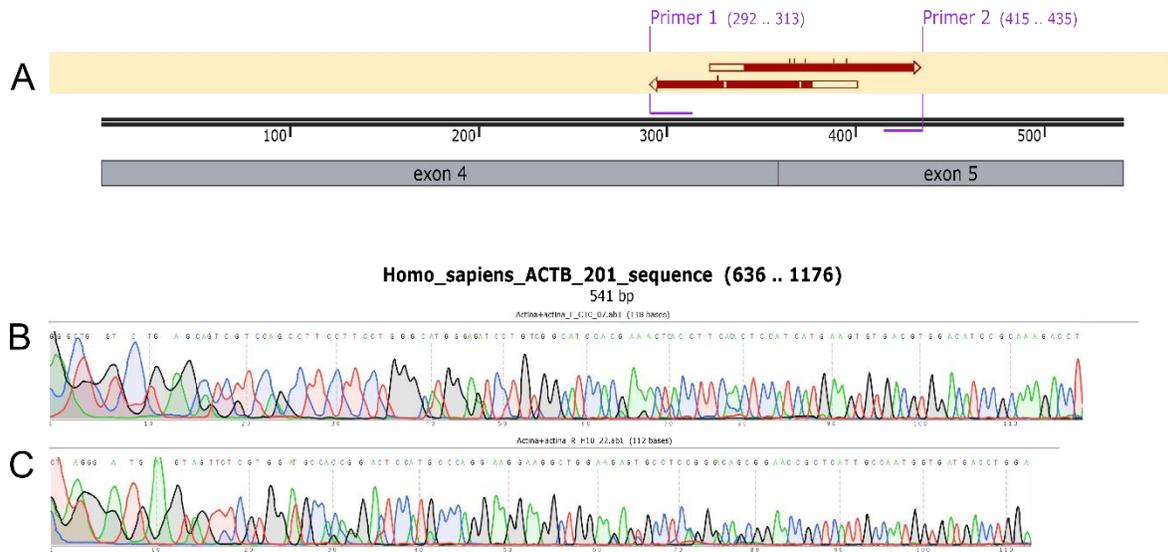


Figura 8. Secuenciación y alineamiento de Actina- $\beta$  en muestras de cDNA extraído de placenta. A) Esquema del alineamiento de la secuencia purificada, en barras grises se muestran los exones acotados por los oligonucleótidos en morado y en rojo se presenta el alineamiento de la hebra sentido (B) y antisentido (C) del amplicón de ADN. cDNA: ADN codificante. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

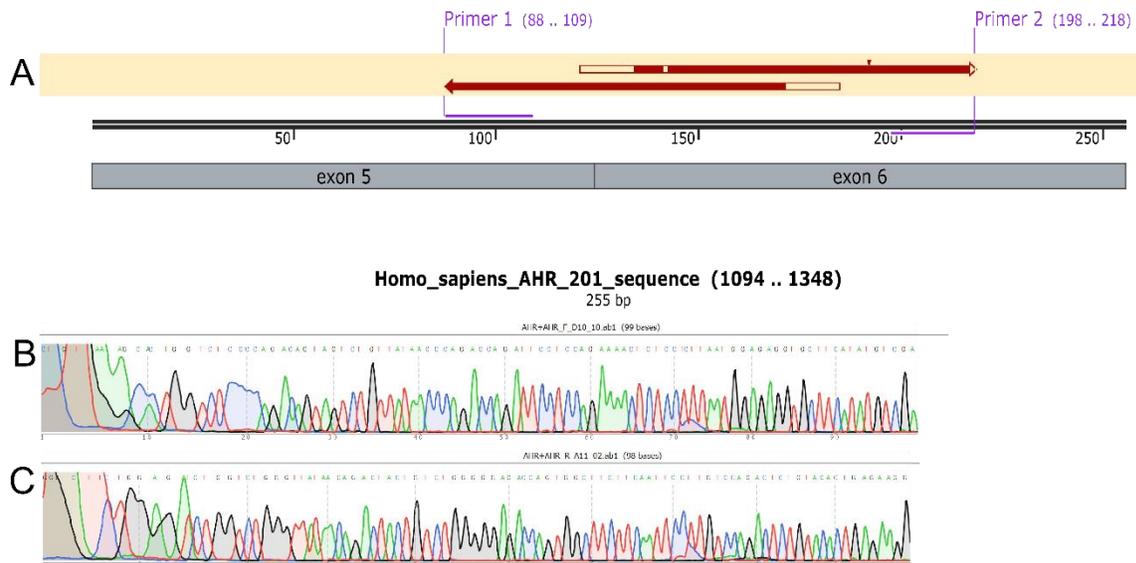


Figura 9. Secuenciación y alineamiento de AHR en muestras de cDNA extraído de placenta. A) Esquema del alineamiento de la secuencia purificada, en barras grises se muestran los exones acotados por los oligonucleótidos en morado y en rojo se presenta el alineamiento de la hebra sentido (B) y antisentido (C) del amplicón ADN. AhR: Receptor de arilos. cDNA: ADN codificante. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

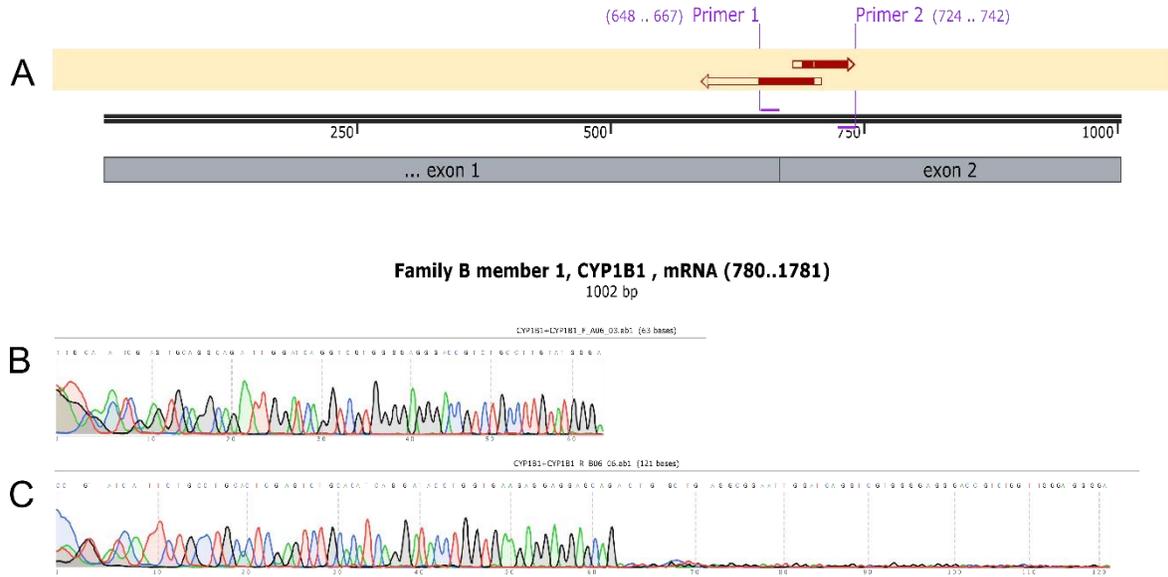


Figura 10. Secuenciación y alineamiento de CYP1B1 en muestras de cDNA extraído de placenta. A) Esquema del alineamiento de la secuencia purificada, en barras grises se muestran los exones acotados por los oligonucleótidos en morado y en rojo se presenta el alineamiento de la hebra sentido (B) y antisentido (C) del amplicón ADN. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. cDNA: ADN codificante. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

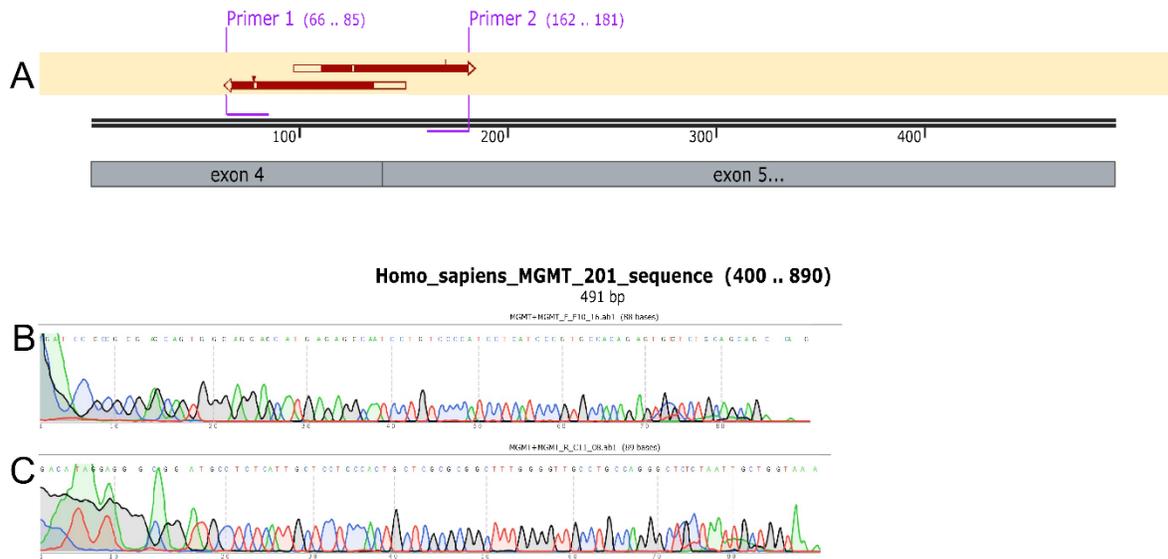


Figura 11. Secuenciación y alineamiento de MGMT en muestras de cDNA extraído de placenta. A) Esquema del alineamiento de la secuencia purificada, en barras grises se muestran los exones acotados por los oligonucleótidos en morado y en rojo se presenta el alineamiento de la hebra sentido (B) y antisentido (C) del amplicón ADN. MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa. cDNA: ADN codificante. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

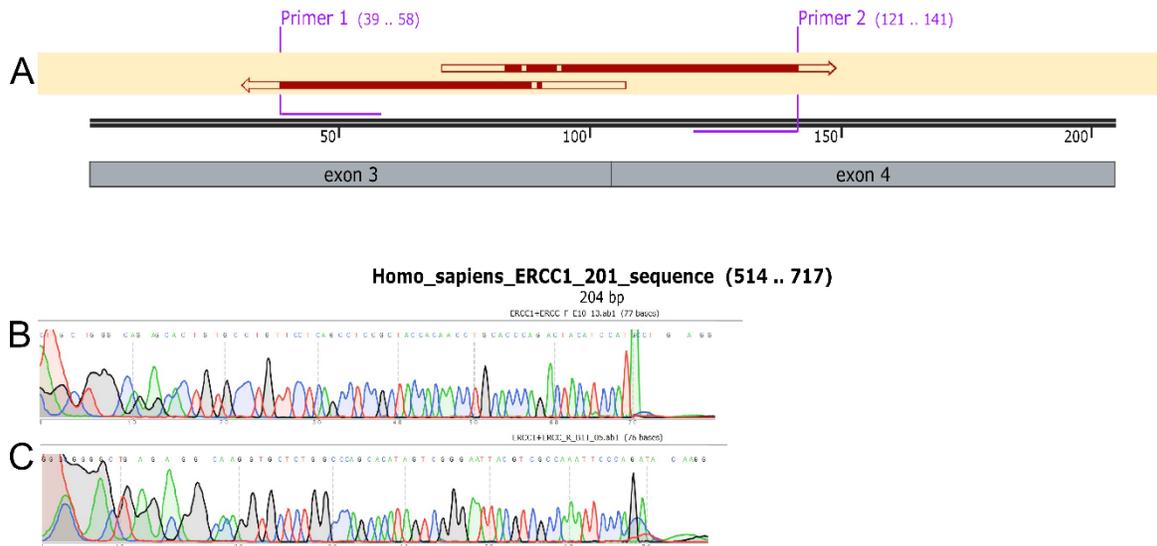


Figura 12. Secuenciación y alineamiento de ERCC1 en muestras de cDNA extraído de placenta. A) Esquema del alineamiento de la secuencia purificada, en barras grises se muestran los exones acotados por los oligonucleótidos en morado y en rojo se presenta el alineamiento de la hebra sentido (B) y antisentido (C) del amplicón ADN. ERCC1: Excision Repair Cross Complementing Group 1. cDNA: ADN codificante. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

## 5.6 Estandarización de qPCR con *Sybr green*

Para la estandarización y cuantificación del mensajero de *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AHR*, *MGMT* y *ERCC1*, se usó el kit Sybr Fast qPCR Master Mix de Kapa (cat. no. KK4602) con el equipo Rotor Gene Q (QIAGEN).

Las reacciones se prepararon según el fabricante, brevemente: se emplearon 3  $\mu$ L de cDNA, 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido (en una concentración 100nM - 500nM) y 5  $\mu$ L de *Sybr green Master Mix*.



Figura 13. Secuenciación y alineamiento de CYP1A1 en muestras de cDNA extraído de placenta. A) Esquema del alineamiento de la secuencia purificada, en barras grises se muestran los exones acotados por los oligonucleótidos en morado y en rojo se presenta el alineamiento de la hebra sentido (B) y antisentido (C) del amplicón ADN. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. cDNA: ADN codificante. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Las condiciones de termociclador fueron: Hold: 95°C durante 3 minutos; Cycling: 95°C durante 1 minuto, 63°C por 3 segundos y 72°C por 12 segundos, durante 40 ciclos; Para determinar la curva melt se programó un aumento de temperatura desde 55°C a 95°C, con incrementos de 1°C cada 5 segundos.

Las concentraciones de los oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) de cada gen se eligió probando diferentes combinaciones de oligonucleótido según indica la Tabla 3.

	R	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	5 $\mu$ M
F		1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	5 $\mu$ M
1 $\mu$ M		1 $\mu$ M/1 $\mu$ M	1 $\mu$ M/3 $\mu$ M	1 $\mu$ M/5 $\mu$ M
3 $\mu$ M		3 $\mu$ M/1 $\mu$ M	3 $\mu$ M/3 $\mu$ M	3 $\mu$ M/5 $\mu$ M
5 $\mu$ M		5 $\mu$ M/1 $\mu$ M	5 $\mu$ M/3 $\mu$ M	5 $\mu$ M/5 $\mu$ M

Tabla 3. Matriz de combinaciones de oligonucleótidos sentido y antisentido empleadas para estandarizar las condiciones de qPCR.

Debido a que las muestras se cuantificarían por el método de Ct (*Cycle threshold*) comparativo, se realizaron curvas patrón con cinco diluciones seriadas (1:4, 1:16, 1:64, 1:256 y 1:1024) de cDNA que ayudarían a comprobar que las eficiencias de reacción de cada gen evaluado fueran cercanos a un valor de 1 y a definir la dilución con la cual se cuantificarían las muestras. Todas las curvas de diluciones se corrieron en el mismo día partiendo de la misma mezcla de cDNA.

La optimización de las reacciones se realizó cumpliendo con los siguientes parámetros: Curva estándar lineal ( $R^2 > 0.980$ ); Alta eficiencia de amplificación (0.9-1.1); Consistencia en reacciones replicadas.

Cada muestra de cDNA se diluyó 1:4 y se realizaron de 2-3 réplicas, las diferencias en la expresión génica se calculó usando las siguientes fórmulas<sup>87</sup>:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ housekeeping}$$

$$\text{Diferencia de expresión con respecto al housekeeping} = 2^{-\Delta Ct}$$

Donde:

Los genes de interés son: *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AHR*, *MGMT* y *ERCC1*

El *housekeeping* es *Actina- $\beta$*

## 5.7 Determinación de aductos de ADN

Los aductos voluminosos de ADN se cuantificaron por el ensayo de *<sup>32</sup>P-postlabeling assay*<sup>88</sup>. Brevemente, 4 µg de ADN por muestra se digirieron toda la noche en una mezcla de nucleasa microcócica y fosfodiesterasa de bazo a 37°C para obtener nucleótidos independientes, posteriormente se enriquecieron las muestras en aductos mediante la digestión con nucleasa P1. Los nucleótidos fosforilados se marcaron con la fosfonucleótido cinasa T4 (Affymetryx, USA) y con 37 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Perkin Elmer, USA) durante una hora. Los aductos de ADN marcados fueron resueltos por cromatografía de capa fina multidireccional (TLC) sobre placas de polietilenimina-celulosa (Machery-Nagel, Alemania) de 10 x 20 cm. Los solventes utilizados en la TLC fueron: D1 (Fosfato de sodio 1 M, pH 6.0), D2 (Formato de litio 3.5 M, Urea 8.5 M, pH 3.5) y D3 (Cloruro de litio 0.8 M, Tris 0.5 M, Urea 8.5 M, pH 8.0). Después de la TLC, las placas fueron analizadas utilizando un contador de centelleo LS 6500 (Beckman-Coulter, EE. UU.) y los niveles de aductos de ADN (RAL; *relative adduct labeling*) se calcularon a partir de los conteos por minuto (CPM) de aductos, la actividad específica de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (usando 30 fmol de dAMP como estándar de marcaje) y la cantidad de ADN usada. Todas las muestras fueron analizadas al menos dos veces [Binkova et al., 1994]. Un estándar de ADN modificado con BPDE fue obtenido exponiendo células HepG2 (Línea celular de cáncer de hígado humano) a 4 µM de BAP por 24 horas, y fue usado como control positivo. Los niveles de aductos de ADN se midieron en la zona radiactiva diagonal (DRZ) de las placas de TLC. Los resultados se expresaron como aductos de ADN / 10<sup>8</sup> nucleótidos<sup>89</sup>.

## 5.8 Purificación de microsomas y cuantificación de proteína

Las placentas fueron descongeladas en hielo y posteriormente lavadas con buffer de lisis pH 7.4 frío (Tris Base 50 mM, KCl 150 mM, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, inhibidor de proteasas SIGMA) manteniendo

condiciones de esterilidad. Se cortaron 3 gramos de tejido placentario rosa, evitando tomar el tejido conectivo, y se homogenizó en presencia de buffer de lisis. Los homogenizados fueron centrifugados a 9,000 g a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100.000 g a 4°C durante una hora. El pellet fue recuperado y reconstituido en buffer de sacarosa pH 7.4 (Tris Base 50 mM, sacarosa 250 mM e inhibidor de proteasas SIGMA); La mezcla fue posteriormente centrifugada a 32,500 RPM durante una hora y el pellet se reconstituyó en 1 mililitro de buffer de preservación pH 7.4 (Tris Base 50 mM, EDTA 1mM, DTT 0.1 Mm, Glicerol 20% v/v e inhibidor de proteasas SIGMA), por último, los microsomas fueron alícuotados y almacenados a -80°C.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford. Brevemente, se realizaron diluciones 1:20 de los microsomas con agua estéril y se cargaron 10 µL de la dilución en placas de 96 pozos junto con 200 µL de dilución de reactivo de Bradford (Bio-Rad Cat. #500-0006) 1:4 anteriormente filtrado con Whatman #1. Las muestras fueron leídas a 595 nm de absorbancia en el espectrofotómetro Synergy H4. Las lecturas fueron extrapoladas con una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA) con los puntos: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL.

## 5.9 Inmunodetección por Western Blot

Para la inmunodetección de los citocromos CYP1A1 Y CYP1B1 y el gen constitutivo ACTINA-β, se separaron 30 µg de microsomas con electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), posteriormente las bandas de proteína se electro-transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad Cat.#1620115) durante una hora y 15 minutos a 100 V. Para evitar la unión inespecífica de anticuerpos, las membranas se bloquearon durante una hora en una solución de BSA al 5% y T-TBS (Tris Base 200 mM, NaCl 1.37 M, HCl 1N, Tween-20 1%). Las membranas se incubaron con anticuerpo primario de la siguiente forma: CYP1A1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-393979) a una dilución de

1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente; CYP1B1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-32882) a una dilución de 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente; ACTINA- $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) a una dilución de 1:1000 durante 20 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se incubó de la siguiente forma: Anti-rabbit (Invitrogen, Lot. 629130A), dilución de 1:5000 durante una hora; Anti-mouse (Invitrogen, Lot. RK241984), dilución de 1:5000 durante una hora para CYP1A1 y 20 minutos para ACTINA- $\beta$ . La presencia de las proteínas se determinó por quimioluminiscencia exponiendo las membranas en luminol (GE Amersham, Lot.16919972) y en 3 tiempos de exposición durante 30 segundos, las imágenes se colectaron en el fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System. Los análisis densitométricos se realizaron con el software ImageJ (Wayne Rasband, NIH, MD, EUA).

#### 5.10 Determinación de la actividad EROD

La actividad etoxirresorufina *O*-desetilasa (por sus siglas en inglés, *EROD*), es un biomarcador bien establecido de la exposición a HAPs y otros compuestos con estructura plana. Describe la velocidad de formación de resorufina a partir del 7-etoxirresorufina (7-ER) mediada por el CYP1A1, donde la actividad catalítica — captada en forma de fluorescencia — en torno al sustrato es un indicador de la cantidad de enzima.

Para el ensayo, se realizó una curva patrón con resorufina a concentraciones de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol. La resorufina fue pesada y diluida en buffer Tris-base 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM en un volumen final de 200  $\mu$ L. Paralelamente las muestras para la reacción enzimática se prepararon de la siguiente manera: 1  $\mu$ M del sustrato 7-ER disuelto en DMSO (Dimetilsulfóxido), buffer pH 7.6 (Tris-base 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM), 80  $\mu$ g de proteína microsomal de placenta para la determinación de CYP1A1. La mezcla fue incubada por 3 min a 37 °C, y posteriormente se comenzó la reacción enzimática al adicionar NADPH

(Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) 2.5 mM disuelto en buffer llegando a un volumen final de reacción de 200  $\mu$ L. La formación de resorufina se evaluó durante 60 min a 37 °C registrando lecturas en intervalos de 20 segundos a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm en el fluorómetro Synergy H4. Las determinaciones de actividad enzimática para cada concentración de inhibidor se realizaron por triplicado y los resultados de actividad se expresan en fluorescencia sobre tiempo.

### 5.11 Monitoreo ambiental

Para estimar la exposición gestacional a  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  se usaron datos publicados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (RAMA). Brevemente, los archivos de emisiones diarias para  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  fueron descargados de la página: <http://www.aire.cdmx.gob.mx/> y se calculó el promedio de emisiones diarias por mes de las estaciones de monitoreo localizadas cerca de las áreas residenciales de las voluntarias. Las estaciones que colectaron los datos de emisiones en los años 2014-2015 de  $PM_{10}$  fueron: Acolman, Atizapán, Camarones, Cuautitlán, FES Acatlán, Hospital General de México, Iztacalco, Merced, San Agustín, Tlalnepantla, Tultitlán, Villa de las Flores y Xalostoc. Las estaciones que colectaron los datos de emisiones de  $PM_{2.5}$  fueron: Camarones, Hospital General de México, Merced, San Agustín, Tlalnepantla y Xalostoc.

Los datos de emisiones en los años 2016-2017 de  $PM_{10}$  fueron: Acolman, Ajusco Medio, Benito Juárez, Cuajimalpa, Hospital General de México, San Agustín, Tláhuac, UAM Iztapalapa y Xalostoc. Las estaciones que colectaron los datos de emisiones de  $PM_{2.5}$  fueron: Ajusco Medio, Benito Juárez, Hospital General de México, San Agustín, UAM Xochimilco, UAM Iztapalapa y Xalostoc. Las medianas por mes  $\pm$  IQR de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  de los años 2014 - 2016 fueron estimados con los datos de la RAMA y se utilizaron en los análisis.

## 5.12 Análisis estadísticos

Los promedios de la edad materna, semanas de gestación, peso al nacer y los niveles de emisión mensuales de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  fueron calculados. Las medianas para ambos tamaños de PM fueron estimadas para el último mes de gestación, el último bimestre y trimestre de gestación, incluyendo los tres trimestres de gestación y el embarazo completo. La asociación entre los niveles de expresión de los diferentes genes contra la exposición a  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$  y contra el nivel de aductos en leucocitos de sangre periférica de la madre y de cordón umbilical, fue explorada por medio del análisis de coeficiente de correlación de Spearman. Para comparar los niveles de expresión génica en los neonatos nacidos en época lluviosa (junio - octubre) contra época seca (noviembre - mayo) se usaron pruebas de  $t$  de Student, o se aplicó el análisis de U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con R 3.6.1 y GraphPad Prism 7.

## 6. Resultados

### 6.1 Población de estudio

Las muestras analizadas en este estudio cumplieron con todos los criterios de inclusión e incluyen dos cohortes: Cohorte de la zona norte o “La Raza” y cohorte de la zona sureste o “CIMIGen”. Posterior a la extracción de ARN de 106 muestras, se determinó que 60 cumplieron con un RIN >4. El promedio de la edad gestacional de los recién nacidos fue  $38.96 \pm 1.21$  semanas, 41% de los neonatos fue del sexo femenino, el promedio del peso al nacimiento de los niños de las cohortes fue de  $3147 \pm 459.2$  gramos y el promedio de la longitud al nacimiento fue de  $49.86 \pm 1.92$  centímetros. Todos los parámetros perinatales analizados se consideran normales para los nacimientos a término.

En cuanto a las madres voluntarias, su edad promedio fue de  $27.89 \pm 5.21$  años, 53% respondió ser empleada. Finalmente, ninguna de las mujeres declaró exponerse a humo de tabaco durante el embarazo, lo cual fue corroborado con la prueba de cotinina. (Ver tabla 4).

### 6.2 Las concentraciones de partículas son fluctuantes a través de las estaciones

La estimación de las emisiones de material particulado se realizó con base al reportado por García-Suastegui, 2011. Los datos de emisiones diarias de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  generados por la RAMA entre los años 2014 al 2016 se estimaron calculando el promedio mensual (Figura 14).

Número de voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión	106
Número de muestras que cumplieron con el límite de integridad	60
Edad gestacional del recién nacido (semanas; media $\pm$ DE)	38.96 $\pm$ 1.21
Sexo del recién nacido (n, %)	
<i>Mujeres</i>	25 (41.66%)
<i>Hombres</i>	34 (56.66%)
<i>No reportado</i>	1 (1.66%)
Peso al nacer del recién nacido (gr; media $\pm$ DE)	3147 $\pm$ 459.2
Longitud al nacer del recién nacido (cm; media $\pm$ DE)	49.86 $\pm$ 1.92
Edad de la madre (años; media $\pm$ DE)	27.89 $\pm$ 5.21
Ocupación de la madre/exposición a PM (n, %)	
Empleada	32 (53.33%)
Ama de casa	24 (40.0%)
No reportado	4 (6.66%)
Exposición al humo de tabaco	0
Muestras de orina positivas a cotinina (>200 ng/ml)	0

Tabla 4. Características demográficas de la población de estudio. Todos los parámetros perinatales analizados se consideran normales para nacimientos a término.

Las emisiones de PM<sub>2.5</sub> permanecieron con concentraciones por encima de la recomendada por la Norma Oficial Mexicana: NOM-025-SSA1-2014 para promedios anuales, durante el periodo evaluado. Mientras que las emisiones de PM<sub>10</sub> fluctuaron durante el tiempo de muestreo, puede observarse que especialmente las concentraciones de PM<sub>10</sub> disminuyen durante los meses de mayo-octubre, lo cual corresponde con la estación lluviosa del año, y que las mayores concentraciones corresponden con la estación seca (noviembre-abril). Es de interés observar que durante estos meses las emisiones de PM también superaron los promedios anuales recomendados por la norma mexicana.

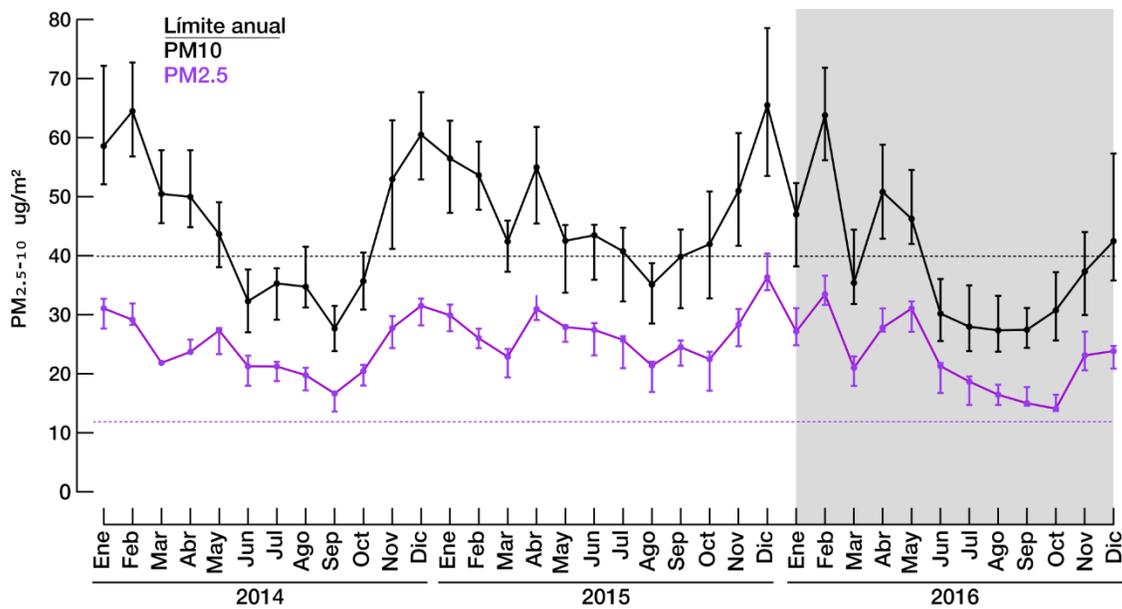


Figura 14. Variación estacional del PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> durante los años 2014-2016 según la RAMA. En sombreado gris se muestra el inicio del periodo de muestreo en el hospital CIMIGen. Existe una mayor cantidad de partículas durante noviembre-abril (estación seca), estas concentraciones disminuyen en los meses de mayo-octubre, periodo que corresponde con la estación lluviosa. Las concentraciones mensuales para cada tamaño de partícula se graficaron por promedio mensual y rango intercuartil. PM<sub>10</sub>: Partículas gruesas de 10 a 2.5 micrómetros. PM<sub>2.5</sub>: Partículas finas de hasta 2.5 micrómetros. RAMA: Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México CimiGEN: Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento.

### 6.3 Las madres voluntarias estuvieron expuestas a altas concentraciones de partículas durante el embarazo

La estimación de la exposición maternal a partículas se estimó obteniendo los valores de las estaciones de monitoreo cercanas a la residencia de las voluntarias y para realizar un estimado de la exposición personalizado, se tomó en consideración la fecha de nacimiento y los meses de gestación.

Para ambos tamaños de partícula, durante el segundo y el tercer trimestre, la exposición fue mayor en voluntarias de La Raza en comparación con las voluntarias del CIMIGen, salvo por el primer trimestre, cuando la media de exposición a PM<sub>10</sub>

en madres del CIMIGen fue de  $49.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Raza=  $40.24 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), y la exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  fue de  $26.42 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Raza=  $22.03 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Las madres de ambas cohortes que participaron en el estudio estuvieron expuestas durante todo el embarazo a concentraciones de  $\text{PM}_{2.5}$  por encima del promedio anual recomendado en la NOM ( $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). De manera similar, la mayoría de las voluntarias estuvieron expuestas a concentraciones de  $\text{PM}_{10}$  que superaron el límite promedio anual recomendado de  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en la Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014. (Figura 15).

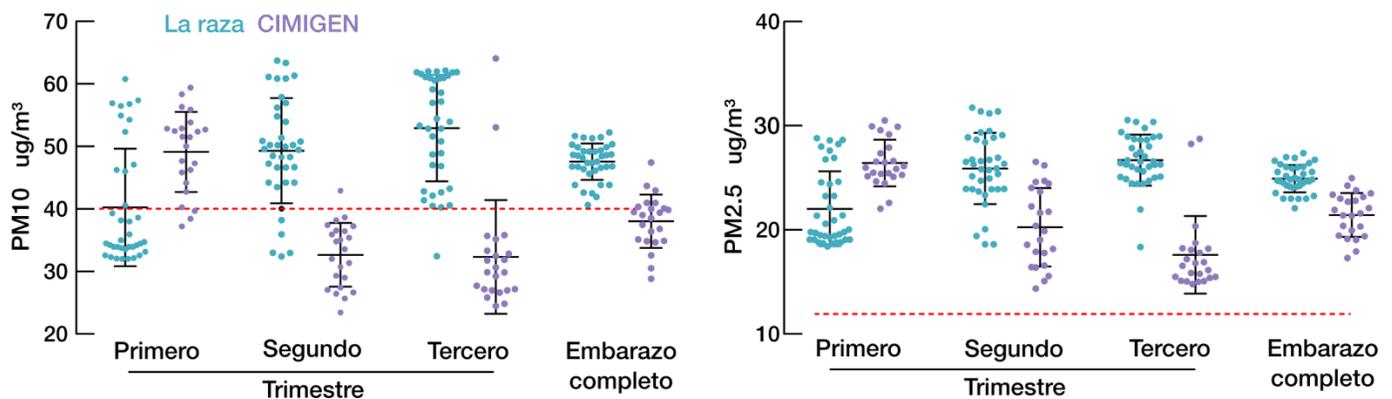


Figura 15. Exposición materna a  $\text{PM}_{10}$  y  $\text{PM}_{2.5}$  en muestras de La Raza (puntos azules) y CIMIGEN (puntos purpura) durante los tres trimestres de gestación y todo el embarazo. Con base a la residencia de las voluntarias, las estimaciones se realizaron empleando la fecha de nacimiento de los neonatos, el número de semanas de gestación y las concentraciones de PM de acuerdo con la RAMA. La línea punteada en rojo marca el límite anual recomendado en la Norma Mexicana NOM-025-SSA1-2014. Las voluntarias del hospital CIMIGEN estuvieron menos expuestas a PM durante todo el embarazo en comparación con las voluntarias de la Raza, a excepción del primer trimestre de embarazo. La exposición a partículas por ventana gestacional se graficó por promedio y desviación estándar.  $\text{PM}_{10}$ : Partículas gruesas de 10 a 2.5 micrómetros.  $\text{PM}_{2.5}$ : Partículas finas de hasta 2.5 micrómetros. RAMA: Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México. CimiGEN: Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento. PM: Material Particulado.

## 6.4 CYP1A1 es poco abundante en placenta a término

La expresión a nivel mRNA de los genes de metabolismo de hidrocarburos y reparación del ADN fue explorada en muestras de placenta fetal. La amplificación por PCR se efectuó con los *primers* de la Tabla 2 y como molde, un pool de cDNA proveniente de ARN extraído de 20 placentas. Usando como control de carga  $\beta$  Actina, se observó que los genes *MGMT*, *ERCC1* y *AHR* se expresan en placenta a término y los tamaños de amplicón fueron los esperados (Figura 16). Por otra parte, los genes de *CYP1A1* y *CYP1B1* se expresan con menos intensidad (Figura 16). El amplicón de *CYP1B1* fue el esperado de 95 pares de bases (pb), pero en el caso de *CYP1A1*, se observó un amplicón de aproximadamente 230 pb. Por medio de la secuenciación Sanger, se determinó que el amplicón contenía el intrón 3-4 (Figura 13).

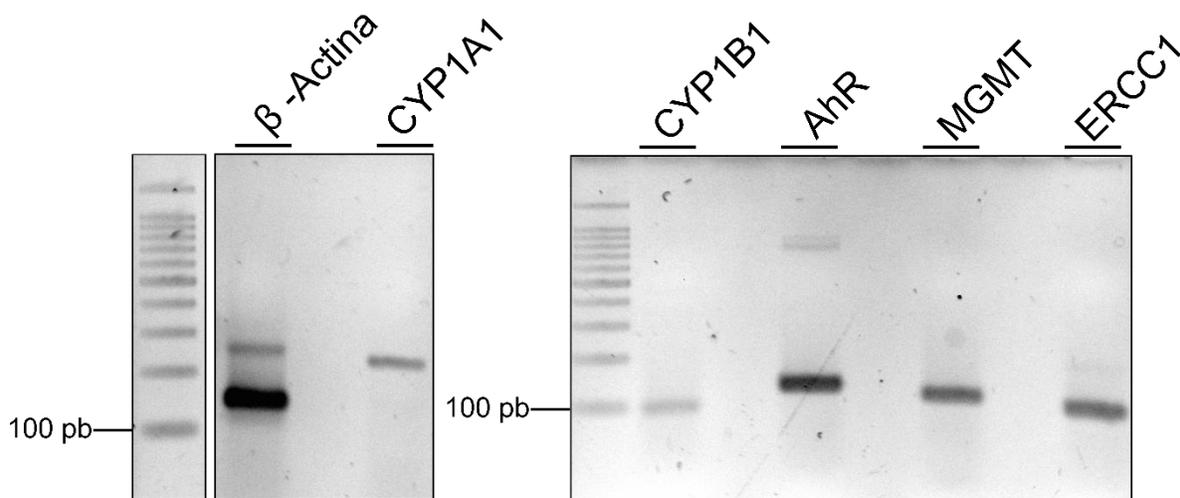


Figura 16. Electroforesis de los amplicones obtenidos por PCR punto final de muestras de cDNA de placenta. Se uso como molde una mezcla de 40 muestras de cDNA de placenta y se observó que todos los genes analizados se expresan en placenta a término. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. cDNA: ADN codificante. AHR: Receptor de arilos. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ERCC1: Excision Repair Cross Complementing Group 1. MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa.

Debido a que el amplicón de *CYP1A1* obtenido de los primers inter- exón T1 mostraba conservar el intrón 3-4, decidimos probar un segundo par de primers, esta vez, diseñados para amplificar un fragmento de 166 pb, que incluía regiones de los

exones 4, 5 y 6 (T2). Sin embargo, tal como se observó con el primer set de oligonucleótidos, el fragmento resultante coincide con el tamaño de una secuencia que incluye el intrón 5-6 de aproximadamente 311 pares de bases (Ver figura 17, B y C).

Para descartar que los primers estuvieran amplificando secuencias de ADN genómico o que existiesen isoformas en placenta distintas a la reportada como CYP1A1 201 en *Ensembl*, se corrieron reacciones de PCR paralelas, empleando un control positivo de cDNA proveniente de la línea celular de cáncer de mama humano (MCF7) y tres muestras de cDNA de placenta correspondientes a tres recién nacidos que nacieron durante la estación seca. Se emplearon los dos sets de primers antes analizados, junto con uno adicional que amplifica una secuencia de 368 pb, abarcando desde el exón 5 al 7 (T3). Además de realizar el experimento con muestras ARN extraídas como habitualmente, se trataron las mismas muestras de ARN con DNasa I (Desoxirribonucleasa I). Para demostrar que el ARN que se empleó en el experimento no estaba degradado, se amplificó además el gen de la peptidilprolil isomerasa A (*PPIA*), un gen constitutivo. Las secuencias amplificadas de *CYP1A1* con los tres sets de primers en células MCF7, junto con el gen de *PPIA*, mostraron los tamaños esperados de amplicón, y se observó que no hay diferencias en los patrones de bandas entre las muestras tratadas y no tratadas con DNasa. Por otra parte, aunque en las tres muestras de placenta amplificó el gen constitutivo de *PPIA*, demostrando que el ARN usado en las reacciones de PCR estaba intacto, no pudo detectarse ningún amplicón correspondiente a CYP1A1 201 en estas tres placentas. (Ver figura 17, D)

## 6.5 Los niveles de expresión de CYP1A1 y CYP1B1 correlacionan con la exposición materna a PM

Previo al análisis de expresión por qPCR, se comprobó que la técnica detectará el mensajero de CYP1A1 en muestras de placenta empleando los oligonucleótidos T1 —ya que fueron los más eficientes en amplificar la secuencia— y se procedió a

medir la expresión de los citocromos y el resto de los genes en las muestras (Ver anexo 1).

Una vez que los datos de expresión fueron calculados se aplicaron pruebas de correlación de Spearman o Pearson, contra los valores de exposición a partículas  $\leq 10$  y 2.5 micrómetros durante las ventanas gestacionales: último mes, últimos dos meses, últimos tres meses y también primero, segundo y tercer trimestre y durante todo el embarazo (Figura 18).

Los genes de la vía de metabolismo de HAPs, fueron detectados en las placentas fetales a término. Ninguna asociación fue significativa contra *AHR* y los niveles de partículas. En el caso del citocromo 1A1, el mensajero no fue detectado en 18 de las 60 muestras de placenta analizadas y dichas muestras no fueron incluidas en el análisis de correlación. No obstante, las asociaciones que se establecieron entre los citocromos 1A1 y 1B1 contra el nivel de PM fueron significativas ( $p < 0.0001$ ,  $\rho = 0.40 - 0.75$ ) y se asociaron negativamente durante todo el embarazo y en las distintas ventanas gestacionales analizadas a excepción del primer trimestre donde la asociación registrada fue positiva ( $\rho = 0.37 - 0.47$ ) contra la exposición a partículas (Figura 18, A).

Por otra parte, los genes asociados a reparación del ADN, *ERCC1* y *MGMT*, también fueron detectados en placentas a término, lo que infiere que las vías de escisión de nucleótidos y de daño por metilaciones al ADN estaban activas al momento del parto, aunque no se observaron cambios en los niveles de *ERCC1* y *MGMT* asociados a la exposición a partículas en los análisis de población completa (CimiGEN+Raza), ni en los análisis por cohorte del CimiGEN o La Raza.

Los resultados de estudio anterior realizado en individuos fumadores nos sugirieron que la inducción de la variante *MGMT* (rs12917) está relacionada con la exposición a HAP y la formación de aductos, y debido a que ambas cohortes provienen de hospitales separados por aproximadamente 17 kilómetros, realizamos análisis por cohortes separadas de la Raza y el CimiGEN, ya que hipotetizamos que las fuentes de origen de emisiones atmosféricas no son las mismas. De los análisis observamos que para los datos provenientes de La Raza no existían asociaciones entre la

expresión de *MGMT* y partículas en las diferentes ventanas gestacionales, sin embargo, derivado del análisis con los datos del CimiGEN, se observó que la expresión de *MGMT* correlacionó de manera positiva contra  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  durante el tercer trimestre de embarazo :  $PM_{10}$  ( $\rho= 0.4328$ ,  $p=0.0391$ ) y  $PM_{2.5}$  ( $\rho= 0.422971$ ,  $p= 0.0444$ ). En los últimos dos meses de gestación se observó una correlación positiva exclusivamente contra el  $PM_{2.5}$  ( $\rho: 0.4325$ ,  $p=0.0393$ ). Y durante el último mes de gestación, la expresión correlacionó con ambos tamaños de partícula:  $PM_{10}$  ( $\rho= 0.4167$ ,  $p=0.0479$ ) y  $PM_{2.5}$  ( $\rho= 0.440$ ,  $p= 0.0354$ ). (Figura 18, C).

## 6.6 Los aductos en sangre materna y fetal correlacionan con la expresión de *CYP1A1* y *MGMT*

Se cuantificaron los aductos en sangre periférica materna y sangre de cordón umbilical al momento del parto. La media de los aductos de ADN materno fue de 1.164 (RI: 0.908, 1.42) y la media de aductos en el ADN sangre de cordón umbilical fue de 1.471 (RI: 1.165, 1.778) por cada  $10^8$  nucleótidos. Los niveles de aductos detectados en el ADN de sangre de cordón no fueron significativamente distintos de los detectados en la sangre periférica de la madre (Mann Whitney test,  $p=0.0691$ ) y derivado de la correlación de Spearman entre los niveles de aductos en el ADN de la madre contra los aductos detectados en cordón umbilical y se observó una correlación significativa y positiva ( $\rho: 0.5653$ ,  $p<0.0001$ ; Figura 19, B), lo que sugiere que existe transferencia activa de HAPs o de sus metabolitos a través de la placenta hacia el feto.

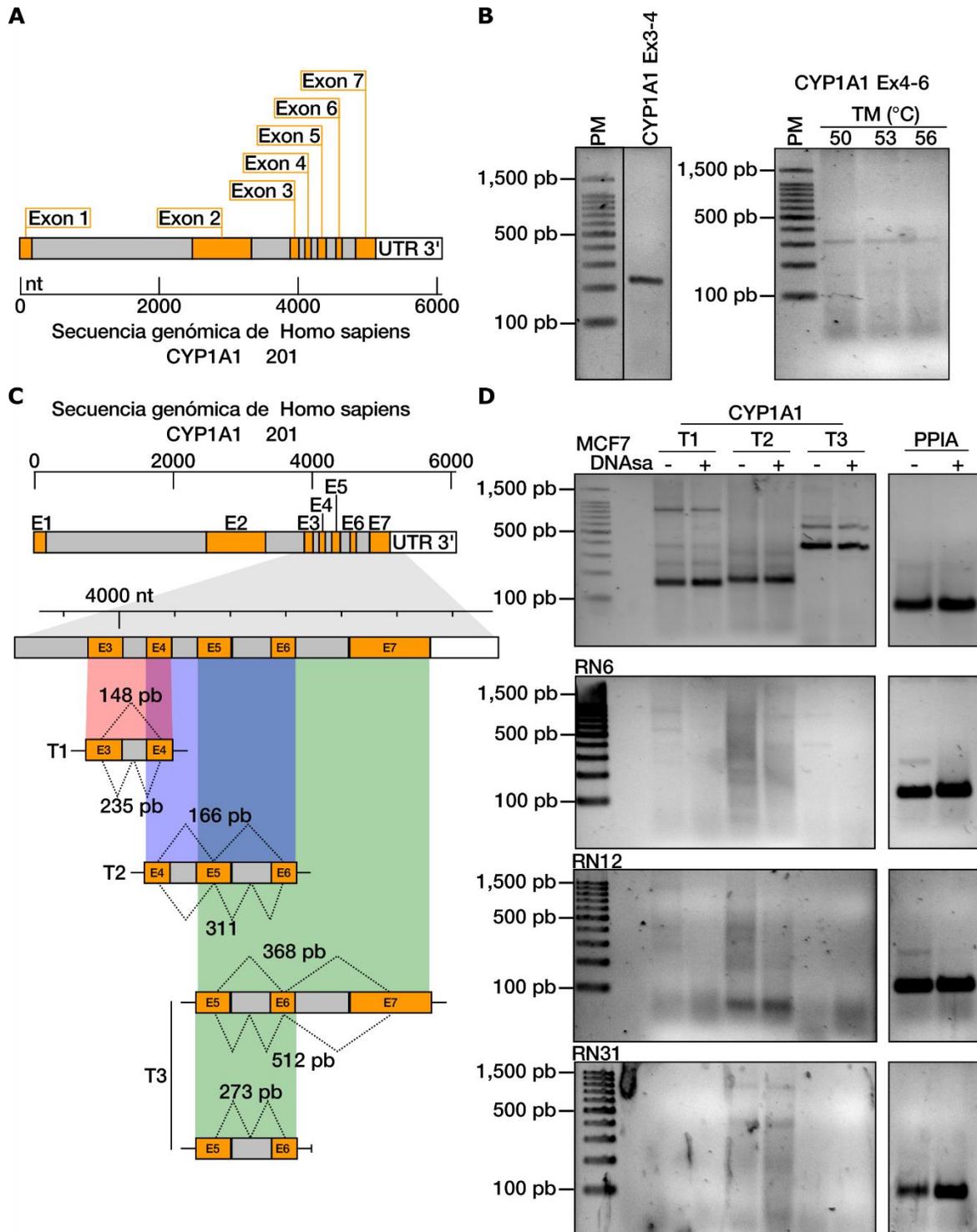


Figura 17. Análisis de la expresión de CYP1A1 placenta. A) Esquema del gen de CYP1A1 humano (CYP1A1 201, Ensembl) B) Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de CYP1A1 con primers T1 que amplifican las regiones inter-exón 3-4 (izquierda) y T2, que amplifican la región inter-

exón 4-6 (Derecha). C) Esquema de los amplicones generados por los primers T1-T3 con base a la estructura del gen de CYP1A1. D) Electroforesis de los amplicones generados con los primers T1-T3 en muestras de células MCF7 y tres placentas fetales. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. MCF7: Línea celular de cáncer de mama humano. PM: Material Particulado. DNasa 1: Desoxirribonucleasa I. PPIA: Peptidilprolil Isomerasa A.

Se exploraron las asociaciones entre los niveles de aductos y la expresión de los genes que participan en el metabolismo de xenobióticos y la reparación de ADN (Figura 19, A). Tal como se observó en la asociación con partículas, en datos conjuntos de La Raza y el CimiGEN, CYP1A1 conserva una correlación significativamente negativa ( $\rho = -0.4602$ ,  $p = 0.0022$ ), esta vez con respecto a los aductos detectados en sangre de cordón umbilical. Por otra parte, la expresión de MGMT muestra una correlación positiva y significativa contra los niveles de aductos de cordón umbilical ( $\rho = 0.416$ ,  $p = 0.048$ ), solo en el análisis donde se incluyeron los datos de las voluntarias del CimiGEN.

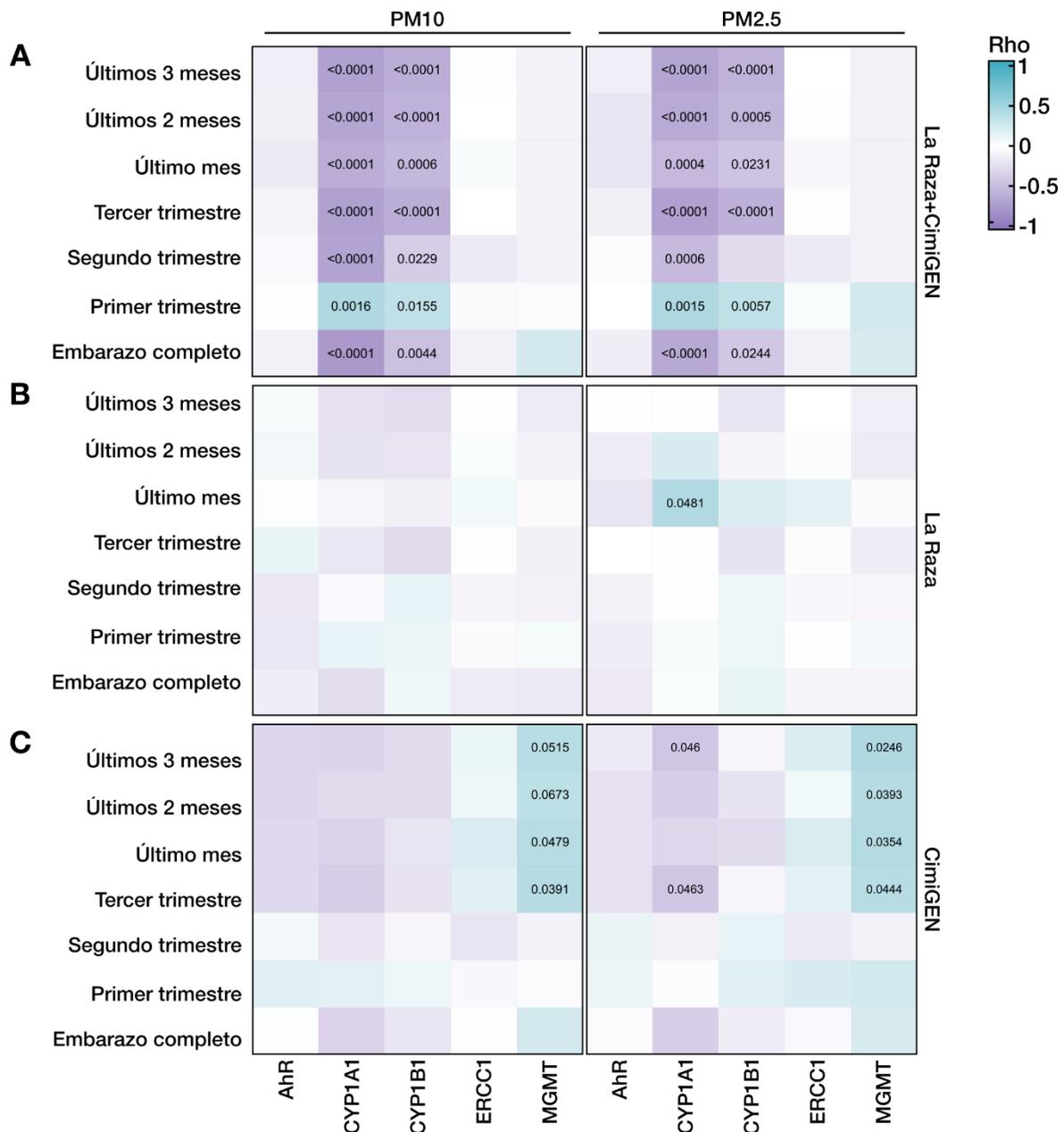


Figura 18. Correlaciones entre la exposición materna a PM10 y PM2.5 y los valores de expresión (2-DelthaCT) de AHR, CYP1A1, CYP1B1, ERCC1 y MGMT en placenta de las voluntarias del hospital de La Raza y El CIMiGen. Las asociaciones más fuertes con respecto al PM fueron las de los citocromos 1A1 y 1B1, en todos los periodos de gestación (La Raza+CimiGEN). Solo fue observada una correlación positiva con respecto a PM y los citocromos durante el primer trimestre de embarazo. MGMT mostro asociaciones positivas y significativas contra la exposición a PM principalmente durante el tercer trimestre de embarazo (CimiGEN). Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y se aplicaron correlaciones de Spearman o Pearson de dos colas, n=42 (los valores dentro de los recuadros de los *heatmaps* indican el valor de asociado de *p*). PM<sub>10</sub>: Partículas gruesas de 10 a

2.5 micrómetros. PM<sub>2.5</sub>: Partículas finas de hasta 2.5 micrómetros. AHR: Receptor de arilos. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ERCC1: Excision Repair Cross Complementing Group 1. MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa.

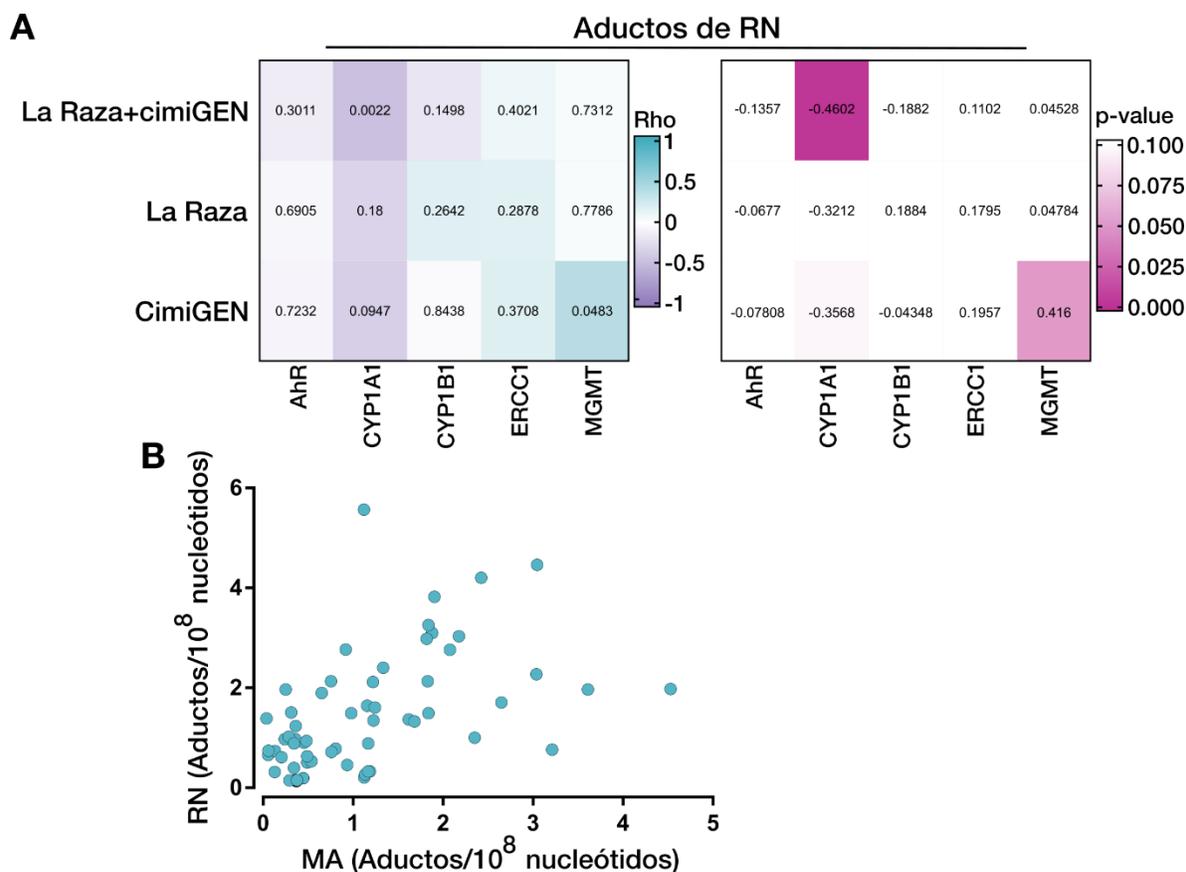


Figura 19. Correlación de los niveles de aductos de sangre de cordón umbilical contra la expresión de CYP1A1, CYP1B1, AHR, ERCC1 y MGMT en placentas de voluntarias del hospital de La Raza y CimiGEN. Se observó una correlación negativa del nivel de mRNA de CYP1A1 con los niveles de aductos. Análisis similares fueron efectuados con las poblaciones por separado y se observó una correlación positiva contra los niveles de MGMT, exclusivamente en la población del CimiGEN. Spearman o Pearson de dos colas, n=42 (A. Izquierda, los valores dentro de los recuadros de los *heatmaps* indican el valor de asociado de *p*; Derecha, los valores dentro de los recuadros de los *heatmaps* (rosa) indican el valor de asociado de *rho*). AHR: Receptor de arilos. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ERCC1: *Excision Repair Cross Complementing Group 1*. MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa. mRNA: ARN mensajero. CimiGEN: Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento.

## 6.7 La expresión de los citocromos 1A1 y 1B1 varía con respecto a la estación en la que ocurre el parto

Ya que las asociaciones con partículas fueron más comunes durante el tercer trimestre (como se observó con los genes: *CYP1A1*, *CYP1B1* y *MGMT*), exploramos como los niveles de expresión de todos los genes podían relacionarse con la estación en la que ocurrió el parto, tomando como referencia los días de los últimos tres meses de embarazo. Para esto, identificamos el rango de tiempo entre el día del parto y tres meses antes, contamos los días que correspondían a la estación seca de noviembre-abril o a la estación lluviosa, de mayo-octubre, y separamos la población de La Raza+CimiGEN en dos grupos “Húmeda” y “Seca”.

Primeramente, se analizaron los niveles de aductos detectados en leucocitos de sangre periférica de las madres entre estos dos grupos y se observó que los aductos eran más elevados durante la estación seca ( $p=0.0045$ , Figura 20, A) en comparación con la estación lluviosa y este mismo comportamiento se observó en los aductos detectados en sangre de cordón umbilical ( $p=0.0003$ ). De manera interesante, y como se ha reportado anteriormente (Maciel, 2019), encontramos que los aductos en la sangre de cordón umbilical de los recién nacidos de la época seca eran significativamente más altos que los encontrados en los leucocitos de las madres ( $p=0.0285$ ), sin embargo, esta diferencia no fue observada cuando se compararon los aductos de las madres e hijos de la estación lluviosa ( $p=0.309$ ), aunque se observa una tendencia en la que los aductos del recién nacido superan a los de la madre. De manera general se observó que los aductos generados en sangre de la madre y el feto reflejan la exposición a  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  durante el tercer trimestre de embarazo (Figura 20, B y C), ya que a mayor exposición a material particulado mayor la cantidad de aductos detectada.

Posteriormente, analizamos los niveles de expresión de los genes relacionados con el metabolismo de HAPs con respecto a la estación de nacimiento (Figura 20, D - F). No encontramos diferencias en la expresión de mRNA de *AHR* en ambos grupos analizados, pero sí pudo observarse que los niveles de los citocromos *1A1* y *1B1*,

varían significativamente entre el grupo de la estación seca contra la húmeda (*CYP1A1*  $p < 0.0001$ ; *CYP1B1*  $p < 0.0001$ ). Un aspecto sorprendente que surge del análisis es que el promedio de la expresión de *CYP1A1* del grupo de la estación húmeda fue de hasta 34 veces mayor que el promedio de la expresión en la estación seca (media de la expresión de *CYP1A1* en los individuos de la estación seca ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) = 0.0097,  $n=20$ ; Estación húmeda = 0.3362,  $n=22$ ). De manera similar el promedio de la expresión de *CYP1B1* en el grupo de la estación húmeda es 31 veces mayor en comparación con la observada en el grupo de la estación seca (media de la expresión de *CYP1B1* en los individuos de la estación seca ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) = 0.0066,  $n=33$ ; Estación húmeda = 0.021,  $n=27$ ). Finalmente, exploramos si la expresión de los genes de reparación del ADN cambia con respecto a la estación del año, pero no se observó ninguna diferencia significativa entre los valores de los grupos de la estación seca y estación húmeda (Figura 20, G,H).

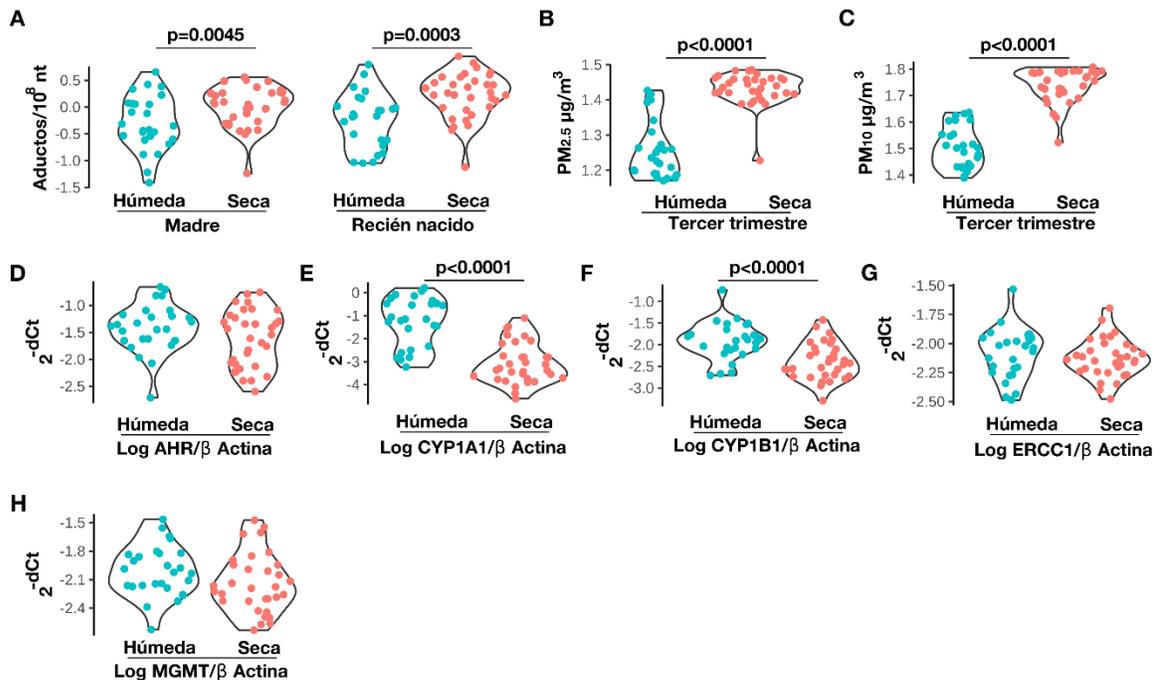


Figura 20. A) Comparación de los valores de aductos en sangre periférica de la madre y cordón umbilical en los binomios separados por estación seca contra húmeda según el último mes de embarazo. B,C) Diferencias en la exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  y  $\text{PM}_{10}$  durante el último trimestre de embarazo, como se esperaba, el grupo de la estación seca tuvo mayor exposición a PM. D-F) Comparación de

los valores de expresión de *AHR*, *CYP1A1* y *CYP1B1*, *ERCC1* y *MGMT* (H) en la población La Raza+CimiGEN seccionada por estación en la que transcurrió el último trimestre de gestación. Mann Whitney test  $p < 0.05$ ,  $n=60$ , *CYP1A1*  $n=42$ . Los valores en la figura se graficaron las medianas: rango intercuartil y los niveles de expresión y aductos se representan por los valores transformados a logaritmo. Los valores de expresión de cada gen se normalizaron contra la expresión de  $\beta$ -actina. PM<sub>10</sub>: Partículas gruesas de 10 a 2.5 micrómetros. PM<sub>2.5</sub>: Partículas finas de hasta 2.5 micrómetros. PM: Material Particulado. AHR: Receptor de arilos. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ERCC1: Excision Repair Cross Complementing Group 1. MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa. mRNA: ARN mensajero. CimiGEN: Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento.

## 6.8 La expresión de los genes de reparación del ADN correlacionan entre sí al momento del nacimiento

En el progreso del estudio también exploramos si alguna variable o conjunto de variables podían influir en la manera en la que el organismo responde a xenobióticos, es por ello que realizamos un análisis de componentes principales con los datos de LaRaza+CimiGEN, donde las variables incluidas fueron: la expresión de nuestro set de genes, la exposición a PM  $\leq 10$  y 2.5 micrómetros durante todo el embarazo, en los distintos tres trimestres de embarazo y desglosando durante los últimos tres meses de gestación—, los parámetros perinatales (peso y longitud al nacimiento), las semanas de gestación, la edad de la madre y los niveles de aductos en la madre y el recién nacido al momento del parto (Anexo 4).

Un hecho interesante que derivó este análisis de correlaciones (*Cicle correlation plot*), fue que cuatro de nuestros cinco genes estudiados se agruparon en un mismo cuadrante (*CYP1B1*, *AHR*, *ERCC1* y *MGMT*), exhibiendo una posible relación entre su expresión con base a la exposición a PM. Basados en ello, efectuamos análisis de correlaciones entre los genes de nuestro grupo LaRaza+CimiGEN y los subgrupos: La Raza y CimiGEN, para explorar las posibles relaciones entre las distintas vías evaluadas: la vía de metabolismo de HAPs y dos vías de reparación del ADN: *NER* y Alquiltransferencia.

Las asociaciones de LaRaza+CimiGEN fueron las que obtuvieron valores de  $p$  más significativos que los obtenidos analizando las cohortes por separado. Primeramente, en los análisis de los tres grupos se observó una relación entre los niveles de *AHR* y *ERCC1* (LaRaza+CimiGEN:  $p < 0.0001$ ,  $\rho = 0.48$ ; LaRaza:  $p = 0.0339$ ,  $\rho = 0.34$ ; CimiGEN:  $p = 0.0017$ ,  $\rho = 0.6174$ ). La otra asociación observada en todos los grupos fue la de ambos genes de reparación, *ERCC1* y *MGMT*, (LaRaza+CimiGEN:  $p < 0.0001$ ,  $\rho = 0.55$ ; LaRaza:  $p = 0.0006$ ,  $\rho = 0.54$ ; CimiGEN:  $p = 0.0051$ ,  $\rho = 0.5634$ ) (Ver figura 21).

Otra asociación significativa fue la de *CYP1A1* con *CYP1B1* en el grupo de LaRaza+CimiGEN ( $p = 0.001$ ,  $\rho = 0.4155$ ); *CYP1A1* contra *MGMT* las cohortes de LaRaza+CimiGEN ( $p < 0.0092$ ,  $\rho = 0.3388$ ) y LaRaza ( $p = 0.031$ ,  $\rho = 0.3552$ ) y *ERCC1* contra *CYP1A1* en la cohorte de La Raza ( $p = 0.0185$ ,  $\rho = 0.3854$ ). De manera general las asociaciones más fuertes observadas en todos los subgrupos fueron las que ligan la expresión de *AHR* – *ERCC1* – *MGMT*, esto sugiere que las vías de activación de HAPs y las vías de reparación de ADN, como NER y la Alquiltransferencia están interrelacionadas durante el embarazo (Ver figura 21).

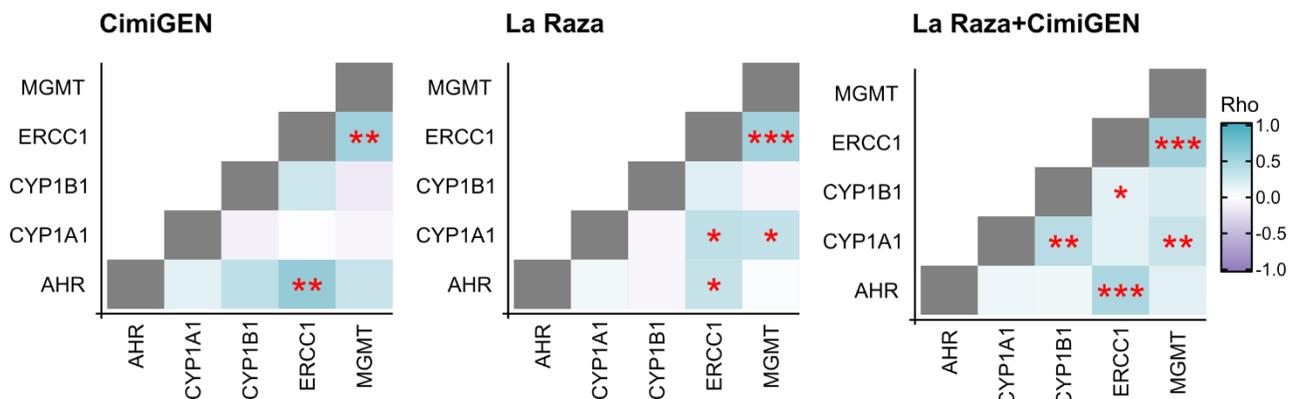


Figura 21. Análisis de correlación de los genes en placenta a término en la población Raza+CimiGEN, y las sub-poblaciones de La Raza y CimiGEN por separado. Se observó una correlación positiva entre los genes de reparación de ADN *MGMT* y *ERCC1*, en los tres grupos analizados, a su vez también se observó en todos los grupos una correlación positiva con *AHR* y *ERCC1*, lo que podría indicar que una activación en la expresión del receptor de arilos repercute en un aumento de la reparación asistida por la vía NER y alquiltransferencia. Se aplicaron pruebas de correlación de Spearman de dos colas,  $p < 0.05$  y  $n = 60$ . *AHR*: Receptor de arilos. *CYP1A1*: Citocromo P450 1A1. *CYP1B1*: Citocromo P450 1B1. *ERCC1*: Excision Repair Cross Complementing Group 1.

MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa. ADN: Ácido desoxirribonucleico. NER: *Nucleotide Excision Repair*. CimiGEN: Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios del Nacimiento.

## 6.9 CYP1B1, pero no CYP1A1, es detectado en placenta a término

Se exploraron los niveles de proteína de ambos citocromos en la placenta de participantes provenientes del hospital CimiGEN y LaRaza (Figura 22, A) , esta vez en el diseño del experimento se incluyeron muestras fetales y maternas, para buscar cambios en la expresión con respecto a la estación de nacimiento y la exposición a PM. Primeramente, se extrajeron proteínas microsomales de 3 muestras para los ensayos de detección de ambos citocromos por medio de Western blot, usando como control de carga  $\beta$  Actina y como control positivo una muestra de microsomas de pulmón de rata expuesta a BAP. De manera sorprendente, observamos que en ninguna de las tres muestras de placenta humana se detectó al citocromo 1A1, pero si altas cantidades de CYP1B1 (Figura 22, B).

Paralelamente evaluamos la actividad EROD de 4 muestras de microsomas de placenta, usando como control negativo una reacción sin microsomas y como control positivo los microsomas de pulmón de rata. Aunque se evaluó este ensayo a los 15, 30 y 60 minutos (hasta 4 veces más del tiempo habitual por protocolo) posterior a la adición del NADPH, no se observó producción de resorufina en los pozos con microsomas de placenta, por otra parte, la muestra del control positivo tuvo señal de fluorescencia entre los primeros 2 minutos de reacción (Figura 22, D).

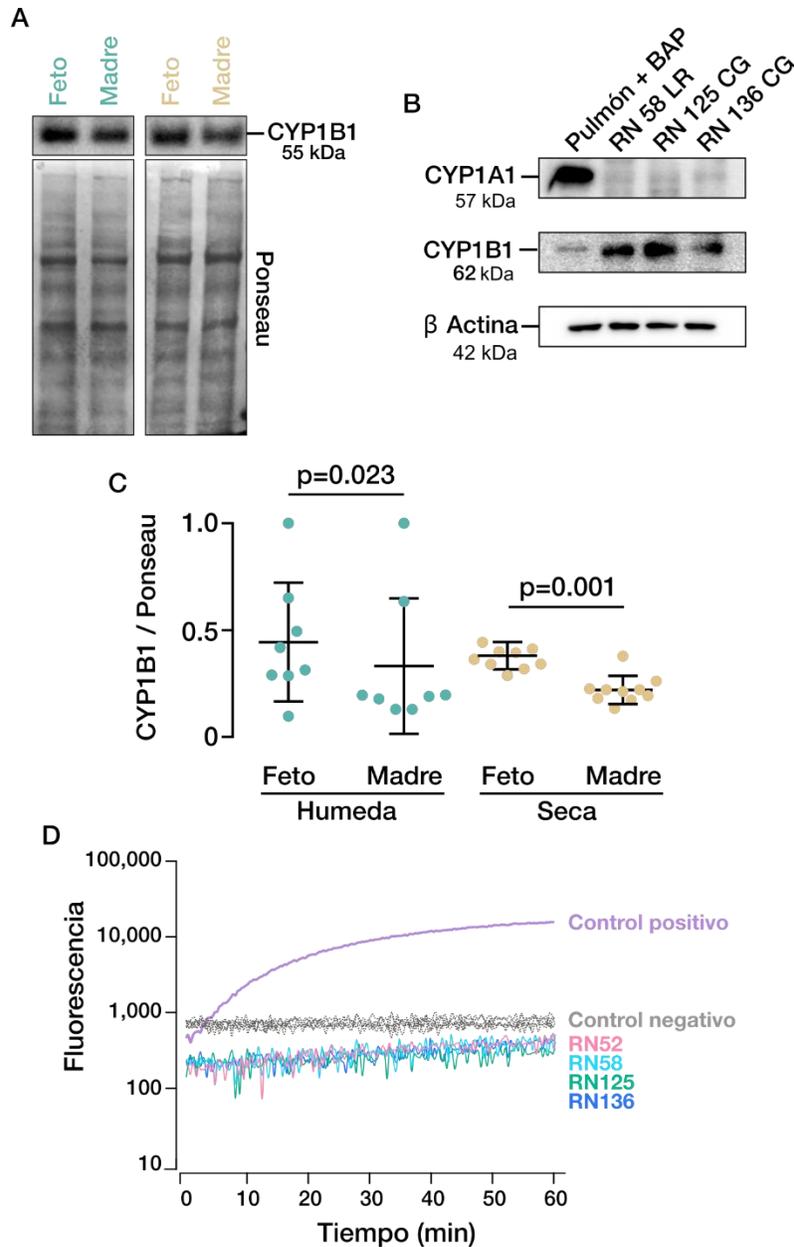


Figura 22. Análisis de la expresión a nivel proteína del CYP1A1 y CYP1B1 en placenta a término. A. Patrón de bandas del proteoma de placenta humana obtenido posterior de SDS-PAGE y tinción con rojo Ponceau. B) Análisis de la expresión de CYP1A1 y CYP1B1 en placenta humana, usando como control de carga  $\beta$  Actina, como control positivo se emplearon proteínas microsomales de pulmón de rata expuesta a BAP. C) Mann Whitney test  $p < 0.05$ ,  $n = 38$ . Los valores en la figura se graficaron las medianas y rango intercuartil. D) Ensayo de la actividad EROD de microsomas extraídos de placenta a término, como control negativo se empleó una reacción con *buffer* (Tris-base 50 mM y  $MgCl_2$  25 mM, pH 7.6) en lugar de microsomas. RN: Recién Nacido. LR: La Raza. CG: CimiGEN. CYP1A1:

Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. EROD: Actividad etoxirresorufina O-desetilasa.

Ya que el *CYP1B1* fue el citocromo detectado en las placentas a través de Western blot, se evaluó su expresión en 20 binomios madre-hijo. El nivel de expresión de las proteínas extraídas de las muestras se evaluó a través de SDS-PAGE y tinción con rojo Ponceau (Figura 22, A), posteriormente se descartó un binomio ya que una de las muestras estaba degradada. Después se evaluó la expresión de *CYP1B1* normalizando la señal de banda contra el patrón de rojo Ponceau de su respectiva muestra. Con base a la estación de nacimiento del neonato se clasificaron los binomios por estación "Húmeda" y "Seca", el análisis por grupos se efectuó a través de una prueba de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ). No se observó ninguna diferencia entre las madres-neonatos de la estación húmeda contra la seca, sin embargo, un comportamiento común en ambos grupos con respecto a la estación muestra que los neonatos expresan mayor cantidad de *CYP1B1* (expresión en placenta del lado fetal) cuando se les compara contra los niveles de expresión de sus madres (Figura 22, C).

Los datos de expresión de *CYP1B1* también fueron empleados para un análisis contra el nivel de partículas  $\leq 10$  y 2.5 micras durante las distintas etapas gestacionales evaluadas (Todo el embarazo, primer, segundo, tercer trimestre y último mes, último bimestre), pero ningún análisis de correlación (Spearman,  $p < 0.05$ ) resultó significativo. Además, se evaluaron los niveles de expresión de *CYP1B1* en placenta fetal y materna contra sus los niveles de aductos en madres e hijos, pero no se observó asociación.

## 7. Discusión

En el presente trabajo se han explorado los posibles cambios en la expresión génica causados por la exposición a contaminación atmosférica, y más específicamente, a PM. Debido que el periodo gestacional ha sido identificado como una ventana crítica de susceptibilidad<sup>14,15</sup>, se analizaron los niveles de expresión en placenta de 3 genes que participan en la bioactivación de los HAPs y dos genes involucrados en la reparación del daño genotóxico causado por los metabolitos de HAPs y nitrosaminas (compuestos que se encuentran en el PM). Para esto, se procesaron placentas de partos a término de mujeres no fumadoras residentes en la ZMVM. Las mujeres involucradas también donaron muestras de sangre periférica y de cordón umbilical, las cuales fueron analizadas en un estudio previo para determinar su cantidad de aductos de BAP<sup>90</sup>.

De las muestras de placenta se aisló ARN para realizar la cuantificación de los mensajeros de los genes *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AHR*, *ERCC1* y *MGMT*. Los cuales están involucrados en el metabolismo de hidrocarburos y la reparación del ADN.

Al explorar la expresión a nivel mRNA de los genes de metabolismo de hidrocarburos y reparación del ADN en placenta, se observó que todos los genes mostraban los tamaños de amplicón y secuencias esperadas de acuerdo con la secuencia publicada en *NCBI* y *Ensembl*. La excepción fue el gen *CYP1A1* ya que un análisis de secuenciación nos ayudó para determinar que el amplicón obtenido contenía intrones. El mismo experimento se repitió con dos pares de primers adicionales y en el que se incluyeron muestras tratadas con DNasa para descartar la amplificación del ADN genómico (Fig. 4). Sin embargo, con ninguno de los pares de primers pudo detectarse mensajero de *CYP1A1* en las 3 muestras de placenta previamente seleccionadas por provenir de madres con mayor exposición a PM.

Las variaciones en los tamaños de amplicón observados podrían deberse a variaciones ocurridas durante el *splicing* del gen *CYP1A1*. Anteriormente, Bauer y

colaboradores en el 2007 demostraron que las isoformas de este gen son diversas, ya que detectaron 5 nuevas isoformas de *CYP1A1* en líneas celulares de cáncer y leucocitos humanos y dichas variantes correspondían a secuencias con deleciones del exón<sup>91</sup>.

En 2005, Chinta y colaboradores también describieron una nueva variante de *splicing* del *CYP1A1* presente en cerebro humano. La investigación de Chinta demostró que la variante encontrada carecía completamente del exón 6 y que esta variante se encontraba en el cerebro, pero no en el hígado del mismo individuo. Derivado de sus observaciones hipotetizaron que la presencia de variantes específicas de tejido podría deberse a factores de *splicing* específicos, presencia de polimorfismos de un solo nucleótido e incluso regulación epigenética del *splicing* alternativo<sup>92,93</sup>. Aunque las variantes reportadas para *CYP1A1* antes mencionadas no se alinean con las secuencias encontradas en nuestras muestras de placenta, (inclusión del intrón 3-4 y el intrón 5-6), aun no se puede descartar la presencia de nuevas variantes de *splicing* específicas de placenta.

Para poder descartar que los amplicones observados (uno de los cuales fue secuenciado) correspondieran al producto de otro gen —a pesar de nuestros esfuerzos por eliminar el ADN genómico—, se realizó un análisis de los posibles productos derivados de la amplificación de *CYP1A1*. Sin embargo, la longitud de los productos predichos no mostró similitud con los observados en Figura 17 (Análisis de la expresión de *CYP1A1* placenta) que fueron T1: 235 pb y T2: 311, mientras que con el tercer par T3 no se observó amplicón. Los genes resultantes del análisis, para los cuales se hubiera esperado amplificación aparte del *CYP1A1*, fue el miembro de la misma familia de citocromos, el *CYP1A2* (T2,T3) y el gen *TYSND1* (*Trypsin like peroxisomal matrix peptidase*) para los primers T1, sin embargo, para este último producto se predijo una longitud de 609 pb, el cual no hubiese sido terminado de sintetizar por los cortos periodos de amplificación en el PCR, por lo que concluimos que la PCR aplicada es específica para el gen *CYP1A1*.

Después de que se determinó que el *CYP1A1* podía detectarse por qPCR, se encontró que en 18 de las 60 muestras analizadas no se expresaba mensajero de

este gen. Anteriormente, en otros estudios donde se analiza la expresión de CYP1A1, no se detectó mensajero en linfocitos<sup>91</sup> y en placenta a término<sup>24</sup>. En este último estudio solo pudo detectarse mensajero y actividad EROD en muestras de mujeres que fumaron durante el embarazo. En el caso de placentas de mujeres no fumadoras la presencia de mensajeros y de la proteína estaba por debajo del rango de detección. curiosamente en algunas de las muestras de placentas de madres que fumaron durante el embarazo no se detectó inducción de CYP1A1, lo que podría indicar nuevamente que existen diferencias genéticas en factores que modulan la inducción de CYP1A1<sup>24</sup>.

En las muestras que presentaron señal detectable de los citocromos se analizó la expresión de estos genes a nivel mensajero y proteína, se analizó su asociación con la exposición a PM y con la estación del año en la que transcurrió el último trimestre de embarazo —ya que hay periodos bien identificados en los que existe mayor presencia de PM (época seca) y en los que disminuyen las emisiones de PM ( época lluviosa)— , y además se exploró la actividad de CYP1A1 en placenta.

Derivado de los análisis descritos se encontró que los mensajeros de *CYP1A1* y *CYP1B1* se asociaban de manera negativa con respecto a la exposición a PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>, a excepción del primer trimestre de embarazo durante el cual la relación es positiva y significativa. Aunque anteriormente ya se había demostrado que el mecanismo de inducción de CYP1A1 a través del complejo AHR parece estar ya desarrollado en el primer trimestre de embarazo en madres fumadoras<sup>25</sup>, existe evidencia de mujeres fumadoras en los primeros estadios del embarazo que no muestran inducción de *CYP1A1* en la placenta a término<sup>24</sup>, por lo que no se espera que el efecto biológico provocado por la exposición a material particulado en los primeros meses de embarazo se mantenga hasta el momento de nacimiento. En cuanto a la expresión del *CYP1B1*, anteriormente se había demostrado que su inducción en células HepG2 expuestas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) no era tan exacerbada como ocurre con el CYP1A1, ya que los cambios en la expresión observada corresponden a 50 veces *versus* 3-4 veces más que el control respectivamente<sup>94</sup>. Mientras que en la línea celular de coriocarcinoma

humano (JEG-3), se observó una inducción de hasta más de 9000 veces de cambio en la expresión de 1A1, en comparación con el control, mientras que la exposición a TCDD no provocó efecto en la expresión de *CYP1B1*<sup>95</sup>.

De manera similar, en muestras de placenta a término de mujeres fumadoras en las que se detectó actividad EROD de hasta 637 veces mayor, comparadas con las muestras que no mostraban inducción, no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de *CYP1B1* (con un aumento de 0.3-0.9 veces mayor solamente)<sup>95</sup>. En nuestros hallazgos con respecto a los niveles de mensajero en placenta a término, si bien pudimos observar expresión de ambos mensajeros en la mayoría de nuestras muestras, la cantidad de los mensajeros en el tejido presentaron una relación negativa con respecto a la exposición a PM. Este resultado podría ser indicador de los bajos niveles de HAPs en el ambiente en donde vivían las voluntarias, los cuales no podrían ser comparables con la presente en el humo de tabaco, estado en el que diversos estudios demostraron la notoria inducción de citocromos, en principal medida la del *CYP1A1*.

El que no se haya podido observar inducción en estos dos citocromos también podría estar íntimamente relacionado con la expresión del receptor citosólico AHR. De acuerdo con estudios previos AHR es un gen que se expresa de manera abundante en placenta, que además de intervenir en el metabolismo de xenobióticos tiene funciones fisiológicas importantes como la respuesta inmune y la diferenciación celular<sup>96-98</sup> —y también puede unir sustancias como indoles, carotenoides y flavonoides—. En estudios con organismos *AHR-knockout*, se ha observado que dichos animales presentan alteraciones en la fertilidad, disminución en el tamaño de la camada y aumento de la muerte neonatal de la descendencia. Principalmente debido a la síntesis insuficiente de estradiol en el ovario y a la baja transcripción del gen *CYP19* (gen regulado por la unión de AHR en sitios XRE)<sup>99</sup>.

La expresión de AHR en placenta ha sido explorada anteriormente. De acuerdo con los resultados de Wakx y colaboradores en el 2018, la expresión tanto a nivel mensajero como de proteína varía con respecto al estadio del desarrollo del embarazo, siendo mayor la expresión al momento del nacimiento (37-39 semanas

de amenorrea). La actividad de AHR, también fue evaluada a través de qPCR de los genes blanco, describiéndose que tanto CYP1A1 como CYP1A2 tienen una mayor expresión en placenta a término. Todos estos resultados fueron evaluados en muestras de mujeres no fumadoras, lo que resulta interesante, ya que sugiere que la vía de AHR es modulada también a través ligandos endógenos producidos por el metabolismo placentario. En nuestro estudio no detectamos cambios en la expresión de AHR relacionados con la exposición materna a PM, ni con la cantidad de aductos en sangre, probablemente debido a que, por su papel fisiológico dentro de la placenta, este gen es modulado principalmente por ligandos endógenos enmascarando la posible inducción por xenobióticos<sup>100</sup>.

Tampoco podemos descartar que exista modulación postranscripcional de ambos citocromos, que al momento en placenta es desconocida. Anteriormente, se describió en células HepG2, que el mRNA de *CYP1A1* tiene una vida media de 2.4 horas, el cual es uno de los mRNAs con vida más corta estudiados hasta el momento y que es el mRNA más inestable de los *CYP*, ya que tanto el *CYP1A2* como el *CYP1B1* fueron caracterizados como mensajeros de larga vida media (más de 24 horas). De acuerdo con los autores de la investigación, esta vida media tan corta parece estar conservada a través de especies lo que sugiere que esta característica del mensajero del mRNA de *CYP1A1* es importante para su función<sup>94</sup>.

Posteriormente, exploramos la expresión a nivel proteína de los citocromos en muestras de placenta fetal. Con respecto al CYP1A1 no encontramos expresión por medio de *Western blot* aunque si obtuvimos señal en el control positivo de pulmón de rata. Para descartar que nuestro anticuerpo no hubiera detectado eficazmente el CYP1A1 humano y para encontrar señal de expresión, decidimos medir la actividad EROD en las muestras de microsomas, pero posterior a los 60 minutos de reacción no se observó producción de resorufina. Lo anterior nos podría indicar que CYP1A1 no se expresa en nuestras muestras de placenta, probablemente debido a que la exposición de HAPs en el PM no supera la concentración mínima para inducir la expresión de genes con sitios XRE.

Conocer la concentración de HAPs en muestras de PM es una tarea difícil ya que la composición del PM difiere con respecto a la ubicación en la que se producen y se colectan, pues las actividades antropogénicas son variadas a través de la ZMVM. Una aproximación de como medir la exposición a HAPs a través del PM es calculando la exposición a PM de menor tamaño (de <2.5 micras), ya que puede tener una mayor toxicidad que el PM de 10 micras y esto se debe a su mayor área de superficie, alto rango de retención, a su mayor facilidad de penetrar al sistema circulatorio y principalmente a su composición enriquecida en HAPs. Por ello evaluar de manera cuantitativa los posibles efectos en el desarrollo embrionario es de suma importancia<sup>101</sup>. De acuerdo con Morales-Rubio y colaboradores, quienes en un modelo murino evaluaron la expresión de diversos genes del metabolismo de xenobióticos en placenta, determinaron que la cantidad de partículas ultrafinas —colectadas en la zona norte de la CDMX— necesaria para poder inducir los genes dependientes de AHR , incluido CYP1A1, durante la preñez murina fue de 400 µg/Kg, lo cual es equivalente a una exposición de 29-86 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>2.5</sub> en humanos<sup>102</sup>.

La concentración de PM<sub>2.5</sub> determinada por este grupo de investigación, supera a la concentración media de exposición de todas las voluntarias en nuestro estudio, que fue de 23.58 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>2.5</sub>. Esta diferencia podría ser la razón por la cual no observamos expresión de CYP1A1 en nuestras placentas, aunque aún queda por evaluar si la diferencia de 6 µg/m<sup>3</sup> en la exposición total del embarazo es lo suficientemente significativa para inducir o no la expresión de CYP1A1, además de la diferente sensibilidad entre especies.

Paralelamente, encontramos que los niveles de expresión de la proteína de CYP1B1 son abundantes en placenta y que además se expresaba en mayor medida en la cara fetal con respecto a la cara materna, lo cual concuerda con la observación hecha previamente de una mayor cantidad de aductos en sangre de cordón comparado con la detectada en los leucocitos de sangre periférica de la madre<sup>90</sup>.

CYP1B1 hidroxila en placenta al estradiol para producir 4-hidroxiestradiol, que es una vía menor de metabolismo de estrógenos después de la actividad de la

aromatasa (CYP19) - y CYP1A1 en madres fumadoras- que principalmente tienen actividad 2-hidroxilasa. Los niveles de estrógenos junto con el aumento en la expresión de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) durante la segunda mitad del embarazo crean un entorno para el desarrollo y retención de los capilares proporcionando un sistema para promover la vasculogénesis y, por lo tanto, el flujo sanguíneo dentro de la placenta y, en consecuencia, el crecimiento y desarrollo del feto<sup>103,104</sup>. En paralelo, durante la producción del 4-hidroxiestradiol y el desarrollo del feto, se generan radicales libres a partir del ciclo reductor-oxidativo de la producción de semiquinonas y quinonas, que a su vez pueden formar aductos con el ADN<sup>103</sup>.

Se ha observado que CYP1B1 es una enzima clave en el metabolismo de 17 $\beta$ -estradiol (E2). Tsuchiya y colaboradores en el 2004, demostraron que la expresión de CYP1B1 aumentaba 3 veces después de tratar células MCF7 con 17 $\beta$ -estradiol durante 12 horas. Este aumento en la transcripción de CYP1B1 ocurre de manera dependiente del receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ), el cual se une a la región ERE (*Estrogen Response Element*) del CYP1B1 humano, unión esencial para la activación de la transcripción de CYP1B1 en células Ishikawa (una línea establecida de adenocarcinoma de endometrio) y células de endometrio humano sano en presencia de E2<sup>105</sup>. Esta regulación de la expresión de CYP1B1 mediada por la presencia de estrógenos parece también estar relacionada con la vía de activación de HAPs mediada por AHR, ya que anteriormente se observó que AHR aumentaba significativamente su expresión en respuesta al estímulo con E2, proponiéndose que el aumento de CYP1B1 frente a estímulos de estrógeno puede ser también por la acción de AHR<sup>105</sup>. Si bien nosotros no pudimos encontrar un cambio en la expresión de AHR a nivel mensajero, puede que exista otra vía de activación de la transcripción de CYP1B1 mediada exclusivamente por el receptor de estrógenos tal como lo describió el grupo de Tsuchiya<sup>106</sup>.

En nuestros resultados no pudimos observar un aumento en el mensajero de CYP1B1, en comparación a lo observado con su expresión a nivel proteína, esto se puede deber a que el mensajero de CYP1B1 este regulado postranscripcionalmente. El mismo fenómeno se observó empleando tejidos

cancerosos donde el nivel de proteína CYP1B1 es más alto en comparación con el tejido normal, mientras que no hay diferencia en los niveles de ARNm de CYP1B1 entre tejidos cancerosos y normales<sup>107</sup>. Tsuchiya y colaboradores en el 2006 encontró que el CYP1B1 humano está regulado postranscripcionalmente por el miR-27b a través de la represión tradicional en células MCF7<sup>108</sup>.

El hecho de que CYP1B1 este altamente expresado en nuestras muestras, podría ser un reflejo de la propia fisiología de la placenta al momento del parto ya que cumple un papel importante en el metabolismo de estrógenos y su regulación mediada por ERalpha. Aunque aún no podemos demostrar una asociación entre la expresión de CYP1B1 y la exposición a los HAPs en el PM respirado por la madre, puede que este efecto contribuya de manera poco significativa en comparación con la expresión modulada por constante incremento de los niveles de estrógenos durante el embarazo, los cuales son máximos al final de este.

CYP1B1 se encuentra mayormente expresada en la cara fetal lo que podría representar repercusiones para la salud en la infancia y vida adulta del recién nacido, ya que, la expresión de este citocromo en la placenta puede participar en la generación de los aductos que se observaron en la sangre de cordón umbilical. Rojas y colaboradores en el 2020 observaron que en ratones tratados con un inhibidor de AHR se previno el desarrollo de obesidad. Este fenómeno fue atribuido a la inhibición de la expresión de CYP1B1 y de genes cascada debajo de PPARα (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) como SCD1 (*Hepatic stearyl-CoA desaturase 1*) y SPP (*Osteopontin*)<sup>109,110</sup>. Esta evidencia en conjunto con la relación entre la actividad de CYP1B1 con el origen de cánceres estrogénicos derivados de los niveles de 4-hidroxiestradiol, podría sugerir que un aumento en la expresión de CYP1B1 ocasionado por la exposición a xenobióticos en el aire contaminado podría favorecer la aparición de padecimientos metabólicos durante la infancia.

El embarazo es un estado inflamatorio que se caracteriza por un incremento de estrés oxidante. Este incremento en el estrés oxidante puede ocasionar lesiones en el ADN como modificaciones en las bases y azúcares, roturas de cadena y

entrecruzamientos ADN-proteína<sup>111,112</sup>. Además del daño ocasionado por agentes endógenos, la integridad del ADN también puede ser dañada por agentes provenientes del medio ambiente como los HAPs y las nitrosaminas. Estos compuestos (que generan aductos voluminosos y alquilaciones respectivamente) se encuentran comúnmente asociados a PM de 2.5 micrómetros de diámetro<sup>44</sup>. En nuestro estudio hipotetizamos que la exposición durante el embarazo a PM, que contiene HAP y otros contaminantes, y cuya presencia se asocia a daño a ADN<sup>90,113</sup>, induciría un aumento en la expresión de enzimas de reparación del ADN como ERCC1 y MGMT. De acuerdo con nuestros resultados la expresión del mensajero de ERCC1 no muestra una asociación positiva con la exposición a partículas en ninguna de las ventanas de tiempo evaluadas (1ro, 2do, 3er trimestre o todo el embarazo) y tampoco muestra asociación con la cantidad de aductos observados en sangre de cordón umbilical.

La vía NER es la vía principal utilizada por los mamíferos para eliminar lesiones voluminosas del ADN, como las formadas por la luz ultravioleta, los mutágenos ambientales y algunos aductos producto de quimioterapéuticos del cáncer, como el cisplatino<sup>114,115</sup>. Diversos estudios han demostrado que el aumento del transcrito de *ERCC1* se encuentra asociado a la resistencia a cisplatino en cáncer de ovario, adenocarcinoma gástrico y tumores cervicales, donde la resistencia se atribuye a una mayor capacidad de reparación del ADN afectado<sup>115-117</sup>.

Christmann, M. et al, evaluó los cambios en la expresión de los genes de la vía NER en células VH10tert (línea celular fibroblástica), y observó que, los genes de *DDB2* (*DNA damage-binding protein 2*), *XPC*, *XPG* y *XPF* son activados transcripcionalmente por los factores de transcripción p53 (*Tumor suppressor p53*) y AP-1 (*Activator protein 1*) en respuesta a concentraciones variables de BPDE. En este estudio, la exposición previa de las células a una dosis baja (0.25 – 1.0  $\mu\text{M}$ ) de BPDE indujo la transcripción de los genes *DDB2*, *XPC*, *XPF* y *XPG*, sin embargo, a concentraciones más altas de BPDE (2.5  $\mu\text{M}$ ), la expresión de los genes NER se redujeron significativamente<sup>118</sup>. Aunque se conoce que la función de la vía NER es regulada por estrés oxidante, lo cual podría ser una razón por la que los genes de

reparación se vieron disminuidos posterior a la exposición a BPDE, los autores observaron que la formación e ROS posterior a la exposición era débil y tardía, por lo que resultaba improbable que los efectos citotóxicos del BPDE estuvieran relacionados con el estrés oxidante.

Aunque existen estudios que indican que ERCC1 y otros genes de la vía NER son indispensables en la reparación de daños por contaminantes ambientales, aun no hay estudios que describan su modulación en placenta o su dinámica de acción durante el embarazo.

Un buen acercamiento de cómo es que los genes de reparación se comportan bajo la exposición de contaminantes ambientales fue el expuesto por Neven y colaboradores en 2018, donde demostraron que la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de cordón umbilical se encontraba aumentada por exposición a contaminantes ambientales y que en niños del área metropolitana de la CDMX, la contaminación del aire por partículas se asociaba con el aumento de la metilación de los genes de reparación del ADN, así como daño elevado del ADN oxidante<sup>55</sup>.

Una de las razones por las que no pudimos observar cambios en la expresión de ERCC1, podría ser debido a la inhibición de la vía NER relacionada con el estrés oxidante generado durante el parto, donde en especial ERCC1, ha mostrado ser el componente de NER más sensible a los cambios redox intracelulares, mostrando una reducción de hasta 5 veces ante la exposición de peróxido de hidrogeno, reduciendo de manera global la capacidad de reparación de NER<sup>119,120</sup>. Asimismo, resultados recientes de Quezada-Madonado et al. (2022) sugieren que el PM disminuye la capacidad de reparación de la vía de NER mediante la alteración de los niveles y la desfosforilación de XPA, una proteína que participa en el reconocimiento del daño que posibilitará la actividad de ERCC1. Aunque este estudio se realizó en un modelo in vitro, podría ayudar a explicar nuestros hallazgos.<sup>121</sup>

En nuestro estudio también se evaluó la expresión del mensajero de la enzima suicida, O6-metilguanina-DNA metiltransferasa o MGMT, la cual resultó estar asociada positivamente tanto con la exposición a partículas de 10 y 2.5 micras y

aductos de sangre de cordón umbilical, exclusivamente durante el último trimestre de embarazo en la cohorte del CIMIGen. Anteriormente Molina y colaboradores en el 2013, analizaron la formación de aductos en sangre periférica por exposición a contaminación ambiental en sujetos identificados con distintos polimorfismos de MGMT, encontraron que los individuos heterocigotos para *MGMT* Leu/Phe, tenían un mayor nivel de aductos formados en sangre que aquellos individuos homocigotos, lo que respalda información publicada que explica que la mutación Leu84Phe en MGMT da como resultado una reparación subóptima del daño genético y un aumento de la sensibilidad a NNK<sup>122,123</sup>. Cabe mencionar que Molina et al. 2013 observaron asociaciones entre MGMT y aductos a través de la cuantificación de los aductos en sangre usando la técnica de post-marcaje con fosforo radiactivo, por lo que los investigadores hipotetizaron que incluso la técnica podría ser sensible para detectar alquilaciones en el ADN y aductos tipo piridiloxobutil (POB), ambos provocados por nitrosaminas y reparados por MGMT, está podría ser la razón por la que se observaron asociaciones en la expresión de MGMT y aductos en sangre periférica de la madre y de cordón umbilical en nuestro modelo biológico y que por lo tanto, la exposición a nitrosaminas en el aire podrían tener un efecto biológico sobre el feto al aumentar la expresión de MGMT.

## 8. Conclusiones

- La expresión de *CYP1A1* es poco abundante en placenta a término y presenta posibles variaciones de *splicing* tejido específico.
- Los mensajeros de *CYP1A1* y *CYP1B1* se asocian de manera negativa con respecto a la exposición a  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$ , lo que puede estar relacionado con la estabilidad del ARN durante el parto y la vida media del mRNA.
- Tanto el mensajero como la proteína de *CYP1B1* está mayormente expresado en la cara fetal de la placenta, probablemente por su papel importante en el metabolismo de estrógenos.
- La alta expresión de *CYP1B1* podría representar repercusiones para la salud en la infancia y vida adulta del recién nacido, ya que, la expresión de este citocromo en la placenta participa en la bioactivación de los HAP que generan aductos en ADN.
- La expresión de *MGMT* está asociada positivamente con la exposición a partículas y aductos de sangre de cordón umbilical, por lo que podría ser un buen indicador para determinar la exposición a PM durante el desarrollo fetal.

## 9. Perspectivas

Durante el desarrollo de este estudio un obstáculo importante fue la mala calidad del ARN extraído, lo que nos obligó a reducir el número de muestras a analizar, por lo tanto, para obtener resultados estadísticos más confiables, es necesario realizar experimentos similares con un mayor número de muestras. Sería especialmente interesante analizar muestras de individuos de la Zona sur de la CDMX (CimiGEN), porque las asociaciones obtenidas entre MGMT-Partículas-Aductos resultaron ser las más significativas y sorprendidas al analizar muestras provenientes del CimiGEN, aunado a este hecho, convendría analizar al mismo tiempo la composición del aire y el PM en la zona, con tal de identificar *hot spots* de contaminación.

En este proyecto se usaron técnicas empleadas ampliamente en la literatura del campo, sin embargo, hay tecnologías que son poco explotadas que podrían ser muy útiles y/o precisas. Una técnica que sería interesante emplear para los próximos experimentos en el campo es el de la HPLC, en nuestro estudio nosotros encontramos la dificultad de no poder distinguir entre aductos tipo POB o alquilaciones de los aductos de BAP, emplear esta técnica en el futuro podría ayudar a obtener resultados más específicos en cuanto a la expresión de MGMT y los daños al ADN producidos por nitrosaminas.

Otro ejemplo de una técnica interesante a emplear es la secuenciación de mRNA, en nuestro estudio encontramos posibles variantes de *splicing* para el gen de CYP1A1. Sin embargo, no pudimos dilucidar todas las posibles variantes, incluyendo las menos representadas, sería interesante estudiar las variantes de CYP1A1 bajo exposición ,a partículas o BPDE y observar posibles cambios en el mecanismo de reacción de cada variante encontrada.

En el estudio también se encontró la disyuntiva de como normalizar los datos obtenidos, ya que en el presente estudio no fue posible analizar a una población control (control negativo). Contar con una población expuesta a bajos niveles de contaminación, homogénea genéticamente sería de gran ayuda, pues así se reforzarían los hallazgos obtenidos.

# 10. Referencias

1. World Health Organization. 9 out of 10 people worldwide breathe polluted air, but more countries are taking action. Preprint at (2019).
2. Pope, C. A. & Dockery, D. W. Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect. *J Air Waste Manage Assoc* **56**, 709–742 (2006).
3. USEPA, U. S. E. P. A. Air Quality Criteria for Particulate Matter Volume III of III. *Environmental Protection, III (April)* 554 <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants> (1996).
4. Kurt Straif, Aaron Cohen, and J. S. IARC Scientific Publication No. 161. Preprint at (2013).
5. S V S Rana. *Environmental pollution : health and toxicology*. (Oxford : Alpha Science International Ltd., 2006).
6. Brown, J. R. & Thornton, J. L. Percivall Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of Scrotum. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **195**, 231 (1966).
7. Brunekreef, B. & Holgate, S. T. Air pollution and health. *The Lancet* **360**, 1233–1242 (2002).
8. Pope, C. A. *et al.* Particulate Air Pollution as a Predictor of Mortality in a Prospective Study of U.S. Adults. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 669–674 (1995).
9. Abbey, D. E. *et al.* Long-Term Inhalable Particles and Other Air Pollutants Related to Mortality in Nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 373–382 (1999).
10. Beelen R. Long-term Exposure to Air Pollution and Cardiovascular Mortality An Analysis of 22 European Cohorts. *Epidemiology Volume 25*, (2014).
11. Atkinson, R. W. *et al.* Acute Effects of Particulate Air Pollution on Respiratory Admissions: results from APHEA 2 project. Air Pollution and Health: a European Approach. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1860–1866 (2001).
12. Braun-Fahrländer, C. *et al.* Respiratory health and long-term exposure to air pollutants in Swiss schoolchildren. SCARPOL Team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1042–1049 (1997).
13. Dockery, D. W. *et al.* Health effects of acid aerosols on North American children: respiratory symptoms. *Environ Health Perspect* **104**, 500–505 (1996).
14. Barker, D. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr* **93**, 26–33 (2007).
15. Perera, F. & Herbstman, J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reproductive Toxicology* **31**, 363–373 (2011).
16. Lamichhane, D. K., Leem, J.-H., Lee, J.-Y. & Kim, H.-C. A meta-analysis of exposure to particulate matter and adverse birth outcomes. *Environ Health Toxicol* **30**, e2015011 (2015).

17. Sapkota, A., Chelikowsky, A. P., Nachman, K. E., Cohen, A. J. & Ritz, B. Exposure to particulate matter and adverse birth outcomes: a comprehensive review and meta-analysis. *Air Qual Atmos Health* **5**, 369–381 (2012).
18. Muglia, L. J. & Katz, M. The Enigma of Spontaneous Preterm Birth. *New England Journal of Medicine* **362**, 529–535 (2010).
19. Gupta, M. *et al.* Impact of clinical and histologic correlates of maternal and fetal inflammatory response on gestational age in preterm births. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* **20**, 39–46 (2007).
20. Nachman, R. M. *et al.* Intrauterine Inflammation and Maternal Exposure to Ambient PM<sub>2.5</sub> during Preconception and Specific Periods of Pregnancy: The Boston Birth Cohort. *Environ Health Perspect* **124**, 1608–1615 (2016).
21. Vähäkangas, K., Loikkanen, J., Sahlman, H. & Karttunen, V. Biomarkers of toxicity in human placenta. in *iomarkers in Toxicology* 325–360 (Boston: Academic Press, 2014).
22. Gheorghe, C. P., Goyal, R., Mittal, A. & Longo, L. D. Gene expression in the placenta: maternal stress and epigenetic responses. *Int J Dev Biol* **54**, 507–523 (2010).
23. Burton, G. J., Fowden, A. L. & Thornburg, K. L. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiol Rev* **96**, 1509–1565 (2016).
24. Hakkola, J. *et al.* Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 Forms in human full-term placenta. *Biochem Pharmacol* **51**, 403–411 (1996).
25. Hakkola, J. *et al.* Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem Pharmacol* **52**, 379–383 (1996).
26. Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E. & Brown, R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int* **60**, 71–80 (2013).
27. Ewa, B. & Danuta, M.-Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J Appl Genet* **58**, 321–330 (2017).
28. Janet Arey, *et al.* Monographs on the evaluation of carcinogenic risks in humans. Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Preprint at (2010).
29. Ginsberg, G. L. & Atherholt, T. B. DNA adduct formation in mouse tissues in relation to serum levels of benzo(a)pyrene-diol-epoxide after injection of benzo(a)pyrene or the diol-epoxide. *Cancer Res* **50**, 1189–94 (1990).
30. Perera, F. DNA Damage from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Measured by Benzo[a]pyrene-DNA Adducts in Mothers and Newborns from Northern Manhattan, The World Trade Center Area, Poland, and China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **14**, 709–714 (2005).
31. Beland, F. A. & Poirier, M. C. Significance of DNA adduct studies in animal models for cancer molecular dosimetry and risk assessment. *Environ Health Perspect* **99**, 5–10 (1993).

32. Murray, I. A., Patterson, A. D. & Perdew, G. H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* **14**, 801–814 (2014).
33. Shimada, T. & Fujii-Kuriyama, Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* **95**, 1–6 (2004).
34. Pelkonen, O. & Nebert, D. W. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev* **34**, 189–222 (1982).
35. Xue, W. & Warshawsky, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharmacol* **206**, 73–93 (2005).
36. Alexandrov, L. B. *et al.* Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science (1979)* **354**, 618–622 (2016).
37. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39–85 (2004).
38. Balajee, A. S. & Bohr, V. A. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* **250**, 15–30 (2000).
39. Braithwaite, E. Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* **19**, 1239–1246 (1998).
40. Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 465–481 (2014).
41. Benhamou, S. & Sarasin, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **462**, 149–158 (2000).
42. Yang, J. *et al.* Dynamic changes of XPA, XPC, XPF, XPG and ERCC1 protein expression and their correlations with levels of DNA damage in human bronchial epithelia cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Lett* **174**, 10–17 (2007).
43. Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W. P. & Kaina, B. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1816**, 179–190 (2011).
44. Farren, N. J. *et al.* Estimated Exposure Risks from Carcinogenic Nitrosamines in Urban Airborne Particulate Matter. *Environ Sci Technol* **49**, 9648–9656 (2015).
45. Kalpana, Balakrishnan, *et al.* Outdoor air pollution. Preprint at (2015).
46. Drabløs, F. *et al.* Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1389–1407 (2004).
47. Xue, J., Yang, S. & Seng, S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers (Basel)* **6**, 1138–1156 (2014).

48. Gouws, C. & Pretorius, P. J. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): Can function explain a suicidal mechanism? *Med Hypotheses* **77**, 857–860 (2011).
49. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. & Roos, W. P. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1079–1099 (2007).
50. Yoshioka, K., Yoshioka, Y. & Hsieh, P. ATR Kinase Activation Mediated by MutS $\alpha$  and MutL $\alpha$  in Response to Cytotoxic O6-Methylguanine Adducts. *Mol Cell* **22**, 501–510 (2006).
51. DeMarini, D. M. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. *Mutagenesis* **28**, 485–505 (2013).
52. Collins, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol* **26**, 249–261 (2004).
53. Loft, S. *et al.* Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys* **518**, 142–150 (2012).
54. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. & Fenech, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* **26**, 93–100 (2011).
55. Pedersen, M. *et al.* Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res* **109**, 1012–1020 (2009).
56. Pettit, A. P. *et al.* Alteration of peripheral blood monocyte gene expression in humans following diesel exhaust inhalation. *Inhal Toxicol* **24**, 172–181 (2012).
57. Kim, K.-H., Kabir, E. & Kabir, S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int* **74**, 136–143 (2015).
58. IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. Press release N° 221. Preprint at (2013).
59. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Preprint at (2016).
60. U.S. Environmental Protection Agency. *Criteria Air Pollutants*. (America's Children and the Environment, 2015).
61. Mugica, V. *et al.* PM composition and source reconciliation in Mexico City. *Atmos Environ* **43**, 5068–5074 (2009).
62. Vega, E. *et al.* Chemical composition of fine particles in Mexico City during 2003–2004. *Atmos Pollut Res* **2**, 477–483 (2011).
63. Vega, E. *et al.* Particulate Air Pollution in Mexico City: A Detailed View. *Aerosol Air Qual Res* **10**, 193–211 (2010).
64. O'Dowd, C. D., Aalto, P., Hmeri, K., Kulmala, M. & Hoffmann, T. Aerosol formation: Atmospheric particles from organic vapours. *Nature* **416**, 497–498 (2002).

65. Chen, R. *et al.* Beyond PM<sub>2.5</sub>: The role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1860**, 2844–2855 (2016).
66. Ehn, M. *et al.* A large source of low-volatility secondary organic aerosol. *Nature* **506**, 476–479 (2014).
67. Bové, H. *et al.* Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta. *Nat Commun* **10**, 3866 (2019).
68. Vega, E. *et al.* Chemical composition of fugitive dust emitters in Mexico City. *Atmos Environ* **35**, 4033–4039 (2001).
69. Gutiérrez-Castillo, M. E. *et al.* Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* **47**, 199–211 (2006).
70. Wani, A. L., Ara, A. & Usmani, J. A. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol* **8**, 55–64 (2015).
71. Gutiérrez-Castillo, M. E., Olivos-Ortiz, M., De Vizcaya-Ruiz, A. & Cebrián, M. E. Chemical characterization of extractable water soluble matter associated with PM<sub>10</sub> from Mexico City during 2000. *Chemosphere* **61**, 701–710 (2005).
72. Valavanidis, A., Fiotakis, K. & Vlachogianni, T. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* **26**, 339–362 (2008).
73. Chow, J. C., Watson, J. G., Edgerton, S. A. & Vega, E. Chemical composition of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> in Mexico City during winter 1997. *Science of The Total Environment* **287**, 177–201 (2002).
74. Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Rosas, I. & García-Cuellar, C. M. Sampling and composition of airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) from two locations of Mexico City. *Data Brief* **4**, 353–356 (2015).
75. Mugica, V., Hernández, S., Torres, M. & García, R. Seasonal Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Levels in Mexico City. *J Air Waste Manage Assoc* **60**, 548–555 (2010).
76. Mancera, M., Müller, T., & Sarmiento, J. Inventario de emisiones de la CDMX. 11–130 Preprint at (2006).
77. Garcia-Suastegui, W. A. *et al.* Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City. *Mutagenesis* **26**, 385–391 (2011).
78. Mancera, M., Müller, T., & Sarmiento, J. Inventario de emisiones de la CDMX. 11–130 Preprint at (2016).
79. Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014. Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente y criterios para su evaluación.,. Preprint at (2014).

80. Neri, M. *et al.* Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **612**, 14–39 (2006).
81. Herbstman, J. B. *et al.* Prenatal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Benzo[*a*]pyrene–DNA Adducts, and Genomic DNA Methylation in Cord Blood. *Environ Health Perspect* **120**, 733–738 (2012).
82. Peterson, B. S. *et al.* Effects of Prenatal Exposure to Air Pollutants (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on the Development of Brain White Matter, Cognition, and Behavior in Later Childhood. *JAMA Psychiatry* **72**, 531 (2015).
83. Perera, F. P., Edwards, S. C., & York, N. Aromatic Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect* **118**, 1326–31 (2014).
84. Lyle Burgoon, Ph. D. *et al.* Toxicological Review of Benzo[*a*]pyrene. Preprint at (2017).
85. Saenen, N. D. *et al.* Lower Placental Leptin Promoter Methylation in Association with Fine Particulate Matter Air Pollution during Pregnancy and Placental Nitrosative Stress at Birth in the ENVIRON AGE Cohort. *Environ Health Perspect* **125**, 262–268 (2017).
86. Saenen, N. D., Vrijens, K., Janssen, B. G., Madhloum, N., Peusens, M., Gyselaers, W., ... Nawrot, T. S. Original Contribution Placental Nitrosative Stress and Exposure to Ambient Air Pollution During Gestation : A Population Study. *Am J Epidemiol* **184**, 442–9 (2016).
87. Schmittgen TD, L. K. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101–8 (2008).
88. Phillips DH, A. V. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts. *Nat Protoc* **2**, 2772–81 (2007).
89. Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, Tsai WY, Ma J, Cole KJ, Shé MN, P. F. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* **61**, 6708–12 (2001).
90. Maciel-Ruiz, J. A. *et al.* Prenatal exposure to particulate matter and ozone: Bulky DNA adducts, plasma isoprostanes, allele risk variants, and neonate susceptibility in the Mexico City Metropolitan Area. *Environ Mol Mutagen* **60**, 428–442 (2019).
91. Bauer, M. *et al.* Diversity of common alternative splicing variants of human cytochrome P450 1A1 and their association to carcinogenesis. *Int J Oncol* **31**, 211–8 (2007).
92. Chinta, S. J., Kommaddi, R. P., Turman, C. M., Strobel, H. W. & Ravindranath, V. Constitutive expression and localization of cytochrome P-450 1A1 in rat and human brain: presence of a splice variant form in human brain <sup>1</sup>. *J Neurochem* **93**, 724–736 (2005).
93. Annalora, A. J., Marcus, C. B. & Iversen, P. L. Alternative Splicing in the Cytochrome P450 Superfamily Expands Protein Diversity to Augment Gene Function and Redirect Human Drug Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* **45**, 375–389 (2017).

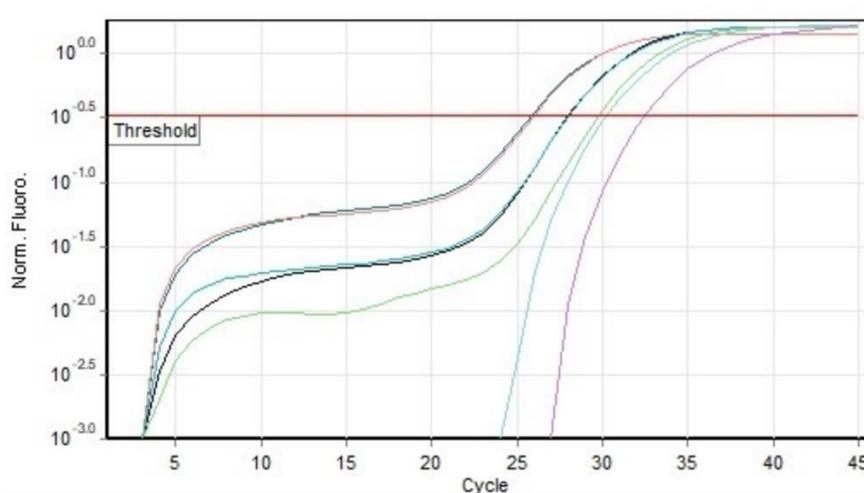
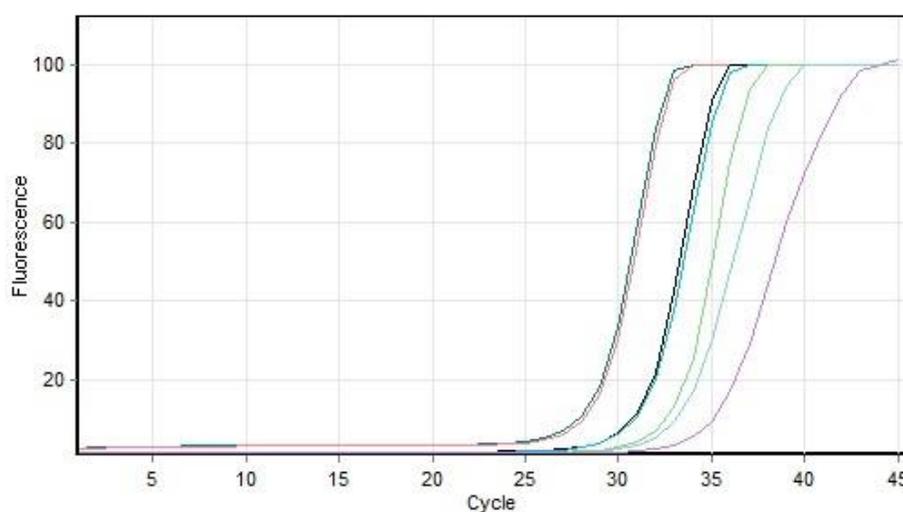
94. Lekas, P., Tin, K. L., Lee, C. & Prokipcak, R. D. The Human Cytochrome P450 1A1 mRNA Is Rapidly Degraded In HepG2 Cells. *Arch Biochem Biophys* **384**, 311–318 (2000).
95. Hakkola, J. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* **18**, 391–397 (1997).
96. Stejskalova, L., Dvorak, Z. & Pavek, P. Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art. *Curr Drug Metab* **12**, 198–212 (2011).
97. Cella, M. & Colonna, M. Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. *Semin Immunol* **27**, 310–314 (2015).
98. Julliard, W., Fechner, J. H. & Mezrich, J. D. The Aryl Hydrocarbon Receptor Meets Immunology: Friend or Foe? A Little of Both. *Front Immunol* **5**, (2014).
99. Baba, T. *et al.* Intrinsic Function of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor as a Key Factor in Female Reproduction. *Mol Cell Biol* **25**, 10040–10051 (2005).
100. Wakx, A. *et al.* Expression, Localization, and Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Human Placenta. *Int J Mol Sci* **19**, 3762 (2018).
101. Kumar, S., Verma, M. K. & Srivastava, A. K. Ultrafine particles in urban ambient air and their health perspectives. *Rev Environ Health* **28**, (2013).
102. Morales-Rubio, R. A. *et al.* In utero exposure to ultrafine particles promotes placental stress-induced programming of renin-angiotensin system-related elements in the offspring results in altered blood pressure in adult mice. *Part Fibre Toxicol* **16**, 7 (2019).
103. Li, F., Zhu, W., & Gonzalez, F. J. Potential role of CYP1B1 in the development and treatment of metabolic diseases. *Pharmacol Ther* **178**, 18–30 (2017).
104. Albrecht, E. D. & Pepe, G. J. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol* **54**, 397–408 (2010).
105. Spink, D. C. Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* **24**, 1941–1950 (2003).
106. Tsuchiya, Y. *et al.* Human CYP1B1 Is Regulated by Estradiol via Estrogen Receptor. *Cancer Res* **64**, 3119–3125 (2004).
107. Miki, N. & Tsuyoshi, Y. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Edición 1.* (Academic Press, 2014).
108. Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T. & Yokoi, T. MicroRNA Regulates the Expression of Human Cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* **66**, 9090–9098 (2006).
109. Rojas, I. Y., Moyer, B. J., Ringelberg, C. S. & Tomlinson, C. R. Reversal of obesity and liver steatosis in mice via inhibition of aryl hydrocarbon receptor and altered gene expression of CYP1B1, PPAR $\alpha$ , SCD1, and osteopontin. *Int J Obes* **44**, 948–963 (2020).

110. Larsen, M. C. *et al.* Cytochrome P450 1B1: An unexpected modulator of liver fatty acid homeostasis. *Arch Biochem Biophys* **571**, 21–39 (2015).
111. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement 1,2 1This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 2Guest Editor: Miral Dizdaroglu. *Free Radic Biol Med* **32**, 1102–1115 (2002).
112. Furness, D. L. F., Dekker, G. A. & Roberts, C. T. DNA damage and health in pregnancy. *J Reprod Immunol* **89**, 153–162 (2011).
113. Sordo M, Maciel-Ruiz JA, Salazar AM, RoblesMorales R, Veloz-Martínez MG, P.-L. & JH, et al. Particulate matter-associated MN frequencies in maternal and cord blood lymphocytes. Environmental and molecular mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* (2019) doi:doi.org/10.1002/em.22275.
114. Scharer, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012609–a012609 (2013).
115. Britten, R. A., Liu, D., Tessier, A., Hutchison, M. J. & Murray, D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer* **89**, 453–7 (2000).
116. Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J. & Reed, E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 703–708 (1994).
117. Metzger, R. *et al.* ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* **16**, 309–316 (1998).
118. Christmann, M. *et al.* Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res* **44**, 10727–10743 (2016).
119. Langie, S. A. S. *et al.* The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicol Lett* **168**, 302–309 (2007).
120. Vakilian, K. *et al.* On the Relation of Oxidative Stress in Delivery Mode in Pregnant Women; A Toxicological Concern. *Toxicol Mech Methods* **19**, 94–99 (2009).
121. Quezada-Maldonado EM, Chirino YI, Gonsebatt ME, Morales-Bárceñas R, Sánchez-Pérez Y, G.-C. C. Nucleotide Excision Repair Pathway Activity Is Inhibited by Airborne Particulate Matter (PM10) through XPA Deregulation in Lung Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* **4**, 17–23 (2022).
122. Hill, C. E. *et al.* The L84F and the I143V polymorphisms in the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene increase human sensitivity to the genotoxic effects of the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK. *Pharmacogenet Genomics* **15**, 571–578 (2005).

123. Molina, E. *et al.* The GSTM1null (deletion) and MGMT84 rs12917 (Phe/Phe) haplotype are associated with bulky DNA adduct levels in human leukocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **758**, 62–68 (2013).

# Anexo 1

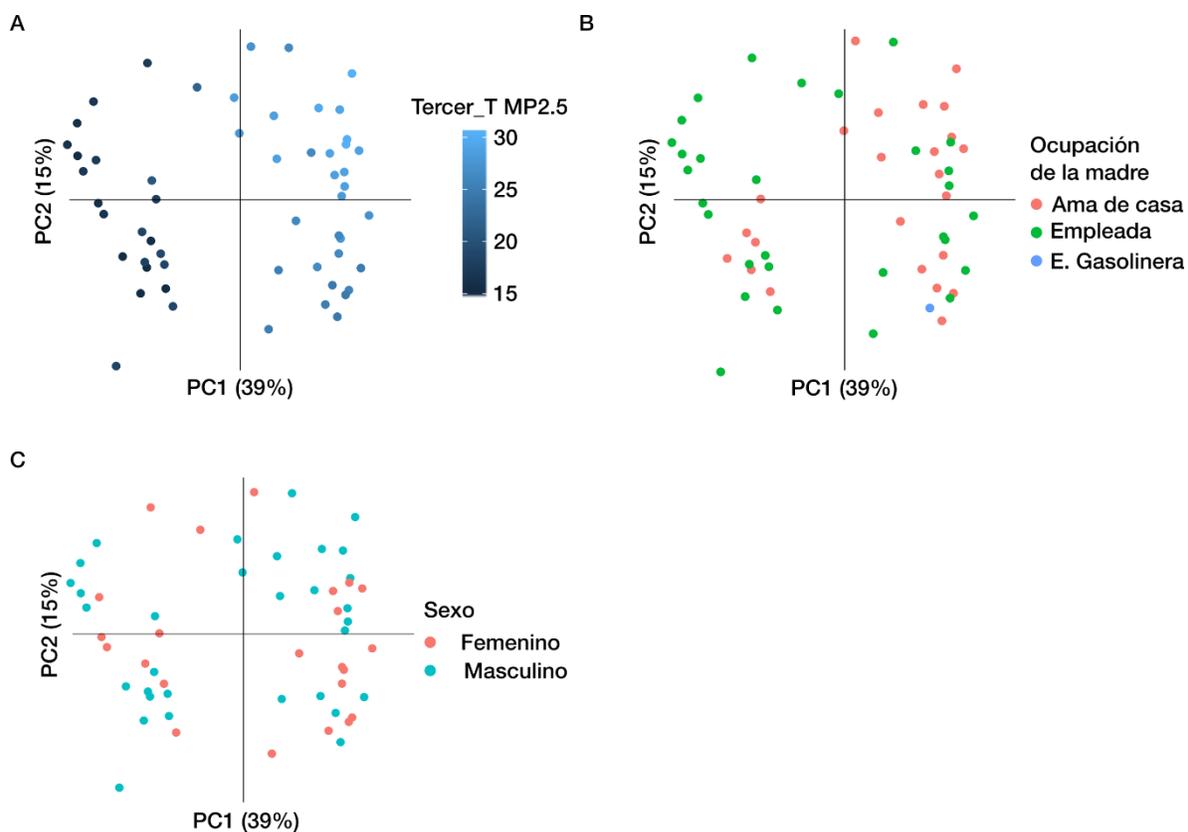
## Detección de *Cyp1A1* en placenta humana



Arriba: Detección de la fluorescencia generada por la amplificación del mRNA de *cyp1a1* contra el ciclo de PCR. Se probaron 5 diluciones de cDNA para la estandarización de la reacción, sin embargo 4 de las diluciones estuvieron dentro del rango detectable (250, 62.5, 15.62 y 3.90  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Abajo: Empleando el software de Rotor-Gene 6000 series, se realizó la cuantificación de la fluorescencia y normalización de los datos de amplificación. Como se observa, las 4 diluciones antes mencionadas superan el *threshold* y se catalogaron como dentro del rango de detección.

## Anexo 2

Identificación de las variables categóricas en el *Principal Component Analysis* de LaRaza+CimiGEN



Derivado del análisis de componentes principales, se identificó que características como la exposición a PM durante el tercer trimestre y todo el embarazo contribuyeron en mayor medida a la variabilidad de los datos, esto se puede observar en A, donde los dos conjuntos de datos claramente se diferencian uno con respecto del otro por la exposición a  $PM_{2.5}$  durante el tercer trimestre de embarazo. Sin embargo, variables la ocupación de la madre (B) y el sexo del recién nacido (C) parecen no ser características exclusivas de un grupo.

# Anexo 3

Análisis de secuencias generadas por los sets de primers diseñados para reconocer el mensajero de *CYP1A1* en una reacción de PCR

CYP1A1 T1– Reconoce:

- TYSND1 *trypsin like peroxisomal matrix peptidase 1* / 609 pb
- CYP1A1 variante 1 / 148 pb
- CYP1A1 variante 2 / 148 pb
- CYP1A1 variante 3 / 148 pb

CYP1A1 T2– Reconoce:

- CYP1A2 / 166 pb
- CYP1A1 variante 1 / 166 pb
- CYP1A1 variante 3 / 166 pb

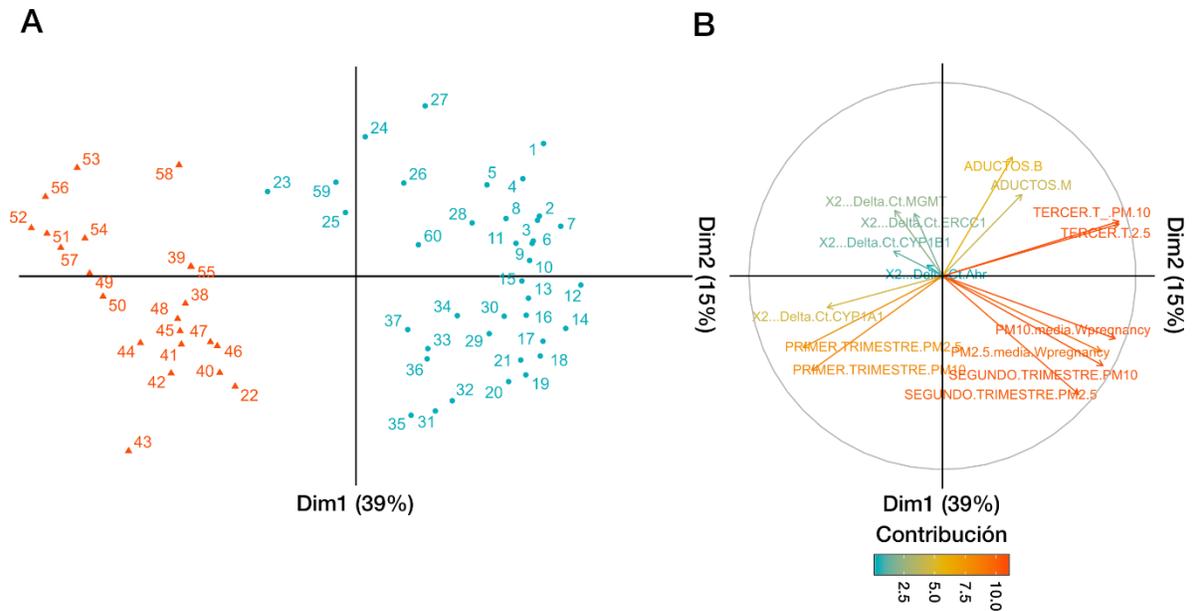
CYP1A1 T3 – Reconoce:

- CYP1A2 / 371 pb
- CYP1A1 variante 1 / 368 pb
- CYP1A1 variante 2 / 281 pb
- CYP1A1 variante 3 / 368 pb

Con la herramienta en línea *Primer- Blast* (NCBI), se realizó el análisis de los posibles productos derivados de la amplificación con distintos sets de primers para *CYP1A1*. Se presenta el nombre del gen cuya secuencia se amplifica / longitud del amplicón. De acuerdo con lo observado en el análisis, la longitud de los productos no muestra similitud con los observados en Figura 17 (Análisis de la expresión de *CYP1A1* placenta) que fueron T1: 235 pb y T2: 311, mientras que con el tercer par T3 no se observó amplicón.

# Anexo 4

El análisis de componentes principales identifica dos grupos mutuamente excluyentes



Análisis de componentes principales (PCA) de la expresión de AHR, CYP1A1, CYP1B1, ERCC1, MGMT, la exposición a PM en todas las etapas gestacionales, los parámetros perinatales, edad de la madre y niveles de aductos en la madre y cordón umbilical al momento del parto. El eje x denota el valor de PC1, mientras que el eje y denota el valor de PC2, que en conjunto explican el 54% de la variabilidad de los datos. Con cada punto en la figura representando un individuo. B) *Cicle correlation plot* entre las variables y los primeros dos componentes del PCA, Cada uno de los vectores representados corresponde a una de las variables del PCA. N=60. PM: Material Particulado. AHR: Receptor de arilos. CYP1A1: Citocromo P450 1A1. CYP1B1: Citocromo P450 1B1. ERCC1: Excision Repair Cross Complementing Group 1. MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa. PC1: Componente principal 1. PC2: Componente principal 2.

Derivado del análisis, se identificaron dos grupos mutuamente excluyentes. De acuerdo con el *cicle correlation plot* asociado ( Ver sección B) —un gráfico donde se muestran las relaciones entre todas las variables— los factores que mejor explicaron la variabilidad de los datos fueron los niveles de exposición a PM durante

el tercer trimestre y todo el embarazo, ventanas gestacionales que mostraron ser de importancia en el análisis de correlación de la figura 18, A y C.

Las características que correlacionaron de manera positiva se encuentran agrupadas en el mismo cuadrante, de esta forma se identificó que ambos niveles de aductos, el del recién nacido y la madre, se asocian de manera positiva con la exposición a  $PM_{10-2.5}$  durante el tercer trimestre.

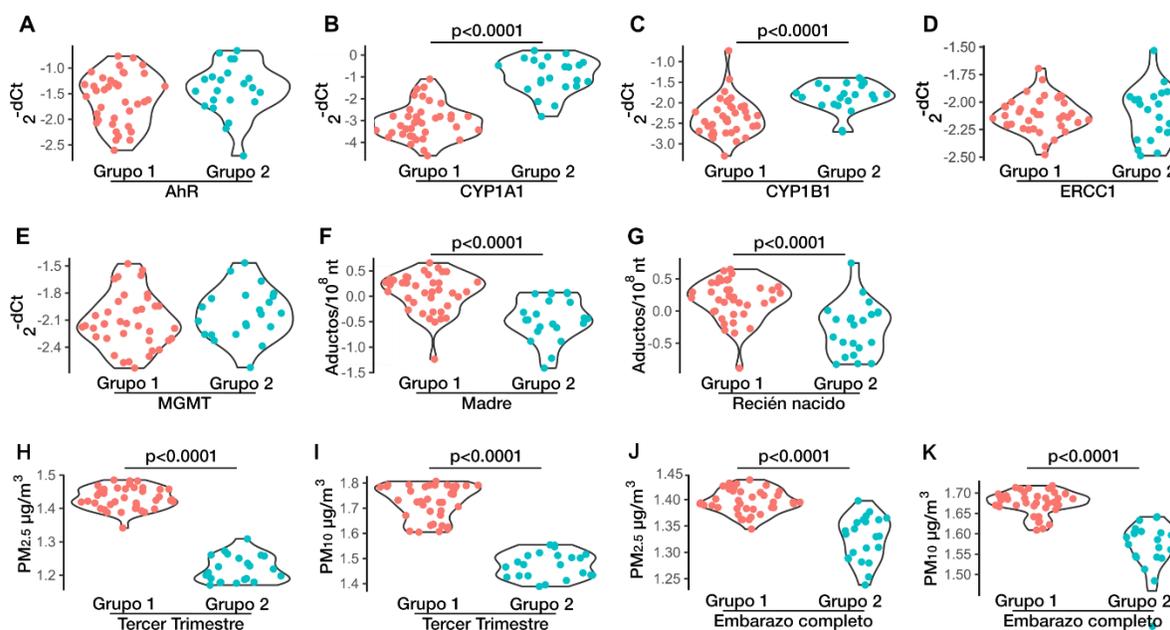
Además, como se había observado anteriormente (ver figura 18, A) el nivel de expresión de CYP1A1 correlaciona de manera positiva, únicamente con la exposición a PM del primer trimestre (LaRaza+CimiGEN). El *cicle correlation plot* también nos muestra las asociaciones negativas, trazado los vectores en los cuadrantes opuestos, tal como sucede con la expresión de CYP1A1 contra los valores de aductos en la madre y el recién nacido, incluyendo la exposición a PM durante el tercer trimestre (Figura 21).

La expresión de los genes de *CYP1B1*, *AHR*, *ERCC1* y *MGMT* están graficados dentro del mismo cuadrante (Figura 21, B), lo que puede indicar que sus mecanismos de activación están relacionados y responden ante la exposición a partículas.

Incluimos paralelamente un análisis con las variables categóricas como el sexo del recién nacido y la ocupación de la madre. La exploración consistió en asociar cada punto con su variable categórica sobre el patrón del Análisis de componentes principales (PCA). Ver Anexo 2. Sin embargo, las variables parecen no ser características exclusivas de un grupo.

## Anexo 5

Análisis de la diferencia en expresión, aductos y exposición a PM dentro de los dos grupos identificados en el PCA.



A-C) Diferencias en la expresión de los genes del metabolismo de HAPs y D-E) Genes de la reparación de aductos en ADN. F-G) Diferencias en la presencia de aductos en madres y recién nacidos. H-K) Diferencias en la exposición a  $PM_{\leq 10}$  y  $PM_{2.5}$  micras durante el tercer trimestre y todo el embarazo. Mann Whitney test  $p < 0.05$ ,  $n = 60$ . Los valores en la figura se graficaron las medianas: rango intercuartil y los niveles de expresión y aductos se representan por los valores transformados a logaritmo. PCA: Análisis de componentes principales. HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Posteriormente, analizamos las diferencias de los niveles de expresión de nuestro set de genes, los niveles de aductos y el nivel de exposición a PM durante el tercer trimestre y todo el embarazo en los grupos 1 y 2 identificados por el análisis de PCA. No encontramos diferencias en la expresión de *AHR*, *ERCC1* y *MGMT*, en ambos grupos analizados, pero sí pudo observarse que los niveles de los citocromos *1A1* y *1B1*, varían significativamente entre el grupo 1 y 2 (*CYP1A1*  $p < 0.0001$ ; *CYP1B1*  $p < 0.0001$ ). Con respecto a los niveles de aductos entre las madres de los dos diferentes grupos, pudo observarse una remarcada diferencia, estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ), donde la media de los aductos en madres del grupo 1 fue

mayor con respecto a los niveles del grupo 2. Este mismo comportamiento se observó con los niveles de aductos en cordón umbilical, donde los niveles de aductos en recién nacidos del grupo 1 fue significativamente mayor con respecto al grupo 2 ( $p < 0.0001$ ).

De manera general, los niveles de aductos parecen responder a los niveles de PM  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  durante el tercer trimestre y todo el embarazo, de tal manera que entre mayor sea la exposición a PM, mayor cantidad de aductos se forman en el ADN de los leucocitos en sangre. En el caso de los citocromos, que fueron los únicos dos genes que tuvieron cambios entre los dos grupos, la relación es inversa, a mayor exposición a PM menor la cantidad de mensajero detectada de *CYP1A1* Y *CYP1B1*.