



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente

**“PARTICIPACIÓN DE LA VÍA ROCK-MIOSINA EN LA
FORMACIÓN DE FIBRAS DE TENSIÓN DE ACTINA
EN CÉLULAS A549 EXPUESTAS A PM₁₀”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

CARLOS ABRAHAM GARCÍA GARCÍA



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ**

**ASESOR INTERNO:
Dr. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN**

MÉXICO MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DE LA VÍA ROCK-MIOSINA EN LA FORMACIÓN
DE FIBRAS DE TENSIÓN DE ACTINA EN CÉLULAS A549
EXPUESTAS A PM₁₀”**

Tesis presentada por: **Carlos Abraham García García**

Directora de tesis: **Dra. Yesennia Sánchez Pérez**

Asesor interno: **Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón**

Realizada en el Laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente
del
Instituto Nacional de Cancerología

Durante el desarrollo de esta tesis se conto con el apoyo de la beca de
PROBEI

ÍNDICE

<i>Dedicatoria y agradecimientos.....</i>	<i>i</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>Marco teórico.....</i>	<i>3</i>
<i>Contaminación ambiental</i>	<i>3</i>
<i>Características geográficas y de contaminación de la Ciudad de México ...</i>	<i>4</i>
<i>Contaminantes criterio del aire.....</i>	<i>5</i>
<i>Material particulado (PM)</i>	<i>6</i>
<i>Estudios epidemiológicos de las PM</i>	<i>7</i>
<i>Estudios toxicológicos de las PM</i>	<i>8</i>
<i>Citoesqueleto de actina.....</i>	<i>9</i>
<i>La familia de proteínas GTPasas de Rho.....</i>	<i>9</i>
<i>La vía de la proteína de ROCK.....</i>	<i>11</i>
<i>La vía de la proteína MLC.....</i>	<i>14</i>
<i>Fibras de tensión de actina.....</i>	<i>15</i>
<i>Justificación del estudio.....</i>	<i>17</i>
<i>Hipótesis</i>	<i>17</i>
<i>Objetivo general</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos particulares.....</i>	<i>18</i>
<i>Materiales y método.....</i>	<i>20</i>
<i>Colecta de PM₁₀.....</i>	<i>20</i>
<i>Cultivo celular</i>	<i>21</i>
<i>Exposición a PM₁₀.....</i>	<i>21</i>
<i>Viabilidad celular.....</i>	<i>21</i>
<i>Ciclo celular.....</i>	<i>22</i>
<i>Tinción de fibras de actina.....</i>	<i>22</i>
<i>Inmunofluorescencia de ROCK, MYPT1 y MLC.....</i>	<i>23</i>
<i>Inmunofluorescencia de ROCK – Fibras de actina</i>	<i>23</i>
<i>Inmunofluorescencia MYPT1 fosforilada (Thr 853) – Fibras de actina.....</i>	<i>24</i>

<i>Inmunofluorescencia MLC fosforilada (Ser 19) – Fibras de actina.....</i>	<i>24</i>
<i>Inhibidor de ROCK.....</i>	<i>24</i>
<i>Captura de imágenes.....</i>	<i>25</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>25</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>26</i>
<i>Citotoxicidad celular.....</i>	<i>26</i>
<i>Las PM₁₀ de la Ciudad de México inducen la formación de Fibras de tensión de actina.....</i>	<i>27</i>
<i>Expresión de ROCK en células expuestas a PM₁₀ de dos zonas de la Ciudad de México.....</i>	<i>28</i>
<i>Determinación de la actividad de ROCK a través de la fosforilación de MYPT1 en treonina 853 por PM₁₀ de la Ciudad de México.....</i>	<i>29</i>
<i>Las PM₁₀ de la Ciudad de México inducen fosforilación de la Cadena Ligera de Miosina (MLC).....</i>	<i>30</i>
<i>Las PM₁₀ de ambas zonas no inducen fibras de tensión de actina cuando se inhibe la activación de ROCK.....</i>	<i>31</i>
<i>Ciclo celular y apoptosis.....</i>	<i>32</i>
<i>Discusión.....</i>	<i>33</i>
<i>Conclusiones.....</i>	<i>41</i>

"Andábamos sin buscarnos,

pero sabiendo que andábamos para encontrarnos"

Julio Cortázar

Dedicatoria:

A mis padres:

Porque con su guía, sus consejos y paciencia me han mostrado el modelo a seguir en la vida como una persona honesta y honrada. Además me han demostrado como se puede salir adelante en tiempos difíciles, donde todos parecen optar por el camino fácil. Y porque en los tiempos malos siempre han estado ahí, para apoyarme y no dejarme caer en la vida. Porque nunca me han cortado las alas para volar y hacerme sentir que puedo realizar cualquier cosa que me proponga. Porque algunas veces han tenido carencias para que yo pudiera seguir con mis estudios y jamás me han recriminado y quejado por el tiempo que me tomo concluir la licenciatura y por el contrario me han seguido apoyando. Por todas esas cosas y las que he omitido, no sé como agradecerles y solo me resta decirles que los amo con todo mi corazón y que jamás podre pagarles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos:

Nacho, gracias por apoyarme en el tiempo que he estado haciendo esta tesis. Ernesto (Chino) y Ray que les puedo decir, gracias por esta ahí siempre que los he necesitado, con Chino tuve un inicio difícil, pero en todo el tiempo que hemos convivido te has ganado la mitad de mi corazón, nuestras aventuras juntos son las mejores. Ray eres un ejemplo a seguir, tu determinación es algo que admiro mucho, eres mi hermano trotamundos, nos has enseñado muchas cosas, andar en moto es una de ellas. Anwart, contigo puedo sentir que el mundo aun tiene solución, y sentir que las causas sociales si tienen un futuro, me recuerdas que la parte de la sociedad que financio nuestros estudios superiores merecen ser retribuidos para llegar a una sociedad más igualitaria, ojala y nadie tuviese que salir del país en busca de mejores oportunidades, y te dijo "Wish you were here". Fernando (Sherk) eres una persona inteligente con la que se puede platicar de muchas cosas, los debates que sostenemos siempre nos ponen en contra, pero eso nos lleva a mejorar nuestros argumentos en vez de alzar la voz. A Israel (Pony), te desconectaste, pero siempre te considere un hermano también, tú sabrás los motivos por los que te alejarte de nosotros, aún así eres un brother. A todos les digo que en verdad los quiero mucho y que en verdad los considero mis hermanos, porque en verdad somos carnales, carnales y son los únicos hombres que he amado en mi vida.

A mis tios:

David, gracias por ser un modelo a seguir, siempre que me hablabas de ciencia quería seguir escuchando, y esto desarrollo mi interés en aprender de ciencia y me motivo a seguir con los estudios de bachillerato y posteriormente a decidirme por estudiar la carrera de Biología, además me enseñaste que se debe ser crítico. A mi tía Sara, porque siempre ha estado en las buenas y las malas, porque en su casa todos son bienvenidos, porque es un apoyo para todos en la familia, y por el amor que nos tiene a todos. Los quiero.

A Erika:

Sin tu ayuda en la carrera, seguramente habría desertado a en los primeros semestres, por ti terminé la carrera, gracias por ser mi amiga, y por todo lo que vivimos juntos, nunca te olvidare y siempre serás parte de mi vida. Te amo.

A Guadalupe:

Hermana, siempre siento tu apoyo y por eso siempre te quiero de mi lado y a mi lado, nuestras aventuras en la escuela eran bien chidas, nos llevamos bien en seguida, tenemos tanto que contarnos que contigo el tiempo pasa muy rápido, tu y yo siempre nos impulsamos y por eso siempre te quiero dentro de mi vida y sabes que por todas esas cosas y más, te amo.

A mis hermanos los "Guarros":

Jairo, Mike, Santi, Lalo, el Hachita, Alfred, Leonel, los momentos en las canchas eran súper, para nosotros el futbol no se trataba de goles sino de cuantos caños hacíamos a los contrarios.

A mis amigas:

Yssel, los ratos contigo son los muy divertidos y no paramos de reír. A Ceci por ser mi amiga, Isela quien diría que después de todo terminamos llevándonos bien, la pasamos muy bien cuando estamos juntos, a Karla, esos pulques contigo eran los mejores.

Agradecimientos

Dra. Yesennia Sánchez Pérez, por aceptarme como alumno, por sus enseñanzas, por su tiempo y paciencia y apoyo en el desarrollo de mi tesis de licenciatura.

Dra. Claudia María García Cuellar por dejarme ser parte de su laboratorio, además del apoyo en la realización de mi tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por el apoyo en el manejo de las técnicas empleadas en el desarrollo de mi tesis de licenciatura y su amistad:

Biol. Rocío Morales Bárcenas, Dra. Imelda del Carmen González Ramírez, Dra. Martha Estela Salcido Neyoy, Dra. Natalia Manzano León, M. en C. Silvia Elizabeth Reyes Zárate, M. en C. Guadalupe Soledad López Álvarez, M. en C. Alejandro López Saavedra, Dr. Edgar Rangel López.

Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por su amistad, apoyo y asesoría en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, Dr. Edgar Ledesma Martínez y Dr. Hugo López Muñoz.

Resumen

Las PM_{10} son partículas dispersas en la atmósfera cuyo diámetro aerodinámico es $\leq 10\mu m$. Las PM_{10} son una mezcla compleja formada de compuestos inorgánicos y orgánicos, entre los que se encuentran metales de transición y material biológico. Su composición varía dependiendo de las fuentes de emisión ligadas a causas naturales y actividades antropogénicas. Estudios epidemiológicos han demostrado que las PM_{10} son factor de riesgo en el desarrollo de varias enfermedades, incluyendo cáncer de pulmón, sin embargo, se conoce poco acerca de los procesos celulares mediante los cuales las PM favorecen el desarrollo de ésta neoplasia. Nuestro grupo de trabajo reportó que si bien, las PM inducen daño al ADN, la tasa de muerte celular por apoptosis es baja y no significativa y recientemente nuestro grupo reportó que $10 \mu g/cm^2$ de PM_{10} inducen la formación de fibras de tensión de actina, sin embargo, se desconoce la vía mediante la cual las PM_{10} inducen la formación éstas fibras.

La remodelación del citoesqueleto de actina está asociada a invasividad y migración celular lo que puede favorecer el desarrollo de cáncer. El citoesqueleto de actina es crucial en la activación de redes de señalización conectadas con alteraciones en diversos procesos celulares como la proliferación motilidad y migración celular y tiene impacto en la transformación neoplásica a través de la vía de señalización de la familia de proteínas homologas de Ras (Rho) activando proteínas río abajo como la proteína Rho cinasa (ROCK) y la Cadena Ligera de Miosina (MLC). ROCK y MLC favorecen la formación de fibras de tensión de actina y esta vía se ha asociado a procesos carcinogénicos.

Con base en los antecedentes, la hipótesis de éste trabajo es que las PM_{10} de dos zonas de la Ciudad de México no inducirán apoptosis ni cambios en las fases del ciclo celular, pero inducirán la formación de fibras de tensión de actina a través de la vía de ROCK y Miosina, y la formación de fibras dependerá de la composición de las PM_{10} . Para probar ésta hipótesis, se utilizaron cultivos de células de pulmón humano (A549) expuestas a $10 \mu g/cm^2$ de PM_{10} de una Zona Industrial (ZI) y de una Zona Residencial (ZR) por 24h. Se evaluó el ciclo celular y

apoptosis mediante citometría de flujo. Las fibras de tensión de actina se evaluaron mediante faloidina marcada con rodamina (TRITC), ROCK y MLC se evaluaron por la fosforilación de residuos específicos y co-localización subcelular mediante microscopía confocal. En éste trabajo se muestra que las PM_{10} de ambas zonas de la Ciudad de México no producen cambios en el ciclo celular, con respecto a células sin exponer. Las PM_{10} de ambas zonas indujeron la formación de fibras de actina a través de la vía de ROCK-MLC, siendo las PM_{10} de la ZR las que indujeron más fibras de actina. Cuando se utilizó (Y-27632) un inhibidor de la proteína de ROCK, se observó una disminución en la formación de fibras de actina, por lo que se determinó que las PM_{10} inducen la formación de fibras de actina a través de la vía de ROCK. Con los resultados obtenidos, se puede concluir que las PM_{10} inducen la formación de fibras de tensión de actina a través de la vía ROCK-MLC y la formación de ellas es dependiente de la composición de las partículas.

La formación de fibras de actina es un proceso que se da bajo condiciones fisiológicas normales, sin embargo, bajo condiciones de estrés, éste evento se ha visto asociado con procesos de proliferación y motilidad, contribuyendo en procesos carcinogénicos y de invasión, por lo que la formación de fibras de tensión de actina inducidas por las PM_{10} podrían estar implicadas en procesos de invasividad y carcinogénesis.

Marco teórico

Contaminación ambiental

La contaminación ambiental se puede definir como la introducción de sustancias sólidas, químicas, físicas o mecánicas en el medio ambiente o algún ecosistema. Debido a la introducción de estas sustancias, se origina la contaminación del agua, del suelo y del aire (CENAPRED 2008).

La contaminación del aire, tanto en espacios interiores como al aire libre, constituye un grave problema de salud ambiental que afecta a los países desarrollados y en desarrollo por igual (WHO 2011). Los contaminantes presentes en la atmósfera proceden de dos tipos de fuentes emisoras bien diferenciadas: las naturales y las antropogénicas. En el primer caso, la presencia de contaminantes se debe a causas naturales, mientras que en el segundo tiene su origen en las actividades humanas (WHO 2011). Las emisiones primarias originadas por los fenómenos naturales provienen fundamentalmente de los volcanes, incendios forestales y descomposición de la materia orgánica en el suelo y en los océanos; además la vida animal y vegetal juegan un papel importante en el problema de la contaminación del aire. Por otro lado, las principales emisiones primarias de origen antropogénico se pueden clasificar en focos fijos, focos móviles y focos compuestos. Las emisiones por focos fijos son derivadas de procesos industriales, instalaciones fijas de combustión e instalaciones de calefacción, principalmente de uso domésticos; las emisiones por focos móviles se originan por vehículos automotores, aeronaves y buques; y las emisiones por focos compuestos está dada por parques industriales y áreas urbanas (Jiménez Cisneros 2005). La contaminación del aire se presenta principalmente en las grandes ciudades y altamente pobladas, entre las que se encuentra la Ciudad de México (Romero-Lankao, Qin et al. 2013).

Características geográficas y de contaminación de la Ciudad de México

El área metropolitana de la Ciudad de México es una de las zonas con mayores problemas de contaminación ambiental en el mundo. Está ubicada a 2,240 m sobre el nivel del mar, tiene una extensión aproximada de 7,860 km² y se encuentra rodeada por importantes cadenas montañosas, al sur por la cordillera de la Sierra Madre Oriental. Si bien la mayor parte del territorio del Distrito Federal es plano, tiene algunas elevaciones en la zona sur como es el caso del cerro del Ajusco y otros cerros aledaños (INAFED 2010), estas elevaciones montañosas impiden la libre circulación del aire, lo cual agrava las condiciones ambientales de la Ciudad (Departamento del Distrito Federal 1996) (Figura 1).

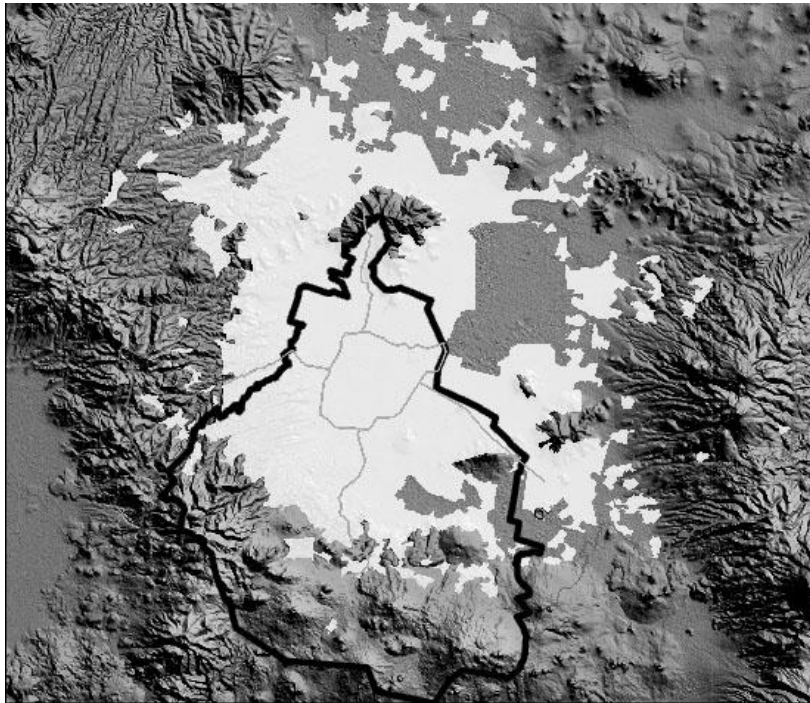


Figura 1. Valle de la Ciudad de México. La Ciudad de México se encuentra rodeada por varias cadenas montañosas. En la imagen se puede apreciar las cordilleras montañosas y en un color claro, el área del valle donde se concentran los contaminantes atmosféricos según las estaciones del sistema de monitoreo atmosférico (SIMAT) (SIMAT 2013). (Imagen tomada y modificada del SIMAT, 2013).

Adicional a las características geográficas de la Ciudad de México, existen importantes problemas relacionados con la industria y el transporte; para el 2006 se estimó que el parque vehicular de la zona metropolitana era de

aproximadamente tres millones de automóviles. En los últimos años, el parque vehicular ha crecido a un ritmo cercano al 10 % anual, por lo que para el 2011, la cantidad de vehículos registrados fue de más de cuatro millones (INEGI 2012), generando un elevado consumo de combustibles, con la consecuente emisión de contaminantes. Asimismo, se ha detectado una enorme discordancia entre el sitio de residencia y el lugar de trabajo de la población, lo que origina el recorrido de enormes distancias varias veces en un día; actualmente se estima que se realizan alrededor de 36 millones de viajes-persona-día, de los cuales 21.4% se hacen en automóvil particular (Departamento del Distrito Federal 1996). Por estas razones, uno de los grandes problemas ambientales en la Ciudad de México es la calidad del aire, que cada año provoca 15 mil muertes prematuras (Enciso 2013). Si bien, el problema de la contaminación del aire se ha venido estudiando más a profundidad en los últimos años, es en la década de los 50's cuando se comenzaron a estudiar sus componentes y los daños asociados a la salud en las personas en ciudades de Europa (Schwartz 1994), además se ha demostrado que los efectos que estos producen en las personas se da de acuerdo a la zona geográfica, y actividades antropogénicas (Englert 2004).

El deterioro de la calidad del aire, puede en muchos casos percibirse con facilidad, especialmente en las grandes ciudades, al disminuir la visibilidad del paisaje o causar irritación de los ojos, garganta, etc. Sin embargo, más allá de ver el aire limpio o sucio, es necesario evaluar de manera cuantitativa su calidad, lo cual se hace mediante la medición de la concentración de los contaminantes que se presentan (INECC 2013), ya que la exposición crónica a contaminantes ambientales puede favorecer enfermedades más severas como es el cáncer de mama (Huo, Zhang et al. 2013), gástrico (Chiu, Tsai et al. 2011), y por supuesto el de pulmón (Pope, Burnett et al. 2002).

Contaminantes criterio del aire

Los contaminantes del aire se han clasificado como contaminantes criterio y contaminantes no criterio. Los contaminantes criterio se han identificado así por ser perjudiciales para la salud y el bienestar de los seres humanos. Se les llamó

contaminantes criterio porque fueron objeto de evaluaciones publicadas en documentos de calidad del aire en los Estados Unidos (EU), con el objetivo de establecer niveles permisibles para disminuir los efectos en salud, el medio ambiente y el bienestar de la población. Actualmente el término “contaminantes criterio” ha sido adoptado en muchos países, y éstos contaminantes son: bióxido de azufre, bióxido de nitrógeno, plomo, monóxido de carbono, ozono y material particulado (conocidas como PM por sus siglas en inglés Particulate Matter), específicamente, el material con un tamaño aerodinámico \leq a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) y $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) (INECC 2013). Por su composición y efectos en la salud en el ser humano, el contaminante del aire de interés para esta investigación es el material particulado.

Material particulado (PM)

Las PM son una mezcla compleja de contaminantes ambientales que varía de tamaño y oscila entre $0.0002 \mu\text{m}$ a $500 \mu\text{m}$, y en conjunto, se designan como partículas suspendidas totales (PST) (Jiménez Cisneros 2005). Las PST es el término más comprensivo e incluyen partículas de cualquier tamaño suspendidas en el aire (diámetro aerodinámico) (Englert 2004). Las PST son una mezcla compleja de partículas líquidas y sólidas que contiene sustancias orgánicas e inorgánicas suspendidas en el aire. Las PM se clasifican de acuerdo a su diámetro aerodinámico en partículas con un tamaño aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}), ≤ 2.5 ($\text{PM}_{2.5}$) y ultrafinas (UF). Las PM_{10} también son llamadas partículas inhalables, ya que son capaces de penetrar a las vías respiratorias profundas y suponen mayor peligro porque, al ser inhaladas, pueden alcanzar las zonas periféricas de los bronquiolos y alterar el intercambio pulmonar de gases (Englert 2004; O'Neill, Loomis et al. 2004) (Figura 2).

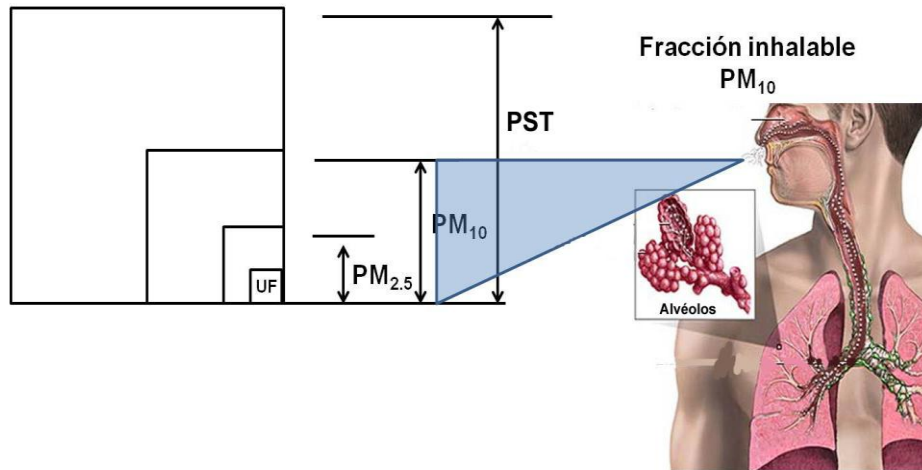


Figura 2. Esquema de la clasificación por tamaños de las partículas contaminantes (PM). Fracción de PM_{10} y $PM_{2.5}$ y Ultra Finas (UF) dentro de las partículas suspendidas totales (PST). La fracción de partículas que es inhalable, puede llegar hasta las vías respiratorias profundas y alojarse dentro de los alvéolos y alterar el intercambio gaseoso. Tomada y modificada de Englert, 2004 y adaptado para la ciudad de México (SIMAT, 2007).

Estudios realizados por diversos investigadores han presentado evidencias que sugieren que las PM_{10} pueden tener efectos adversos sobre la salud de la población que habita en ciudades con problemas de contaminación, efectos asociados a su tamaño, origen y composición (Schwartz 1994; Seaton, MacNee et al. 1995; Frampton 2001; Pope, Burnett et al. 2002; Englert 2004; Brunekreef and Forsberg 2005).

Estudios epidemiológicos de las PM

Diversos estudios han determinado que una exposición prolongada a las PM de ciudades contaminadas tiene efectos adversos en la salud de los humanos, tanto en el sistema respiratorio como en el sistema cardiovascular (Pope, Burnett et al. 2002; Englert 2004; Brunekreef and Forsberg 2005). En la pasada década, estudios de cohorte han indicado que las altas concentraciones de PM_{10} tienen una mayor repercusión en individuos predispuestos de la población, como niños y adultos mayores; así como en personas con problemas cardiorespiratorios (Pope, Burnett et al. 2002; Englert 2004). Diferentes autores han determinado que el incremento de 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} genera un riesgo relativo de tener problemas cardiovasculares y pulmonares, estos estudios también sugieren que la exposición prolongada a las PM tiene incidencia en morbilidad y mortalidad (Pope, Burnett et al. 2002; Englert 2004; O'Neill, Loomis et al. 2004). Importantemente,

también se ha determinado que existe un riesgo de aproximadamente 8% de desarrollar cáncer de pulmón y una tasa relativa de mortalidad de 1.14 por cada incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ (Pope, Burnett et al. 2002).

Estudios toxicológicos de las PM

En la búsqueda de los mecanismos mediante los cuales las PM inducen efectos en la salud del humano, se han realizado diversos estudios toxicológicos utilizando modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, que puedan ayudar a entender los mecanismos mediante los cuales las PM_{10} tienen efecto en la salud de los humanos. Éstos estudios han demostrado que las PM_{10} al penetrar hasta las vías respiratorias profundas (Frampton 2001; Karlsson, Nilsson et al. 2005), causan procesos proinflamatorios como la liberación del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), interleucinas (IL) como la IL-6 y la IL-8, y macrófagos alveolares (MA) (Seaton, MacNee et al. 1995; Becker, Soukup et al. 1996; Bonner, Rice et al. 1998; Alfaro-Moreno, Martínez et al. 2002), inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chirino, Sánchez-Pérez et al. 2010), además las PM son genotóxicas (Karlsson, Nilsson et al. 2005; Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2009), y citotóxicas (Alfaro-Moreno, Martínez et al. 2002).

En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha reportado que concentraciones subletales de PM_{10} ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) inducen daño a DNA, lípidos y proteínas, vía estrés oxidante (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2009; Chirino, Sánchez-Pérez et al. 2010). También determinaron en células alveolares de pulmón humano (A549) que las PM_{10} inducen un estado de tipo senescencia asociado a estrés oxidante y daño a DNA (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2009). Recientemente se ha visto que las PM_{10} de la Ciudad de México inducen un incremento en la formación de fibras de tensión de actina, además de la fosforilación de ERK, lo que podría estar relacionado con la remodelación en las fibras de actina del citoesqueleto (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2014). Sin embargo, no se sabe la vía mediante la cual las PM inducen la formación de fibras de tensión de actina.

Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina, forma la estructura de andamiaje celular que provee a las células su morfología, polaridad, transporte vesicular intracelular, tensión, unión celular, propiedades de adhesión y la capacidad para moverse (Heng and Koh 2010). El citoesqueleto de actina, ejerce fuerzas y provoca movimientos sin cambios químicos importantes (Alberts Bruce 2002). La actina es una proteína globular altamente conservada que se encuentra en todas las células eucariotas. Los filamentos de actina (actina-F), están formados por una apretada hélice de monómeros de actina globular (actina-G), orientados uniformemente. Un filamento de actina es una estructura polar, con dos extremos estructuralmente distintos, un extremo “menos”, relativamente inerte y de crecimiento lento y un extremo “más”, de crecimiento rápido. A causa de la apariencia de flecha del complejo formado entre los filamentos de actina y la proteína motora miosina, el extremo menos se conoce también como el extremo en punta y el extremo más como extremo ancho o barbado (Alberts Bruce 2002).

La regulación del citoesqueleto de actina es uno de los procesos más importantes en las funciones celulares, ya que participa en eventos como el ciclo celular, por ejemplo, al inicio de G1 y al final de la mitosis durante la citocinesis, lo que sugiere que para que se lleve a cabo un buen inicio en la mitosis el citoesqueleto de actina debe estar intacto, por lo que la pérdida de la integridad del citoesqueleto de actina, además de causar un retraso en la mitosis, la disrupción de los filamentos de actina puede conducir a un arresto durante la fase G1 del ciclo celular, en este sentido, la familia de RhoA/ROCK es la responsable de regular la remodelación del citoesqueleto de actina a través de las diferentes fases del ciclo celular (Denicourt and Dowdy 2004).

La familia de proteínas GTPasas de Rho

Las proteínas de GTPasas de Rho pertenecen a la superfamilia de Ras, en humanos esta familia de proteínas de unión a GTP consiste de más de 20 proteínas que varían en tamaño entre 20-30 KDa. Como Ras, las GTPasas de Rho actúan como interruptores moleculares en el ciclo de un estado activo, unida

a GTP a un estado inactivo unida a GDP. El ciclo entre esos dos estados es activado por los factores de intercambio de guanina (GEFs), e inactivado por la proteína activadora de GTPasas (GAPs) y el inhibidor de disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) (Alberts Bruce 2002; O'Connor and Chen 2013) (Figura 3).

La principal función de las pequeñas GTPasa de Rho es la de coordinar la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a la activación de receptores (incluyendo factores de crecimiento, citocinas y receptores de adhesión), que a su vez regulan la actividad de GEF y GAP (Ridley 1997; Riento and Ridley 2003).

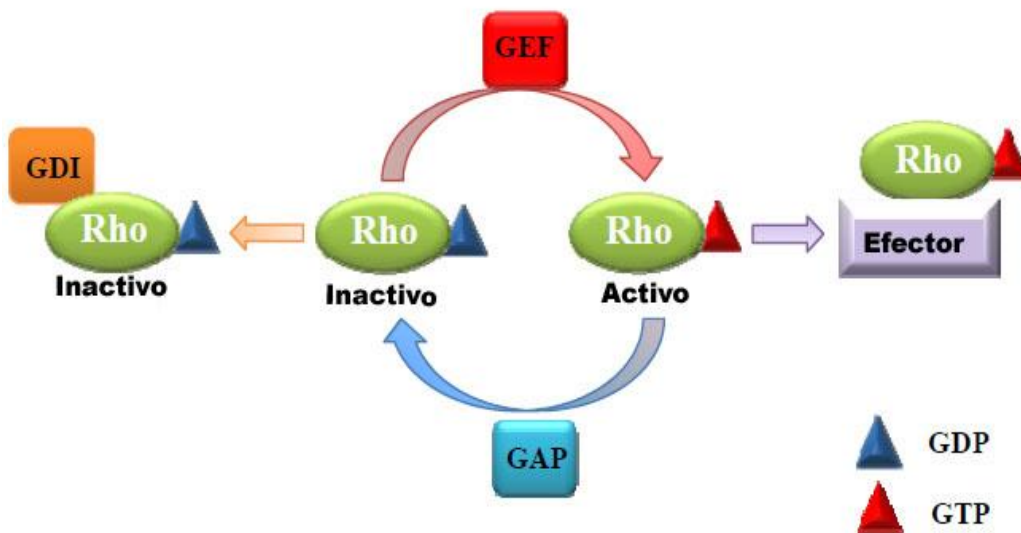


Figura 3. Mecanismos de activación de Rho. Las GTPasas de Rho se activan mediante la interacción con los factores de intercambio de guanina (GEF), la proteína activadora de GTPasas (GAP) y el inhibidor de disociación de guanina (GDI). GAP inactiva a las proteínas de Rho al hidrolizar la molécula de GTP que cambia a su estado de GDP y queda fuertemente unida a la proteína de Rho, al encontrarse unida la Rho-GDP, GEF activa a Rho promoviendo la liberación de GDP, quedando libre para unirse a GTP-Rho, y de esta manera Rho activa un efector de algún proceso celular. GDI regula el ciclo de GDP a GTP al estar unida a algunas proteínas de Rho y mantenerlas inactivas. Tomada y modificada de Chi et al, 2013.

Muchos de los miembros de la familia de Rho son reconocidos por sus contribuciones en la reorganización del citoesqueleto de actina que conduce a la

motilidad e invasión celular, principalmente RhoA, Rac1 y Cdc42 (Sahai and Marshall 2002; Riento and Ridley 2003). Las tres formas de Rho (RhoA, RhoB y RhoC) son reguladores importantes en diferentes mecanismos del comportamiento celular como son la motilidad, proliferación celular y apoptosis (Etienne-Manneville and Hall 2002; Sahai and Marshall 2002; Riento and Ridley 2003; Jaffe and Hall 2005). Estudios recientes han demostrado que las GTPasas de Rho tienen un papel importante en la migración celular, reorganización del citoesqueleto y adhesiones focales, por estas razones es muy aceptado que la señalización de Rho puede contribuir en la invasión tumoral y metástasis (Coleman, Densham et al. 2006; Chi, Wang et al. 2013; O'Connor and Chen 2013).

RhoA es capaz de mediar la formación de fibras de tensión de actina y generar la fuerza contráctil para la migración celular (Ridley 1997; Riento and Ridley 2003; O'Connor and Chen 2013). RhoA sirve como mediador en múltiples aspectos de la progresión tumoral, incluyendo la transformación, citocinesis, angiogénesis, degradación de la matriz extracelular y la diseminación tumoral (O'Connor and Chen 2013). Además, RhoA es capaz de modular las dinámicas del citoesqueleto de actina a través de su principal efector Rho cinasa (ROCK), siendo ésta proteína su principal blanco río abajo (Riento and Ridley 2003; Li, Jiang et al. 2013) (Figura 4).

La vía de la proteína de ROCK

ROCK es quizá la proteína más importante en la cascada de señalizaciones que controla la proteína de RhoA para llevar a cabo la remodelación del citoesqueleto de actina. ROCK es regulado principalmente por las Rho-GTPasas RhoA, RhoB y RhoC. Las tres proteínas se unen a ROCK en el dominio de unión RBD (Rho-binding Domain) en este dominio se une RhoA-GTP activando y potencializando la actividad catalítica de ROCK a través de la inducción de un cambio conformacional que expone su dominio cinasa (Schofield and Bernard 2013). ROCK regula la fosforilación de múltiples proteínas blanco río abajo, incluyendo la cadena ligera de miosina y LIMK (LIM cinasa) (Coleman, Sahai et al. 2001; Sebbagh, Renvoize et al. 2001), y este evento controla la polimerización y

ensamble del citoesqueleto de actina, evento que se relaciona con la contractilidad celular.

La fosforilación de MLC en Serina 19 (Ser 19) regula la inducción de la interacción entre miosina II y actina, por lo que activa a la miosina ATPasa y esto resulta en el aumento de la contracción celular (Riento and Ridley 2003; Schofield and Bernard 2013). El control de ROCK sobre el citoesqueleto se da a través de la regulación de la Cadena Ligera de Miosina (MLC). La fosforilación de MLC induce la actividad de la proteína motor miosina II tiene un papel importante en la regulación de la contractibilidad de la actomiosina (Unión de dos proteínas, la actina y la miosina, responsable de la contractilidad muscular). La cantidad de miosina fosforilada depende principalmente del balance de dos enzimas, MLC cinasa (MLCK), MLC fosfatasa (MLPC) y Ca^{2+} .

ROCK, tiene dos isoformas, ROCK1 y ROCK2, ambas isoformas pueden fosforilar la cadena ligera de miosina (MLC), la cual promueve la actividad de la miosina II. La fosforilación de la MLC promueve el ensamble de la miosina II dentro de los filamentos bipolares y potencializa la actividad de la ATPasa de la miosina II. Estos efectores en conjunto, incrementan la fuerza contráctil generada por la miosina II sobre los filamentos de actina. ROCK también fosforila y activa la cinasa LIM (LIMK) que estando activa inhibe la despolimerización de los filamentos de actina a través de la fosforilación de cofilina (Figura 4). De esta manera se mantiene la estabilidad del citoesqueleto de actina (Lessey, Guilluy et al. 2012; O'Connor and Chen 2013).

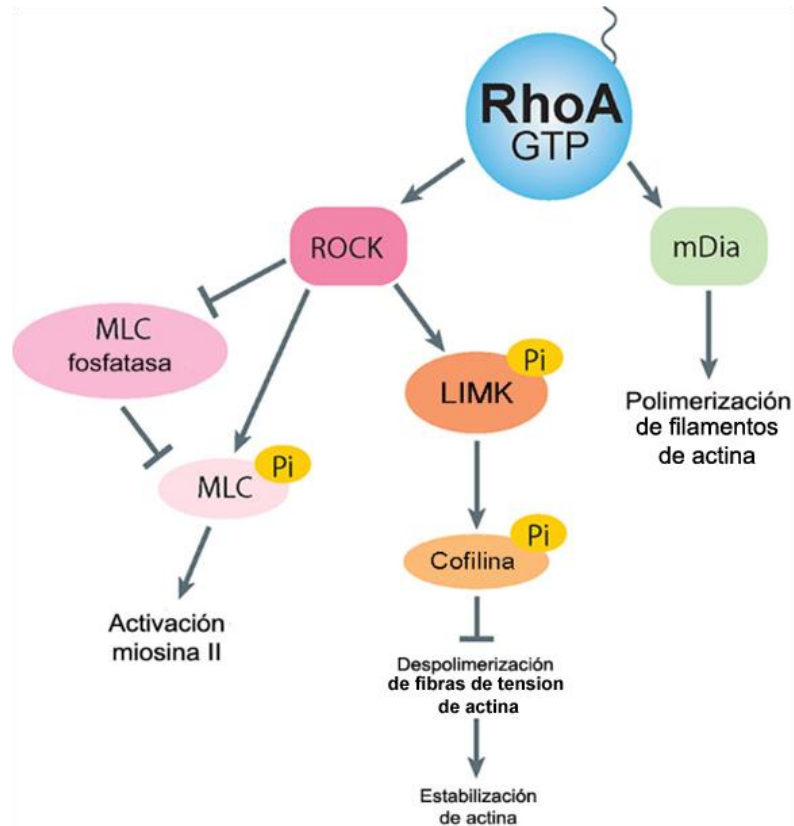


Figura 4. La vía de RhoA. ROCK fosforila directamente a MLC lo que incrementa la actividad de la miosina II para llevar a cabo la formación de la fibras de tensión de actina, además ROCK inhibe la acción de la MLC fosfatasa para inhibir su función de fosfatasa hacia MLC. ROCK también fosforila a LIMK que a su vez fosforila a cofilina lo que evita la despolimerización de las fibras de actina. Además RhoA induce directamente la activación de mDia1 para llevar a cabo la formación de los filamentos de actina. Tomado y modificado de Lessey et al., 2012.

ROCK tiene otros sustratos mediante los cuales controla la actividad de la miosina II, a través del control en la fosforilación de la cadena ligera de miosina. ROCK se une a la cadena ligera de miosina fosfatasa (MYPT), la cual fosforila y de esta manera inactiva su actividad de fosfatasa hacia MLC. Además, ROCK también fosforila directamente a MLC, lo que favorece un incremento en la actividad de la miosina ATPasa y la formación de fibras (Pfitzer 2001; Chen, Guerriero et al. 2008; Narumiya, Tanji et al. 2009). Adicionalmente, mediante estudios de inmunofluorescencia se encontró la localización subcelular de MYPT1, la cual co-localiza con miosina y las fibras de tensión de actina (Matsumura and Hartshorne 2008).

En el estudio de los procesos celulares que tienen que ver con los dinamismos del citoesqueleto de actina y las funciones celulares, ROCK es una de

las proteínas más estudiadas, ya que las alteraciones en ROCK, puede llevar a la transformación celular, procesos invasivos, desarrollos de patología y también cáncer (Etienne-Manneville and Hall 2002; Coleman, Densham et al. 2006; Chen, Guerriero et al. 2008; Heng and Koh 2010; Chi, Wang et al. 2013; Schofield and Bernard 2013). La inhibición de ROCK con un inhibidor específico (Y-27632), ha demostrado que puede bloquear las funciones celulares donde ROCK participa, y se ha observado que la inhibición de ROCK retrasa el ciclo celular, bloquea la unión de puntos focales; así como también inhibe la formación de fibras de tensión de actina. En este sentido ROCK es una proteína adecuada para el desarrollo de terapias contra el cáncer.

La vía de la proteína MLC

La Cadena Ligera de Miosina (MLC) es una proteína compleja con múltiples subunidades que regula la contracción celular mediada por la actividad catalítica de la actomiosina. La MLC es una proteína catalítica que se encuentra en el núcleo de la miosina II y que regula la actividad de la miosina ATPasa para habilitar la interacción con actina-F y modular la contracción celular (Amano, Ito et al. 1996). La fosforilación de la MLC, promueve la actividad de la miosina II ATPasa que conduce al incremento de las contracciones de la célula, esta actividad es predominantemente dependiente del equilibrio entre Ca^{2+} (Heng and Koh 2010; Lessey, Guilluy et al. 2012; Schofield and Bernard 2013).

Bajo condiciones normales, la estabilidad del complejo de uniones del citoesqueleto es mantenida a través del balance célula-célula y las fuerzas de adherencia a la matriz y la tensión contráctil del citoesqueleto. En las células endoteliales durante la estimulación por agentes inflamatorios, la polimerización y formación de las fibras de tensión de actina ocurren acompañadas de la fosforilación de la cadena ligera de miosina. Esas respuestas del citoesqueleto actúan produciendo una fuerza centrípeta contráctil que compite con las adhesiones célula-célula lo que representa un ensanchamiento del espacio intercelular y este proceso está involucrado con la invasividad (Yuan, Shen et al. 2012).

Fibras de tensión de actina

Las fibras de tensión de actina controlan procesos importantes como la movilidad y contracción de la célula durante la división celular (Narumiya, Tanji et al. 2009). La alteración en las funciones de las fibras de tensión de actina puede resultar en proliferación celular, desprendimientos de la matriz extracelular y la transformación celular, lo que está asociado con el desarrollo de tumores y metástasis (Ridley 1997; Heng and Koh 2010; Chi, Wang et al. 2013)

Las fibras de tensión de actina son estructuras macromoleculares compuestas por filamentos de actina entrelazados y de proteínas de miosina motor II. Las fibras de tensión de actina contienen paquetes de filamentos paralelos de actina-F intercalados con arreglos paralelos de miosina II. Estas fibras de tensión generan la fuerza contráctil que ayuda en el movimiento hacia delante de las células migrantes a través del ciclo de la Miosina II ATPasa (Schofield and Bernard 2013).

El ciclo de la Miosina II ATPasa es un proceso con múltiples pasos, inicia con la fosforilación de la MLC2, que permite la subsecuente carga de ATP de la cadena pesada de miosina. La subsecuente hidrólisis de ATP a ADP más fosfato inorgánico (Pi) resulta en la unión de la cadena pesada a actina-F. La liberación de ADP y Pi causa un cambio conformacional en la región de la cabeza de la cadena pesada de miosina que resulta en un “golpe de fuerza” de actina-F. La señalización de ROCK potencializa el ciclo de la miosina II ATPasa de dos formas. Primero, ROCK fosforila directamente a MLC2. Además, y por otro lado, ROCK fosforila a la cadena ligera de miosina fosfatasa (MYPT) inhibiendo su actividad de fosfatasa hacia la MLC2 (Schofield and Bernard 2013).

Las proteínas de Rho son de gran importancia, ya que se sabe juegan un papel importante en la transformación celular, y por lo tanto estas proteínas o los componentes de esta vía de señalización celular han sido de gran interés en el desarrollo de terapias anticáncer (Ridley 1997).

Si bien, nuestro grupo recientemente reportó que las PM_{10} de la Ciudad de México inducen fibras de actina, se desconoce el mecanismo mediante el cual las PM_{10} están induciendo la formación de éstas fibras de tensión de actina (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2014).

Las PM_{10} son capaces de inducir la formación de fibras de tensión de actina y además daño a DNA pero no inducen apoptosis. Debido a que el citoesqueleto de actina participa en procesos celulares importantes y su alteración o la de las proteínas que lo regulan son eventos que favorecen el desarrollo de cáncer, el objetivo de este trabajo fue determinar si la formación de las fibras de tensión de actina esta mediada por la vía de ROCK y MLC.

Justificación del estudio

La exposición a contaminantes atmosféricos, principalmente a las PM_{10} han demostrado ser un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, respiratorias y cáncer. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha encontrado que las PM_{10} de la Ciudad de México pueden inducir la formación de fibras de tensión de actina. Las fibras de tensión se han asociado a procesos tumorales e invasivos, modulados a través de la familia de GTPasas de Rho, principalmente RhoA y su proteína blanco río abajo, ROCK. Por otro lado, las alteraciones en la vía de ROCK se han asociados al desarrollo de neoplasias y transformación celular. Por esta razón, ROCK se ha propuesto como candidato en el desarrollo de terapias anticáncer.

Hipótesis

Las PM_{10} inducirán la formación de fibras de tensión de actina vía la activación de, ROCK y Miosina, la formación de fibras dependerá de la composición de las PM_{10} y no se encontraran cambios en las fases del ciclo celular o apoptosis.

Objetivo general

Identificar la participación de la vía de ROCK-MLC en la formación de fibras de tensión de actina en células expuestas a PM_{10} de la Ciudad de México con diferente composición (una zona industrial y una zona comercial).

Objetivos particulares

Determinar la citotoxicidad celular mediante la técnica del cristal violeta, en células A549 expuestas a 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México durante 24h, colectadas en el 2007.

Evaluar el ciclo celular mediante la técnica de citometría de flujo, en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México por 24h.

Determinar la formación de fibras de tensión de actina por medio de faloidina marcada con rodamina (TRITC) con un ensayo de fluorescencia, en células A549 expuestas 24h a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México.

Determinar la expresión de ROCK mediante la técnica de inmunofluorescencia en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México por 24h.

Determinar la activación de ROCK a través de la fosforilación de su sustrato específico, MYPT1 en treonina 853 en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México por 24h, a través de inmunofluorescencia.

Determinar la fosforilación de MLC en serina 19 mediante inmunofluorescencia, en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México por 24h.

Hacer la co-localización de ROCK y MLC y las fibras de tensión de actina mediante un triple marcaje por medio de la técnica de inmunofluorescencia.

Determinar la participación de ROCK en la formación de fibras de tensión de actina en células A549 expuestas 24h a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la

Ciudad de México mediante la utilización del inhibidor específico de ROCK, Y-27632.

Determinar si existen diferencias en los efectos evaluados dependiendo de la composición de las PM_{10} .

Materiales y método

Colecta de PM₁₀

Las PM₁₀ fueron colectadas en dos zonas de la Ciudad de México; una zona industrial (ZI) al norte de la ciudad, en donde la principal actividad económica es la industria, y una zona residencial (ZR) al sur, en la cual el factor más importante es el tránsito vehicular (Figura 5). Para la colecta de las PM₁₀ se usó un muestreador de grandes volúmenes con un flujo de 1.13 m³/min (GMW modelo 1200 VFC HVPM10; Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA). Las PM₁₀ fueron colectadas sobre un filtro de nitrocelulosa con poros de 3.0 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany), 3 días por semana durante el 2007. Los filtros se almacenaron en obscuridad, a 4°C en un desecador antes de remover las partículas. Las partículas fueron colectadas de los filtros raspando cuidadosamente la membrana con una hoja quirúrgica libre de endotoxinas en viales de vidrio libre de endotoxinas. Las partículas colectadas de cada zona se mantuvieron en obscuridad y secas a 4 °C hasta su uso (Alfaro-Moreno, Torres et al. 2009).

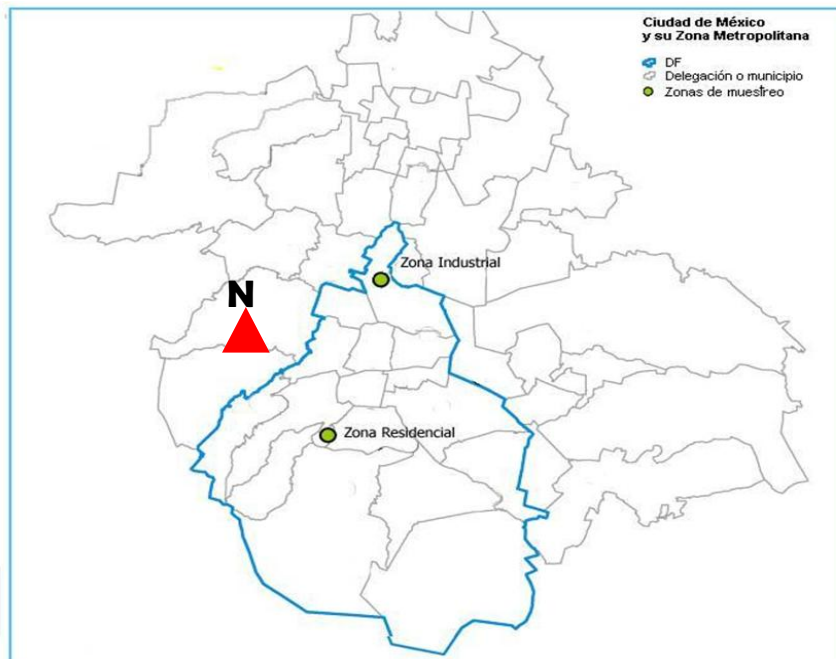


Figura 5. Zonas de colecta de las PM₁₀. Al norte de la Ciudad de México se encuentra la Zona Industrial (ZI) y al sur está la Zona Residencial (ZR). Mapa tomado y modificado del SIMAT 2012.

Cultivo celular

Para la realización de éste trabajo se utilizó la línea celular A549 proveniente de carcinoma de pulmón humano, establecida en 1972, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA, USA). Las células A549 son derivadas de carcinoma, y éstas han mantenido muchas de las características morfológicas y metabólicas de células de epitelio de tipo II normal (Foster, Oster et al. 1998). Por otro lado, no hay reportes que indique que se encuentre alterada la vía de RhoA. Las células se cultivaron en medio F12K suplementado con 10% de suero fetal bovino y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ (NUAIRE, NU-4750). Una vez que las células alcanzaron un 80% de confluencia se emplearon para los experimentos. Todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado.

Exposición a PM₁₀

Después de que las células alcanzaron 80% de confluencia, se removió el medio de cultivo y se reemplazo con medio libre de suero más PM₁₀. El medio libre de suero se usó para evitar que la albumina contenida en el suero fetal bovino actuara como un quelante de metales y enmascarara algunos efecto de las partículas. Las PM se pesaron y se esterilizaron inmediatamente antes de los experimentos. Se realizaron suspensiones de 1 mg/mL de PM en medio F-12 de Kaighn, y de estas suspensiones se tomaron las alícuotas necesarias para alcanzar las concentraciones finales de 5, 10 y 20 µg/cm² en el cultivo celular.

Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular se empleo la técnica de cristal violeta, midiendo el número de células residuales (vivas) teñidas con cristal violeta. En placas de 96 pozos se sembraron 10,000 células, y después de 24 h se expusieron a 10µg/cm² de PM₁₀ por 24. Transcurridas las 24 h se retiro el medio, y se lavaron las células con 100 µl por pozo de Buffer de Fosfatos Salino (PBS) que contenía 1.059 mM de KH₂PO₄, 155.174 mM de NaCl, 2.96 mM de Na₂HPO₄-7H₂O, pH 7.4, se retiro el PBS y las células se fijaron con 100 µl de paraformaldehído al 4%. Las placas se almacenaron a 4°C durante 24 h. Posteriormente se retiro el paraformadehído y se agregaron 100 µl de cristal violeta al 0.1% en PBS durante 10 min en agitación,

para permitir que el colorante penetre la membrana de las células que quedaron adheridas. Se retiró el colorante con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante, y se quitó el exceso de agua. Se agregaron 50 μl por pozo de ácido acético al 33% y se puso en agitación durante 10 min., lo que permitió extraer el colorante de las células. La placa se analizó en un espectrofotómetro (TECAN Genios basic) a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados se reportaron como por ciento con respecto al control de células sin exponer.

Ciclo celular

Para evaluar el ciclo celular, se empleó la técnica de citometría de flujo, la cual consiste en determinar la fracción de células en las diferentes etapas del ciclo celular en el que se encuentran. Esta técnica mide la cantidad de ADN en cada célula de una población tratada con un fluorocromo que se une al ADN, y cada componente de esa población se hace pasar por un dispositivo óptico sensible a la fluorescencia emitida por cada célula. Después de exponer las células A549 (2×10^6 células por muestra) a las condiciones ya mencionadas arriba, éstas se cosecharon y se centrifugaron (1000 $\times g$ por 5 min a 4°C). El botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS frío. Las células se fijaron añadiendo 4 mL de etanol absoluto por 24 h. Posteriormente se añadió RNasa A (100 μL de un stock de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada muestra y se incubó a 37°C por 30 min. Las células se teñieron con yoduro de propidio (100 μL de un stock de 1 mg/mL) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACSort BECTON DICKINSON) usando el software CellQuest and ModFit LT. Los resultados se reportan como porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular.

Tinción de fibras de actina

En laminillas de 8 pozos, se sembraron 20,000 células por pozo y 24 h después se expusieron por 24 h a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} del norte y sur de la Ciudad de México. Después de 24 h de incubación se retiró el medio y se hicieron 3 lavados con TBS frío, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por una hora a 37°C . Las laminillas se lavaron con Tris Buffer Salino (TBS) 50 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 150

mM de NaCl, y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% por 5 min., a temperatura ambiente. Enseguida se lavaron las laminillas con TBS por 5 min., tres veces. Después se amortiguaron las células con borhidruro de sodio al 0.1% en TBS por 5 min., para minimizar la autofluorescencia. Las células se bloquearon con buffer de bloqueo [10% suero de caballo, 1% de BSA (albúmina de suero bovino) en TBS] por una hora a temperatura ambiente y en agitación, a continuación se lavaron una vez con TBS por 5 min., en agitación. El primer marcaje se hizo con faloidina (Sigma Num. Cat. P1951) acoplada a TRITC (Tetrametil Rodamina Isotiocianato) a una concentración de 500 ng/ml diluido en PBS, y se incubó a 4°C toda la noche.

Inmunofluorescencia de ROCK, MYPT1 y MLC

Para las inmunofluorescencias se hizo un doble marcaje para hacer la co-localización entre las fibras de tensión de actina en combinación con ROCK, MYPT1 y MLC en los que permanecerán constantes faloidina y DAPI para visualizar fibras de tensión de actina y núcleo, respectivamente.

Inmunofluorescencia de ROCK – Fibras de actina

Después de la tinción con faloidina (previamente descrito), el segundo marcaje se hizo con el anticuerpo para ROCK (ABCAM Num.Cat. ab-58305). Se utilizó una dilución 1:100 en un amortiguador de 1% BSA en TBS 1x. Las laminillas se incubaron a 4°C toda la noche. Se hicieron 3 lavados de 5 min., cada uno. La laminilla se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC) en un amortiguador de 1% BSA en TBS 1x a una dilución de 1:500, a temperatura ambiente protegido de la luz, por 45 min. Se hicieron 3 lavados con TBS de 5 min., cada uno protegido de la luz. Enseguida se procedió al montaje de la laminilla con ProLong Gold (Invitrogen No. de cat P36935) antigraze reagent con DAPI y se almacenó toda la noche en refrigeración.

Inmunofluorescencia MYPT1 fosforilada (Thr 853) – Fibras de actina

La activación de ROCK se determinó mediante la fosforilación de un sustrato específico, para ello se empleo el anticuerpo para MYPT1 que reconoce la forma fosforilada en treonina 853 (p-MYPT1 Thr 853) (Santa Cruz Num.Cat. sc-17432). El anticuerpo se diluyó en un amortiguador de BSA al 1% en TBS 1, y se uso una concentración de 1:100. La laminilla se incubo a 4°C toda la noche. Se hicieron 3 lavados con TBS de 5 min., cada uno. La laminilla se incubó con el anticuerpo secundario anti-goat-FITC a una concentración de 1:500 a temperatura ambiente protegido de la luz por 45 min. Se hicieron 3 lavados con TBS de 5 min., cada uno protegido de la luz. Enseguida se procedió al montaje de la laminilla con ProLong Gold (Invitrogen No. de cat P36935) antigra de reagent con DAPI y se almacenó toda la noche en refrigeración.

Inmunofluorescencia MLC fosforilada (Ser 19) – Fibras de actina

Para analizar la colocalización de MLC fosforilada (Ser 19) después de la tinción con faloidina, el segundo marcaje se hizo con el anticuerpo p-MYL9 (Ser 19) (Santa Cruz Num.Cat. sc-19849-R) que reconoce la forma fosforilada de la cadena ligera de miosina en serina 19. Se utilizó una dilución 1:100. Las laminillas se incubaron a 4°C toda la noche. Se hicieron 3 lavados de 5., min cada uno. La laminilla se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit-FITC 1:500 a temperatura ambiente protegido de la luz por 45 min. Se hicieron 3 lavados de 5 min., cada uno protegido de la luz. Enseguida se procedió al montaje de la laminilla con ProLong Gold (Invitrogen No. de cat P36935) antigra de reagent con DAPI y se almacenó toda la noche en refrigeración.

Inhibidor de ROCK

Para comprobar que las partículas de la Ciudad de México inducen la formación de fibras de tensión de actina por la vía de ROCK, se hicieron experimentos en paralelo utilizando el inhibidor específico de ROCK Y-27632 (Millipore Num.Cat 688000-1MG). El inhibidor se disolvió en medio de cultivo F12k y la células se pre-incubaron a una concentración de 10 μM por 30 minutos, posteriormente se lavaron las células con PBS y se expusieron a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZI y ZR

como se describió previamente, y se hicieron inmunofluorescencias con los anticuerpos ROCK, p-MYPT1 y p-MLC como previamente se describió, además de teñirlas con faloidina rodaminda.

Captura de imágenes

Por cada pozo se tomaron al menos tres fotos de campos distintos y representativos de la población celular. Las fotos de las proteínas evaluadas se tomaron en un microscopio de fluorescencia vertical Axioskop2 mot plus Carl Zeiss (Axio_cam HRm Carl Zeiss). El análisis densitométrico de las fotos se hizo con el software de análisis de imagen ImageJ v 1.48b. (Rasband 1997-2008). Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la viabilidad celular, evaluación del ciclo celular, apoptosis y las densitometrías de las fotos se realizaron con un análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguido de una prueba de Bonferroni. En todos los casos se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor al 5%.

Resultados

Citotoxicidad celular

Se hizo una curva de citotoxicidad con 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas colectadas al norte (zona industrial ZI) y sur (zona residencial ZR) de la Ciudad de México y se determinó la viabilidad celular, en células epiteliales de pulmón humano (A549) mediante cristal violeta. Las partículas de ambas zonas (ZI y ZR) con diferentes composiciones, no indujeron muerte celular en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 6a). Por otro lado, no se observaron cambios morfológicos en las células expuestas a las partículas de ambas zonas (Figura 6b). Debido a que ninguna de las dosis utilizadas indujo muerte celular, los siguientes experimentos se realizaron utilizando la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

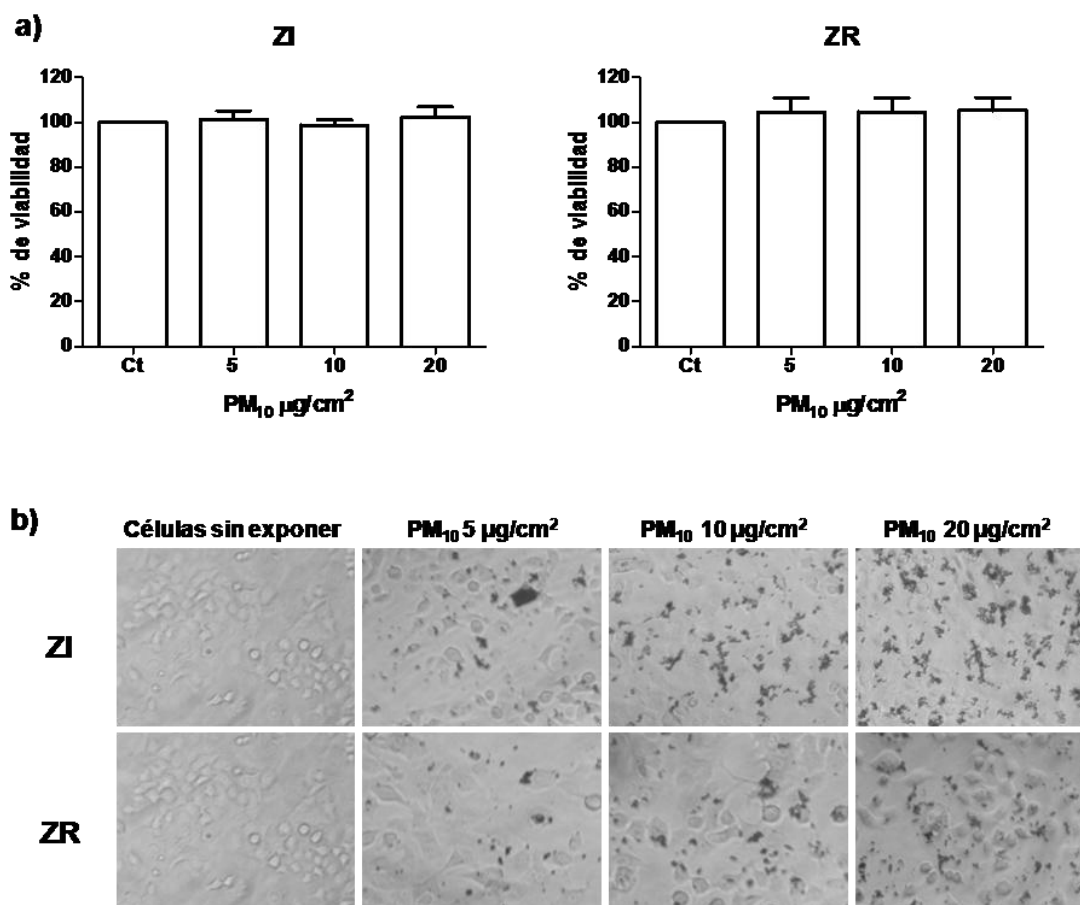


Figura 6. Efecto citotóxico de las PM_{10} en células A549. Las células A549 fueron expuestas a 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una zona industrial (ZI) y una zona residencial (ZR) por 24h., y se evaluó la viabilidad celular mediante el método colorimétrico del cristal violeta. a) Las PM_{10} de ambas zonas a las diferentes concentraciones utilizadas no son citotóxicas. b), Micrografía de luz de células A549 expuestas a diferentes concentraciones de PM_{10} de la ZI y la ZR con un aumento de 10x.

Las PM₁₀ de la Ciudad de México inducen la formación de Fibras de tensión de actina

Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que las PM₁₀ colectadas en la época de secas entre el 2004-2005 de la Ciudad de México inducen la formación de fibras de tensión de actina (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2014), sin embargo, se desconoce la vía mediante la cual las PM₁₀ inducen la formación de las fibras de actina. En este estudio se observó que las PMs de la ZI y ZR de la Ciudad de México colectadas en el 2007 son capaces de inducir la formación de las fibras de tensión de actina con respecto al control (ZI 21.1±1.6 vs Ct 15.5±0.9, p<0.0001) y (ZR 23.3±1.4 vs Ct 15.5±0.9, p<0.0001), y además que las partículas de la ZR tienen un mayor efecto en la inducción de la formación de las fibras de tensión de actina que las PM₁₀ de la ZI (ZR 23.3±1.4 vs ZI 21.1±1.5, p<0.001) (Figura 7a y 7b).

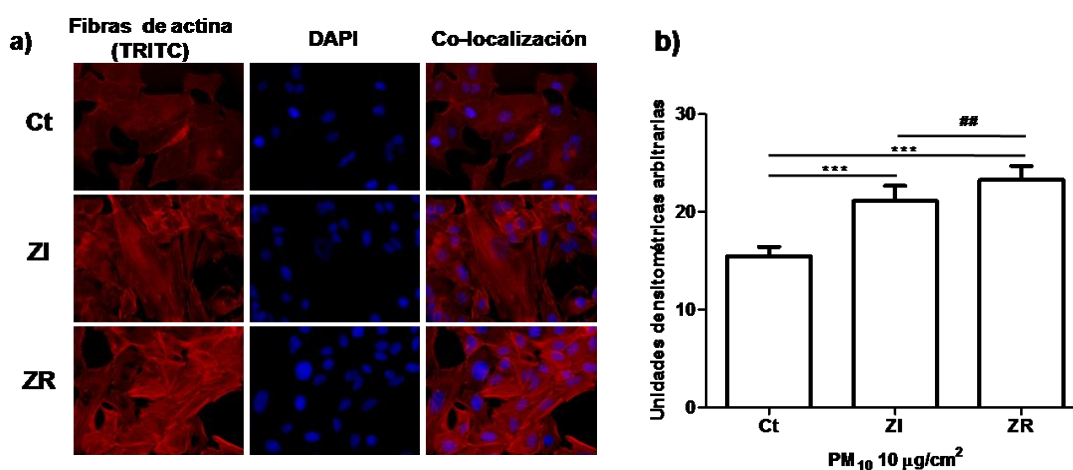


Figura 7. Inducción de fibras de tensión de actina en células A549 expuestas a PM₁₀. Las células A549 se expusieron a 10 µg/cm² de PM₁₀ de la ZI y ZR por 24h. a) Las fibras de actina fueron marcadas con faloidina rodaminada (TRITC) y el núcleo con DAPI. Las PM₁₀ de la ZI y la ZR inducen la formación de fibras de tensión de actina. b) El análisis cuantitativo de las fibras se hizo mediante densitometría y se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los resultados se presentan como la media ± DS de tres experimentos independientes. ***p<0.01 ZI vs Ct, ***p<0.0001 ZR vs Ct y ##p<0.001 ZR vs ZI. Las imágenes se adquirieron por microscopía de fluorescencia tomadas en un microscopio de fluorescencia vertical Carl Zeiss, con un aumento de 40x, y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Expresión de ROCK en células expuestas a PM₁₀ de dos zonas de la Ciudad de México

La activación de ROCK vía RhoA participa en la remodelación del citoesqueleto de actina. Para investigar si las PM₁₀ inducen la formación de fibras de tensión de actina por la vía ROCK, las células A549 fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ de la ZI y ZR por 24h. Mediante inmunofluorescencia se evaluó la localización celular de ROCK. Los resultados muestran un incremento en la expresión de ROCK en las células expuestas a las PM de ambas zonas comparadas con células sin exponer (Figura 8a) y el análisis densitométrico de la expresión de ROCK muestra diferencias significativas entre las células expuestas las PM₁₀ de la ZI y la ZR comparadas con el control (ZI 10.7±1.8 vs Ct 6.6±1.0, p<0.0001) y (ZR 11.2±2.0 vs Ct 6.6±1.0, p<0.0001) (Figura 8b).

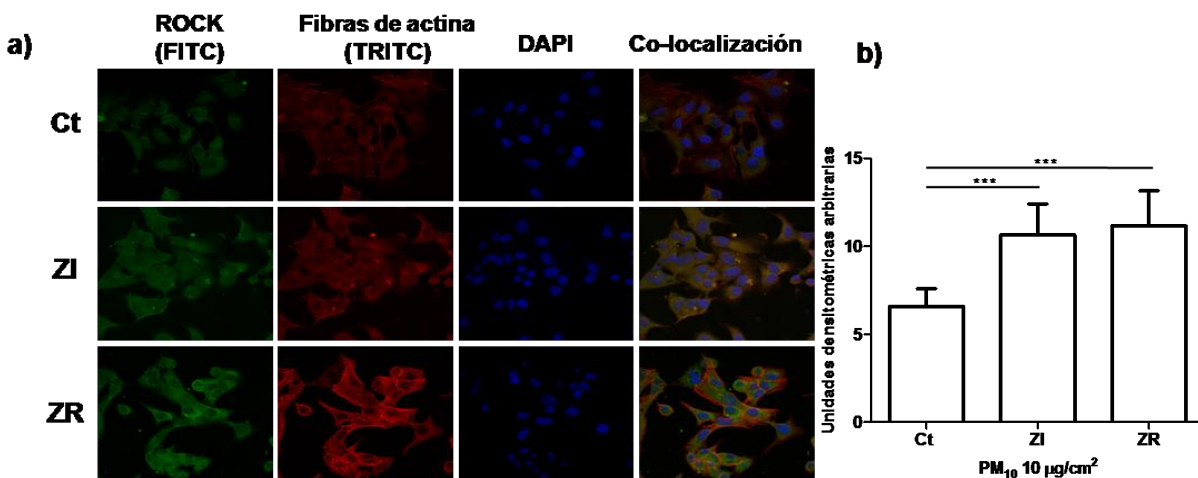


Figura 8. Inducción de la expresión de ROCK en células A549 expuestas a PM₁₀. Células A549 se expusieron a 10 µg/cm² de PM₁₀ de la ZI y ZR por 24h. a) ROCK fue marcado con FITC, las fibras de actina fueron visualizadas con faloidina marcada con Rodamina (TRITC), y el núcleo fue marcado con DAPI. Las PM₁₀ de la ZI y la ZR indujeron la expresión de la proteína ROCK y ésta co-localiza con las fibras de actina. b) El análisis cuantitativo de la expresión de ROCK se hizo mediante densitometría y es expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los resultados son presentados como la media ± DS de tres experimentos independientes ***p<0.0001 ZI vs Ct y ***p<0.0001 ZR vs Ct. Las imágenes se adquirieron por microscopía de fluorescencia tomadas en un microscopio de fluorescencia vertical Carl Zeiss, con un aumento de 40x, y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Determinación de la actividad de ROCK a través de la fosforilación de MYPT1 en treonina 853 por PM₁₀ de la Ciudad de México

Con los resultados anteriores se determinó que las PM₁₀ inducen un incremento en la expresión de ROCK. Para determinar si ROCK esta activo, se evaluó la fosforilación de MYPT1 en treonina 853, este evento es un indicador de la actividad de ROCK (Matsumura and Hartshorne 2008). Las PM₁₀ de la ZI y ZR indujeron la fosforilación de MYPT1 (Thr 853) (Figura 9a). Lo que sugiere que ROCK esta activo y puede favorecer la formación de fibras de actina. El análisis densitométrico muestra que el incremento de ROCK inducido por las PM₁₀ de ambas zonas es significativo con respecto a las células sin exponer (ZI 14.6±2.5 vs Ct 11.7±0.7, $p < 0.01$ y ZR 18.2±2.3 vs Ct 11.7±0.7, $p < 0.0001$) (Figura 9a y 9b). Las partículas de la ZR indujeron un mayor incremento en la fosforilación de MYPT con respecto de la ZI (ZR 18.2±2.3 vs ZI 14.6±2.5, $p < 0.001$) (Figura 9b).

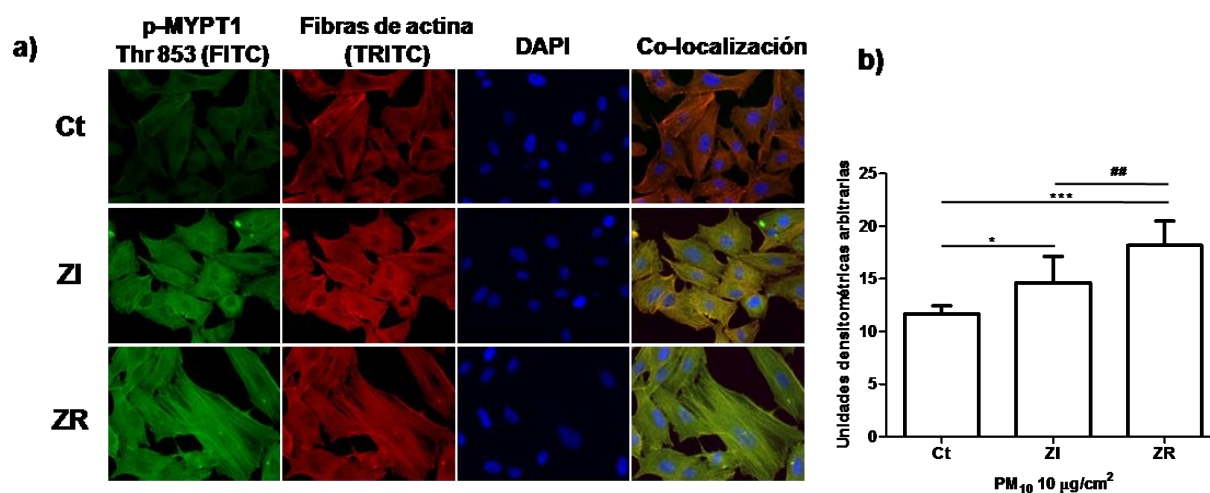


Figura 9. Fosforilación de MYPT1 en células A549 expuestas a PM₁₀. Las células A549 se expusieron a 10 µg/cm² de PM₁₀ de la ZI y ZR por 24h. a) La proteína MYTP1 fue marcada con FITC y las fibras de actina fueron visualizadas con faloidina marcada con Rodamina (TRITC), y el núcleo fue marcado con DAPI. Las PM₁₀ de la ZI y la ZR indujeron la fosforilación de MYPT1 y este evento se relaciona con la activación de ROCK. b) El análisis cuantitativo de MYPT1 se hizo mediante densitometría y es expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los resultados son presentados como la media ± DS de tres experimentos independientes * $p < 0.01$ ZI vs Ct, *** $p < 0.0001$ ZR vs Ct y ## $p < 0.001$ ZR vs ZI. Las imágenes se adquirieron por microscopía de fluorescencia tomadas en un microscopio de fluorescencia vertical Carl Zeiss, con un aumento de 40x, y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Las PM₁₀ de la Ciudad de México inducen fosforilación de la Cadena Ligera de Miosina (MLC)

La cadena ligera de miosina es una proteína importante en la formación de las fibras de tensión de actina, ya que regula la fosforilación de la miosina II ATPasa para llevar a cabo la tensión celular y MLC es regulada directamente por ROCK (Birukova, Smurova et al. 2004; Schofield and Bernard 2013). Las PM₁₀ de la ZI y de la ZR indujeron la fosforilación de MLC de manera significativa comparada con células sin exponer (ZI 10.1±1.7 vs Ct 7.9±1.0, p<0.01 y ZR 12.1±1.9 vs Ct 7.9±1.0, p<0.0001) (Figura 10a). Además las PM₁₀ de la ZR presentan diferencias significativa en la fosforilación de MLC con respecto de la ZI (ZR 12.1±1.9 vs ZI 10.1±1.7, p<0.01) (Figura 10b).

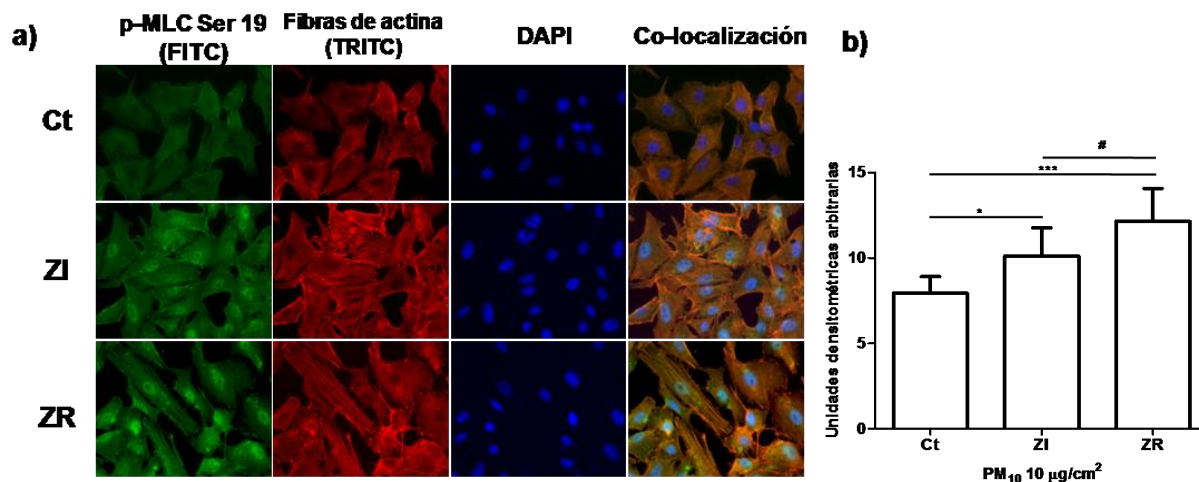


Figura 10. Fosforilación de MLC en células A549 expuestas a PM₁₀. Las células A549 fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ de la ZI y ZR por 24h, a) la proteína MLC (Ser19) se marcó con FITC y para observar las fibras de actina se usó faloidina (TRITC). La PM₁₀ de ambas zonas inducen la fosforilación de MLC de manera significativa por la vía de ROCK b) El análisis cuantitativo de MLC se hizo mediante densitometría y es expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los resultados son presentados como la media ± DS de tres experimentos independientes *p<0.01 ZI vs Ct, ***p<0.0001 ZR vs Ct y #p<0.001 ZR vs ZI. Las imágenes se adquirieron por microscopía de fluorescencia tomadas en un microscopio de fluorescencia vertical Carl Zeiss, con un aumento de 40x, y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Las PM₁₀ de ambas zonas no inducen fibras de tensión de actina cuando se inhibe la activación de ROCK

Con estos resultados se observa que las PM₁₀ inducen a ROCK1 y que ésta proteína esta activa, para llevar a cabo la formación de fibras de tensión de actina, ya que fosforila a MYPT1. Aunado a esto, las PM₁₀ también incrementa la fosforilación de MLC, lo que sugiere fuertemente la participación de ROCK en la formación de fibras de actina.

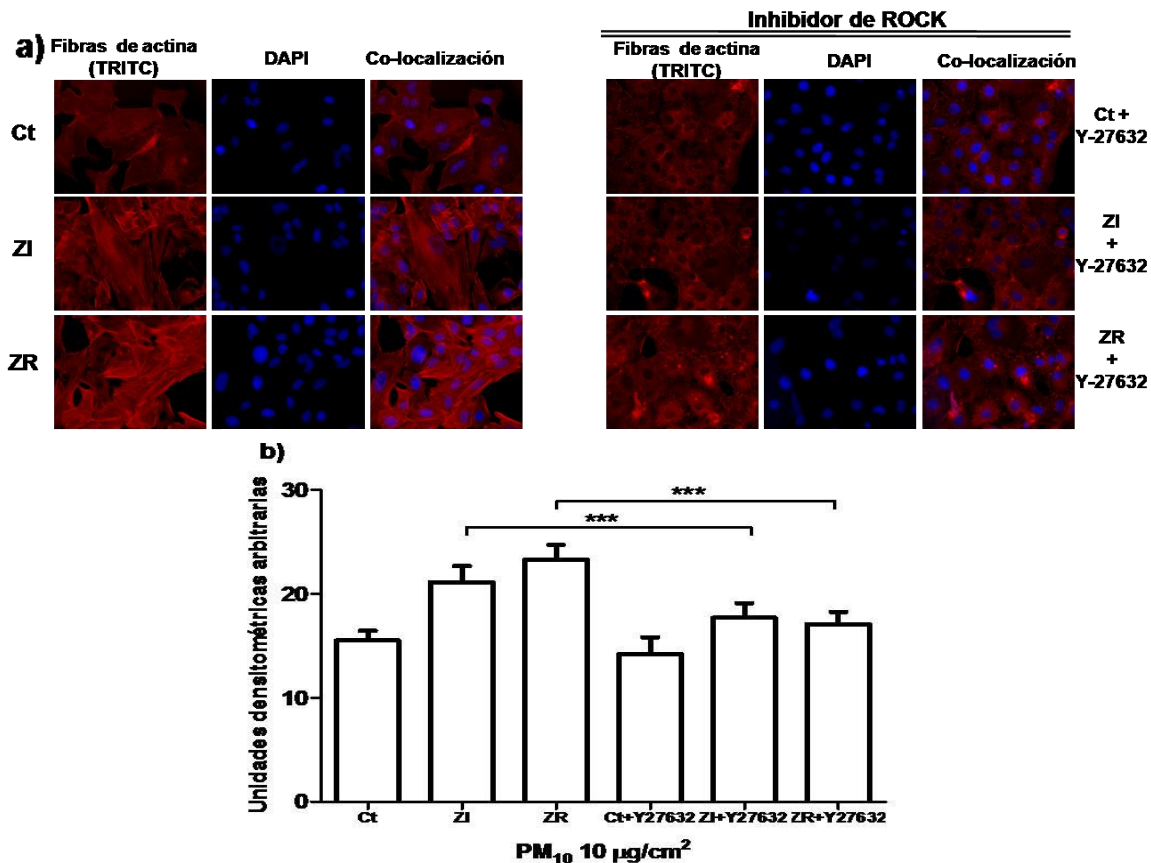


Figura 11. Efecto de Y-27632 sobre células expuestas a PM₁₀. Las células A549 fueron preincubadas con el inhibidor Y-27632 (10 µM) 30 min., enseguida se expusieron a PM₁₀ de la ZI y ZR (10 µg/cm²) por 24h. a) para la visualización de las fibras de actina se utilizó faloidina rodaminada (TRITC) y se hizo mediante un ensayo de fluorescencia. Las PM₁₀ inducen la formación de fibras de tensión de actina a través de ROCK, ya que Y-27632 (Inhibidor específico de ROCK) previno la formación de las fibras de actina. b) El análisis cuantitativo de las fibras se hizo mediante densitometría y es expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los resultados son presentados como la media ± DS de tres experimentos independientes ***p<0.0001 ZI vs ZI+Y27632 y ***p<0.0001 ZR vs ZR+Y27632. Las imágenes se adquirieron por microscopía de fluorescencia tomadas en un microscopio de fluorescencia vertical Carl Zeiss, con un aumento de 40x, y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Para demostrar que las PM_{10} de ambas zonas inducen la formación de fibras vía la activación de ROCK1, se utilizó el inhibidor Y-27632 específico de ROCK. Las células A549 se pre-incubaron con el inhibidor de Y-27632 (10 μ M) por 30 min., posteriormente fueron expuestas a 10 μ g/cm² de PM_{10} de la ZI y ZR por 24h. Se observó una disminución significativa en la formación de fibras de tensión de actina en las células expuestas a PM_{10} de la ZI y ZR preincubadas con Y-27632 comparadas con las células sin preincubar (ZI 21.1 \pm 1.6 vs ZI+Y27632 17.7 \pm 1.4, p <0.0001) y (ZR 23.3 \pm 1.4 vs ZR+Y27632 17.1 \pm 1.2, p <0.0001) (Figura 7a, 7b, Figura 11a y 11b), este evento deja claro que ROCK participa en la formación de fibras de tensión de actina inducidas por las PM_{10} de la ZI y ZR (Figura 11a y 11b).

Ciclo celular y apoptosis

La remodelación de actina, en condiciones normales participa en varios procesos celulares, como división del ciclo celular y apoptosis. Para determinar si las PM_{10} inducen cambios en el ciclo celular o apoptosis, se expusieron células A549 a 10 μ g/cm² de PM_{10} de una ZI y una ZR por 24h. Se observó que 10 μ g/cm² de PM_{10} de ambas zonas no alteran las fases del ciclo celular, ni inducen apoptosis (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución del ciclo celular y apoptosis (%) de células expuestas a PM_{10} .

	Ciclo celular (%)			Apoptosis (%)
	G0-G1	S	G2-M	
Control	71.9 \pm 5.0	17.9 \pm 3.7	10.2 \pm 1.6	1.3 \pm 0.5
ZI	72.0 \pm 5.1	17.6 \pm 2.7	10.4 \pm 2.9	4.4 \pm 2.2
ZR	71.9 \pm 4.2	17.9 \pm 2.9	10.0 \pm 1.8	5.0 \pm 2.8
Media \pm SD				

Discusión

En este estudio reportamos que la exposición de células A549 a 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZI y ZR por 24h, no alteran la viabilidad celular. También se demostró que 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una zona industrial y una zona residencial son suficientes para inducir la formación de fibras de tensión de actina vía la activación de la proteína ROCK y la fosforilación de sus proteínas blanco MYPT1 y MLC, además se demostró que las PM_{10} de ambas zonas inducen la formación de fibras mediante la activación de ROCK, ya que en las células preincubadas con el inhibidor específico de ROCK (Y-27632) disminuyó notablemente la formación de fibras de tensión. También observamos que las PMs no inducen cambios en las diferentes fases del ciclo celular ni apoptosis. Por otro lado, se determinó que la composición de las partículas juega un papel muy importante en la potencia de los efectos, ya que las PM_{10} de la ZR indujeron mayores efectos que las PM_{10} de la ZI.

Viabilidad celular

Nuestro grupo de trabajo y otros autores han reportado que 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} es una dosis subletal, ya que induce un bajo porcentaje de muerte celular (Tabla 1) En este trabajo se evaluó la viabilidad celular en células A549 expuestas a 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una zona residencial y una zona industrial, y no se observó muerte celular con ninguna de las concentraciones utilizadas. No obstante, se sabe que las PM_{10} inducen citotoxicidad y muerte celular; sin embargo, éstos resultados se han reportado con dosis mayores a las utilizadas en éste trabajo. Por ejemplo, Alfaro-Moreno y colaboradores (2002) utilizaron concentraciones de 20, 40 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} y reportaron muerte celular por apoptosis entre un 15 y 50% en diferentes líneas celulares, además este grupo sugirió que las células A549 presentan cierta resistencia a los efectos citotóxicos de las partículas (Alfaro-Moreno, Martínez et al. 2002), en este sentido, otros autores han coincidido en que las células A549 presentan cierta resistencia a los efectos citotóxicos de las PM_{10} (Alfaro-Moreno, Martínez et al. 2002; Osornio-Vargas, Bonner et al. 2003; Calderón-Segura, Gómez-Arroyo et al. 2004). Por otro lado, el grupo de trabajo de

Gualtieri (2010) no encontró cambios significativos en la viabilidad celular al exponer células A549 a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24h (Gualtieri, Ovreivik et al. 2010), estos resultados concuerdan con el 5% de apoptosis (no significativo) aquí reportado y es congruente con reportes en los que se reporta que la línea celular A549 presenta cierta resistencia a los efectos citotóxicos de las partículas. Si bien, en este trabajo no se observó muerte celular o citotoxicidad inducido por las partículas, se sabe que los compuestos orgánicos de las PM como los HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) juegan un papel importante en la muerte celular inducida por las PM. En este sentido, Calderón-Segura et al., 2004 reportaron que extractos orgánicos de las PM inducen muerte celular, utilizando concentraciones entre 50 y 300 μg de extractos de PM_{10} (Calderón-Segura, Gómez-Arroyo et al. 2004).

En este estudio se hizo una curva de dosis respuesta a la citotoxicidad de las partículas y observamos que las concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de la ZI y ZR, no afectan la viabilidad celular según lo determinado por la prueba del cristal violeta. Estudios previos han demostrado que las concentraciones por debajo de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} no afectan importantemente la viabilidad celular (Bonner, Rice et al. 1998; Alfaro-Moreno, Martínez et al. 2002; Chirino, Sánchez-Pérez et al. 2010). Sin embargo, se sabe que 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} son suficientes para inducir procesos proinflamatorios como la liberación de IL-6, IL-8 (Alfaro-Moreno, Torres et al. 2009), estrés oxidativo (Chirino, Sánchez-Pérez et al. 2010), daño a la doble cadena de ADN (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2009) y recientemente la inducción de fibras de tensión de actina (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2014). Por lo anterior, en este trabajo se utilizaron 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de dos zonas de la Ciudad de México para conocer las vías asociadas a la formación de las fibras de tensión de actina, se evaluó la vía de ROCK1.

Inducción de fibras de tensión de actina

En la década de los 70s y 80s surgieron estudios epidemiológicos en los que se estudiaba el efecto que la contaminación atmosférica tenía en la salud de los seres humanos. En el valle de Utha, en E.U., el 90% de los habitantes de esta

región pertenecen a la Iglesia de Jesucristo de los Santos de los Últimos días (mormones), quienes tienen fuertes enseñanzas en contra de los fumadores, sus costumbres los hace una buena población para observar los efectos que tienen los contaminantes del aire y debido a estas características se llevaron a cabo estudios epidemiológicos en la región y encontraron que cuando se incrementaba la concentración de contaminantes atmosféricos, decaían las funciones pulmonares, incrementaban las incidencias de los síntomas respiratorios, incrementaban las ausencias a las escuelas, incrementaban las admisiones a los hospitales por problemas respiratorios y además incrementaba la mortalidad, especialmente debido a fallas respiratorias y cardiovasculares atribuidos a las PM (Pope 1996).

En el 2002, Pope y colaboradores realizaron un estudio epidemiológico con una cohorte de 16 años y un total de 1.2 millones de adultos participaron en este estudio, demostrando que las PM pueden ser un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón, incluso más que el humo de tabaco, ya que personas que nunca habían fumado murieron a causa de cáncer de pulmón (Pope, Burnett et al. 2002). Posterior a esta publicación, surgieron varios artículos epidemiológicos en los que se demuestra que las PM pueden ser un factor de riesgo, no solo en el desarrollo de cáncer de pulmón, sino también de cáncer de mama (Huo, Zhang et al. 2013) y cáncer gástrico (Chiu, Tsai et al. 2011). Si bien, estas publicaciones fueron muy importantes y formaron parte en las discusiones para la regulación de las emisiones contaminantes a la atmósfera en todo el mundo (Pope, Burnett et al. 2002), se sabe muy poco acerca de los mecanismos biológico-celulares por los que las PM favorecen el desarrollo de una neoplasia.

Nuestro grupo de trabajo, recientemente reportó que $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} inducen la formación de fibras de tensión de actina (Sánchez-Pérez, Chirino et al. 2014), por lo que se decidió estudiar a ROCK como un participante importante en la formación de las fibras de actina inducidas por las PM_{10} . La vía de ROCK en condiciones fisiológicas normales está implicada en los mecanismos de remodelación del citoesqueleto de actina. Sin embargo, ROCK es una proteína que ha ganado gran atención en los últimos años, debido a que se ha visto que se

encuentra sobre-expresada en diferentes neoplasias, y por tal razón ha sido considerada como un blanco en terapia anti-cáncer (Etienne-Manneville and Hall 2002; Chi, Wang et al. 2013).

Las PM de ambas zonas indujeron la expresión de ROCK. Numerosos estudios señalan que ROCK es una proteína clave en la regulación de los dinamismos del citoesqueleto de actina, ya que modula varias de las funciones celulares, como la contracción celular, adhesión, unión de puntos focales, la migración y proliferación (Tapon and Hall 1997; Lessey, Guilluy et al. 2012; Chi, Wang et al. 2013). En este trabajo se observó que las PM₁₀ de ambas zonas son capaces de inducir de manera significativa la expresión de ROCK y que las partículas de la ZR tienen un mayor potencial para activar a esta proteína. En este sentido, se sabe que las alteraciones en la proteína ROCK puede conducir a la transformación maligna de las células, evento que esta asociado a procesos que pueden favorecer el desarrollo de cáncer, como son la tumorigénesis y procesos invasivos (Chen, Guerriero et al. 2008; Chi, Wang et al. 2013; Schofield and Bernard 2013). ROCK activa a MYPT y en este trabajo se determinó que las PM₁₀ de ambas zonas son capaces de inducir de forma significativa la fosforilación de MYPT1 en Thr 853. La fosforilación de esta proteína está relacionada con el crecimiento celular y procesos invasivos. Recientemente, se ha reportado en células de pulmón humanas derivadas de carcinoma (NCI-H446) que el crecimiento celular e invasividad disminuyen cuando disminuye la fosforilación de MYPT1 en Thr 696 (Yang, Di et al. 2012). La fosforilación de MYPT1 en Thr 853 y Thr 696 son marcadores de la actividad de ROCK (Matsumura and Hartshorne 2008; Yang, Di et al. 2012). Las alteraciones en la vía de Rho/ROCK se sabe que pueden causar aberraciones en las proteínas de esta vía, y una de ellas es la hiperactivación de ROCK que está asociada con agresividad tumoral, y puede favorecer invasión y metástasis (Takamura, Sakamoto et al. 2001; Schofield and Bernard 2013). Aquí se muestra evidencia del potencial que tienen las PM₁₀ para inducir la significativa fosforilación de MYPT1 en Thr 853 y con ello la activación de ROCK, por lo que, las partículas de ZI y ZR puedan estar involucradas en la

inducción de procesos tumorales e invasivos por medio de la sobre expresión de ROCK y activación a través de la fosforilación de MYPT1 (Figura 8a, 8b, 9a y 9b).

Río abajo en la señalización de la vía de ROCK, se demostró que las partículas de la ZI y ZR son capaces de inducir la fosforilación de otra de las proteínas involucradas en la formación de las fibras de tensión de actina es MLC (cadena ligera de miosina) (Figura 10a y b). La fosforilación de la MLC, promueve la actividad de la miosina II ATPasa que conduce al incremento de las contracciones de la célula. Ante estos cambios, el citoesqueleto actúa produciendo una fuerza contráctil que compite con las adhesiones célula-célula lo que representa un ensanchamiento del espacio intercelular y este proceso está involucrado con la invasividad (Birukova, Smurova et al. 2004; Yuan, Shen et al. 2012). Por ejemplo, MLC está involucrada en la disfunción de las barreras de células endoteliales de pulmón humano (Birukova, Smurova et al. 2004). Las alteraciones en las barreras endoteliales pueden estar ligadas a procesos invasivos ya que pueden ser desencadenados por alteraciones en ROCK, a través de la regulación de las funciones de MLC a través de la fosforilación de MYPT1 en Thr 853 y de esta manera inhibir su acción de fosfatasa hacia MLC. Además, ROCK fosforila directamente a MLC en Ser 19 (Schofield and Bernard 2013). En este sentido, las PM₁₀ de ambas zonas son capaces de inducir la expresión de ROCK y su vía de señalización que está asociada a procesos de tumorigénesis y metástasis.

Actualmente existen fármacos que son capaces de disminuir la expresión de ROCK, como Y-27632 (Narumiya, Tanji et al. 2009). Debido a que ROCK juega un papel muy importante en la biología de la célula, y que además por su conducto puede llegar a transformación maligna de las células, ROCK se ha propuesto como una proteína blanco en el desarrollo de terapias anticáncer. Nuestros resultados mostraron que las PM₁₀ inducen la formación de las fibras de tensión de actina a través de la vía de ROCK, ya que al preincubar las células con el inhibidor de ROCK Y-27632, y posteriormente exponerlas a PM₁₀, se inhibe la formación de fibras de actina inducidos por las partículas, (Figura 11a y 11b). La

inhibición de la sobre-expresión de ROCK, así como su activación a consecuencia de fármacos ha disminuido los procesos de crecimiento, invasividad y metástasis en los cánceres más agresivos (Croft, Sahai et al. 2004), debido a esto se considera a ROCK como un buen blanco en el desarrollo de terapias anticáncer.

Por otro lado, estudios realizados en diferentes partes del mundo han demostrado que la composición de las PM está ligada a las zonas de colecta (Englert 2004). La diferencia en la composición de las partículas se asocia al tipo de actividades antropogénicas que se llevan a cabo en la zona, así como a la ubicación geográfica de donde provengan (Englert 2004). En este trabajo encontramos diferencias en la potencia de los efectos que las PM₁₀ de las dos zonas tienen, ya que las partículas de la ZR tuvieron mayores efectos en la inducción de fibras de tensión de actina, activación de ROCK vía la fosforilación de MYPT1 en Thr 853, así como la fosforilación de MLC que las PM₁₀ de la ZI, por lo que la diferencia en tales efectos podemos atribuirselos a la composición de las PM₁₀.

El 2002, los efectos que tenían las partículas colectadas al sur (ZR) de la ciudad, se consideraba que no eran tan potentes en comparación a los de otras zonas, como lo es la zona norte, y se pensaba que el componente que inducía las respuestas inflamatorias eran las endotoxinas contenidas en las PM (Alfaro-Moreno, Martínez et al. 2002; Osornio-Vargas, Bonner et al. 2003), ya que éstas cuentan con una mayor cantidad de componentes biológicos como las endotoxinas, y compuestos orgánicos solubles (Bonner, Rice et al. 1998; Schwarze, Ovrevik et al. 2006), en comparación con las partículas de la ZI. Si bien, en las partículas de ambas zonas se pueden encontrar casi los mismos componentes, en las PM₁₀ de la ZI se pueden encontrar altas concentraciones de metales de transición y sulfatos (Bonner, Rice et al. 1998).

En otro estudio realizado con partículas colectadas en zonas aledañas a las evaluadas en este estudio, los autores reportan que las PM₁₀ inducen la formación de micronúcleos y en el caso de las PM colectadas al sur de la ciudad se le atribuyó principalmente a los HPAs, derivados de la combustión de gasolinas y

diesel, en el caso de la zona industrial los efectos se le atribuyeron a la fracción de metales solubles, principalmente al cadmio (Roubicek, Gutierrez-Castillo et al. 2007). En este sentido, se sabe que las partículas colectadas en zonas industriales, la composición es principalmente de metales (Zaitseva, Mai et al. 2013). Por otra parte, en términos de densidad de tránsito, varios estudios han reportado efectos adversos a la salud asociados con la proximidad de las residencias a los caminos donde hay concentración de tránsito vehicular (Boothe and Shendell 2008).

Ciclo celular y apoptosis

Importantemente, en este trabajo no se encontraron alteraciones en las fases del ciclo celular en células expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una ZI y de una ZR, ya que no se observaron cambios en las diferentes fases del ciclo celular en células expuestas a las PM comparadas con las células sin exponer. Existen trabajos en los que se ha reportado que las partículas pueden retrasar la progresión del ciclo celular, sin embargo, las concentraciones de PMs que utilizan son mayores que las utilizadas en este trabajo, las concentraciones van de 50 hasta $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ en células de macrófagos de ratón RAW264.7 (Happo, Markkanen et al. 2013). Otros trabajos, han reportado que extractos orgánicos de las PM son capaces de inducir cambios en el ciclo celular; así como de inducir arresto en G1, o muerte celular por necrosis y apoptosis (Calderón-Segura, Gómez-Arroyo et al. 2004). En este estudio, nuestros resultados mostraron que las partículas de las dos zonas inducen un bajo porcentaje de apoptosis 4.4% (ZI) y 5.0% (ZR) (Tabla 1), que no resulto ser significativo y no inducen cambios en las diferentes fases del ciclo celular con respecto al control. Sin embargo, se sabe que la exposición prolongada a las PM puede llegar al desarrollo de neoplasias (Pope, Burnett et al. 2002), por lo que a corto plazo no observamos ningún cambio en el las fases del ciclo celular.

En este trabajo se observó que las PM_{10} de la zona Industrial (ZI) y zona residencial (ZR) inducen la formación de fibras de tensión de actina (Figura 7a y b), y que la formación de las fibras se lleva a cabo mediante la vía de ROCK, que

fosforila tanto de MYPT1 como a MLC, evento que participa en la formación de las fibras de tensión de actina. Las fibras de tensión de actina están involucradas en muchos procesos celulares como la movilidad, motilidad y división celular (Tapon and Hall 1997; Lessey, Guilluy et al. 2012), y las alteraciones en el citoesqueleto de actina pueden conducir al desarrollo de enfermedades y neoplasias por conducto de la vía de ROCK (Sahai and Marshall 2002; Schofield and Bernard 2013).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las PM inducen la formación de fibras de tensión de actina, y la formación de las fibras de actina está asociada a tumorigénesis e invasividad, por lo que las PM₁₀ podrían estar favoreciendo el desarrollo de cáncer de pulmón y otros a través de la vía de ROCK.

Conclusiones

En este estudio encontramos que las partículas inducen la remodelación del citoesqueleto de actina mediante la activación de ROCK-MLC, lo que lleva a la formación de fibras de actina, y que las partículas de la zona residencial tienen un mayor potencial en la activación de esta vía, por lo que se puede concluir que la composición de las PM juega un papel importante en los efectos que inducen las partículas. Debido a que Las PM₁₀ de la zona industrial y zona residencial inducen ROCK y no alteran la viabilidad celular, ni alteran las fases del ciclo celular, esta vía puede favorecer el desarrollo de tumores y posteriormente metástasis. Estas conclusiones son esquematizadas en la figura 12.

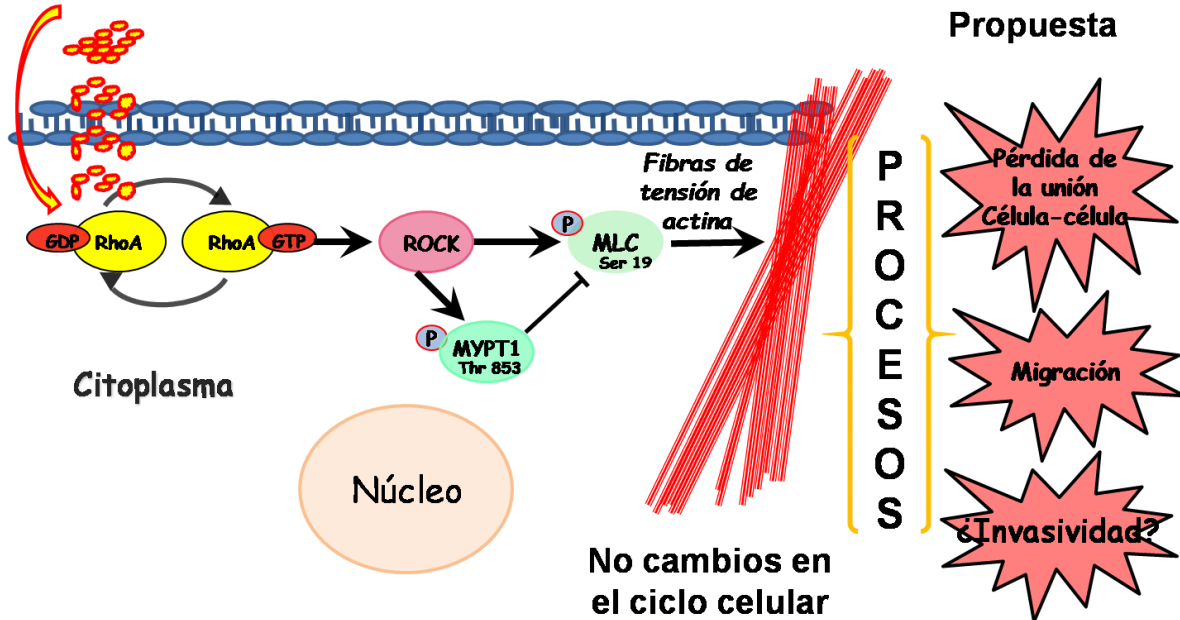


Figura 12. Conclusiones. Las partículas inducen la formación de fibras de tensión de actina por la activación de la vía de Rho, a través de la fosforilación de ROCK y MLC. Estos eventos podrían estar implicados en proliferación y transformación celular asociada al desarrollo de tumores y metástasis.

Bibliografía

- Alberts Bruce , D. B., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and James D. Watson (2002). *Biología Molecular de la célula*. Barcelona, Ediciones Omega, S.A.
- Alfaro-Moreno, E., L. Martínez, et al. (2002). "Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City." *Environ Health Perspect* **110**(7): 715-20.
- Alfaro-Moreno, E., L. Martínez, et al. (2002). "Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City." *Environ Health Perspect* **110**(7): 715-20.
- Alfaro-Moreno, E., V. Torres, et al. (2009). "Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling." *Environ Res* **109**(5): 528-35.
- Amano, M., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *J Biol Chem* **271**(34): 20246-9.
- Becker, S., J. M. Soukup, et al. (1996). "Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production." *Toxicol Appl Pharmacol* **141**(2): 637-48.
- Birukova, A. A., K. Smurova, et al. (2004). "Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction." *Microvasc Res* **67**(1): 64-77.
- Bonner, J. C., A. B. Rice, et al. (1998). "Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City." *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**(4): 672-80.
- Boothe, V. L. and D. G. Shendell (2008). "Potential health effects associated with residential proximity to freeways and primary roads: review of scientific literature, 1999-2006." *J Environ Health* **70**(8): 33-41, 55-6.
- Brunekreef, B. and B. Forsberg (2005). "Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health." *Eur Respir J* **26**(2): 309-18.
- Calderón-Segura, M. E., S. Gómez-Arroyo, et al. (2004). "The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytotoxic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City." *Mutat Res* **558**(1-2): 7-17.
- CENAPRED. (2008). "Guía Práctica Sobre Riesgos Químicos." *Sistema Nacional de Protección Civil*, from http://www.proteccioncivil.gob.mx/work/models/ProteccionCivil/Resource/373/1/images/guiap_rq.pdf.
- Coleman, M. L., R. M. Densham, et al. (2006). "Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton." *Oncogene* **25**(19): 2708-16.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, et al. (2001). "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I." *Nat Cell Biol* **3**(4): 339-45.
- Croft, D. R., E. Sahai, et al. (2004). "Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis." *Cancer Res* **64**(24): 8994-9001.

- Chen, J., E. Guerriero, et al. (2008). "Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(1): 175-83.
- Chi, X., S. Wang, et al. (2013). "Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation." *Int J Mol Sci* **14**(4): 7089-108.
- Chirino, Y. I., Y. Sánchez-Pérez, et al. (2010). "PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death." *Toxicol Lett* **193**(3): 209-16.
- Chiu, H. F., S. S. Tsai, et al. (2011). "Traffic air pollution and risk of death from gastric cancer in Taiwan: petrol station density as an indicator of air pollutant exposure." *J Toxicol Environ Health A* **74**(18): 1215-24.
- Denicourt, C. and S. F. Dowdy (2004). "Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors." *Genes Dev* **18**(8): 851-5.
- Departamento del Distrito Federal, G. d. E. d. M., Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaria de Salud (1996). Programa para mejorar la calidad del aire en el valle de México 1995-2000. G. d. e. d. M. D.F.: DDF, SEMARNAP. México.
- Enciso, L. A. (2013). Al año, 15 mil decesos prematuros por la deficiente calidad del aire. *La Jornada*. Ciudad de México: 1.
- Englert, N. (2004). "Fine particles and human health--a review of epidemiological studies." *Toxicol Lett* **149**(1-3): 235-42.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* **420**(6916): 629-35.
- Foster, K. A., C. G. Oster, et al. (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism." *Exp Cell Res* **243**(2): 359-66.
- Frampton, M. W. (2001). "Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans." *Environ Health Perspect* **109 Suppl 4**: 529-32.
- Gualtieri, M., J. Ovrevik, et al. (2010). "Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells." *Toxicol In Vitro* **24**(1): 29-39.
- Happo, M., A. Markkanen, et al. (2013). "Seasonal variation in the toxicological properties of size-segregated indoor and outdoor air particulate matter." *Toxicol In Vitro* **27**(5): 1550-61.
- Heng, Y. W. and C. G. Koh (2010). "Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(10): 1622-33.
- Huo, Q., N. Zhang, et al. (2013). "Effects of ambient particulate matter on human breast cancer: is xenogenesis responsible?" *PLoS One* **8**(10): e76609.
- INAFED. (2010). "Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México." from http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_df.
- INECC. (2013). "Calidad del aire en México." from <http://www.inecc.gob.mx/calibre-indicadores/577-calibre-tendencias>.
- INEGI. (2012). "Estadísticas de vehículos de motor registrados en circulación." from <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=mamb202&s=est&c=21691>.

- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-69.
- Jiménez Cisneros, B. E. (2005). La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México.
- Karlsson, H. L., L. Nilsson, et al. (2005). "Subway particles are more genotoxic than street particles and induce oxidative stress in cultured human lung cells." Chem Res Toxicol **18**(1): 19-23.
- Lessey, E. C., C. Guilluy, et al. (2012). "From mechanical force to RhoA activation." Biochemistry **51**(38): 7420-32.
- Li, F., Q. Jiang, et al. (2013). "RhoA modulates functional and physical interaction between ROCK1 and Erk1/2 in selenite-induced apoptosis of leukaemia cells." Cell Death Dis **4**: e708.
- Matsumura, F. and D. J. Hartshorne (2008). "Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function." Biochem Biophys Res Commun **369**(1): 149-56.
- Narumiya, S., M. Tanji, et al. (2009). "Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 65-76.
- O'Connor, K. and M. Chen (2013). "Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion." Small GTPases **4**(3).
- O'Neill, M. S., D. Loomis, et al. (2004). "Do associations between airborne particles and daily mortality in Mexico City differ by measurement method, region, or modeling strategy?" J Expo Anal Environ Epidemiol **14**(6): 429-39.
- Osornio-Vargas, A. R., J. C. Bonner, et al. (2003). "Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition." Environ Health Perspect **111**(10): 1289-93.
- Pfitzer, G. (2001). "Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle." J Appl Physiol **91**(1): 497-503.
- Pope, C. A., 3rd (1996). "Adverse health effects of air pollutants in a nonsmoking population." Toxicology **111**(1-3): 149-55.
- Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, et al. (2002). "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution." JAMA **287**(9): 1132-41.
- Rasband, W. (1997-2008). ImageJ. USA, National Institutes of Health.
- Ridley, A. J. (1997). "The GTP-binding protein Rho." Int J Biochem Cell Biol **29**(11): 1225-9.
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 446-56.
- Romero-Lankao, P., H. Qin, et al. (2013). "Exploration of health risks related to air pollution and temperature in three Latin American cities." Soc Sci Med **83**: 110-8.
- Roubicek, D. A., M. E. Gutierrez-Castillo, et al. (2007). "Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City." Mutat Res **631**(1): 9-15.
- Sahai, E. and C. J. Marshall (2002). "RHO-GTPases and cancer." Nat Rev Cancer **2**(2): 133-42.
- Sánchez-Pérez, Y., Y. I. Chirino, et al. (2014). "Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the

- senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM10) exposure in lung cells." Toxicol Lett **225**(1): 12-9.
- Sánchez-Pérez, Y., Y. I. Chirino, et al. (2009). "DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants." Cancer Lett **278**(2): 192-200.
- Schofield, A. V. and O. Bernard (2013). "Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease." Crit Rev Biochem Mol Biol.
- Schwartz, J. (1994). "Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis." Environ Res **64**(1): 36-52.
- Schwarze, P. E., J. Ovrevik, et al. (2006). "Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies." Hum Exp Toxicol **25**(10): 559-79.
- Seaton, A., W. MacNee, et al. (1995). "Particulate air pollution and acute health effects." Lancet **345**(8943): 176-8.
- Sebbagh, M., C. Renvoize, et al. (2001). "Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing." Nat Cell Biol **3**(4): 346-52.
- SIMAT. (2013). "Calidad del Aire." from <http://www.calidadaire.df.gob.mx/calidadaire/index.php>.
- Takamura, M., M. Sakamoto, et al. (2001). "Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632." Hepatology **33**(3): 577-81.
- Tapon, N. and A. Hall (1997). "Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 86-92.
- WHO. (2011). "Fact sheet." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/index.html>.
- Yang, X., J. Di, et al. (2012). "The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer." Biomed Pharmacother **66**(3): 221-7.
- Yuan, S. Y., Q. Shen, et al. (2012). "Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function." Microvasc Res **83**(1): 82-8.
- Zaitseva, N. V., I. V. Mai, et al. (2013). "[Composition of the dust for the assessment of the exposure to the population in the areas of influence of industrial emissions of stationary sources]." Gig Sanit(5): 19-23.