



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Cambios en la expresión de XRCC1 en células epiteliales
de pulmón humano (A549) expuestas a material
particulado PM₁₀**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DAVID ALEJANDRO HERNÁNDEZ ESPINOSA



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Claudia María García Cuellar

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno.

Hernández

Espinosa

David Alejandro

56 46 15 89

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307345768

2. Datos del asesor.

Doctora

García

Cuellar

Claudia María

3. Datos de sinodal 1

Doctor

Valdés

López

Víctor Manuel

4. Datos de sinodal 2

Doctora

Fortoul

Vander Goes

Teresa Imelda

5. Datos de sinodal 3

Doctora

Gonsebatt

Bonaparte

María Eugenia

6. Datos de sinodal 4

Doctora

Gómez

Arroyo

Sandra Luz

7. Datos del trabajo escrito

Cambios en la expresión de XRCC1 en células epiteliales de pulmón humano (A549)
expuestas a material particulado PM₁₀

71 p

Año 2015

La recompensa del científico joven es la emoción de ser la primera persona en la historia del mundo que ve o entiende algo. Nada se puede comparar con esa experiencia... La recompensa del científico viejo es la sensación de haber visto cómo un vago bosquejo se convertía en un paisaje majestuoso.

-Cecilia Payne-Gaposchkin

Agradecimientos académicos

A la Dra. Claudia García Cuellar por aceptarme en su laboratorio como su alumno y transmitirme sus conocimientos, así como su tiempo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Biól. Roció Morales Bárcenas por transmitirme sus conocimientos, gracias a su apoyo, paciencia y tiempo se pudo realizar este trabajo.

A la Dra. Yesennia Sánchez Pérez por la asesoría y comentarios a mi trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio por sus sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Dra. Martha Salcido Neyoy, Dra. Natalia Manzano León, Dra Imelda Gonzáles Ramírez, M. en C. Elizabeth Reyes Zárate, Biól. Carlos García García, Biól. Marel Quezada Maldonado.

Al M. en C. Alejandro López Saavedra por ayudarme en la toma de fotografías de las células como también por sus valiosos consejos.

A mis sinodales el Dr. Víctor Manuel Valdés López, la Dra. Teresa Imelda Fortoul Vander Goes, la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo; por sus comentarios y sugerencias en el escrito de mi tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y proporcionarme las herramientas para mi formación académica.

Dedicatorias

A mi padre Rolando, por haberme inculcado el amor a la ciencia desde pequeño.
A mi madre Carmina, por enseñarme a siempre alcanzar mis objetivos. Su apoyo y enseñanzas han hecho de mí la persona que soy ahora.

A mis hermanos, Diego, Eric, Lorena y Desiree; su apoyo, su cariño y compañía a lo largo de mi vida han hecho que las noches más oscuras se conviertan en los días brillantes.

A Mario (El Jefe), Miguel y Felipe, por ser mis grandes amigos de la carrera; sin su compañía la carrera no hubiera sido lo mismo.

A Faviola, por ser mi primera y gran amiga desde el primer día en la Facultad de Ciencias. Tu compañía a lo largo de la carrera, son y siempre serán días inolvidables.

A todos que me enseñaron que el trabajo duro y la dedicación son el verdadero camino al éxito.

Tabla 1. Principales causas de muerte por cáncer en hombres y mujeres en el año 2010	15
Tabla 2. Mecanismos de acción y enzimas en las distintas vías de reparación del DNA	24

Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación por tamaño de las partículas contaminantes (PM).....	11
Figura 2. Vías potenciales de daño patofisiológico, asociado a la inhalación de PMs	14
Figura 3. Caracterización del área de estudio.....	18
Figura 4. Agentes casuales que dañan el DNA; ejemplos de lesiones y vías de producción de dichas lesiones	20
Figura 5. Respuesta ante el daño del DNA.....	22
Figura 6. Mecanismo de reparación del DNA por la vía de escisión de base (BER)....	29
Figura 7. Interacciones proteína-proteína mediada por la XRCC1.....	32
Figura 8. Análisis densitométrico de la expresión del RNAm de XRCC1 por RT-PCR.....	44
Figura 9. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína XRCC1 por Western blot.....	45
Figuras 10 y 11. Evaluación de la muerte , proliferación y daño celular por citometría de flujo.....	47
Figura 12. Localización celular de XRCC1 por inmunofluorescencia.....	50

Lista de Abreviaturas

°C	Grados Centigrados
APE	Endonucleasa AP
ATM	Gen ataxia telangiectasia mutado
AhR	Receptor de aril hidrocarburos
BER	Reparación por escisión de bases
BRCT	Dominio terminal del gen de susceptibilidad al cáncer de mama
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
COPD	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
Chk	Proteína serina/treonina quinasa
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERC	Especies reactivas de carbonilo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FEN	Endonucleasa flap 1
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HAP	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
hMLH1	Human MutL homolog 1
hMTH1	Human MutT homologue 1
HR	Recombinación homóloga
kDa	Kilodalton
M	Molar
Mm	Milimolar
MMR	Reparación por mal apareamiento
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
NHEJ	Recombinación no-homóloga

NTD	Dominio N terminal
OGG1	Oxoguanina-DNAglicosilasa 1
PARP	Poli-(ADP-ribosa) polimerasa
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de Fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PM ₁₀	Material particulado menor a 10 micrómetros
Polβ	Polimerasa beta
RH	Recombinación Homologa
RNA	Ácido ribonucleico
RNH	Recombinación no-homologa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Solución amortiguadora tris-salina
TE	Amortiguador Tris EDTA
TBE	Amortiguador Tris borato EDTA
TRITC	Tetra-metil-rodamina isotiocianato
UV	Rayos ultravioleta
XRCC1	Complemento cruzado de reparación de los rayos X
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
XPA	Proteína Xeroderma Pigmentosum tipo A
ZR	Zona residencial
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

Índice de Contenido

Lista de Tablas.....	1
Lista de Figuras.....	1
Abreviaturas.....	2
Índice.....	4
Resumen.....	7
1. Introducción.....	9
1.1 Material Particulado (PM).....	9
1.1.1 Contaminación atmosférica.....	9
1.1.2 Definición y origen.....	9
1.1.3 Clasificación.....	10
1.1.4 Composición.....	11
1.1.5 Estudios epidemiológicos.....	12
1.1.6 Estudios toxicológicos relacionados con las PM	16
1.1.7 Características geográficas y atmosféricas de la ciudad de México.....	17
1.2 Mecanismos de daño y reparación del DNA.....	19
1.2.1 Respuesta al daño del DNA.....	20
1.2.2 Tipos de mecanismos de Reparación del DNA.....	23
1.2.3 Mecanismo de Reparación de por Escisión de Nucleotidos (NER).....	26
1.2.4 Mecanismo de Reparación de por Recombinación Homóloga (RH).....	26
1.2.5 Mecanismo de Reparación de por Escisión de Bases (BER).....	27
1.3 El Gen y Proteína XRCC1.....	30

2. Justificación	34
3. Hipótesis	36
4. Objetivos	36
4.1 Generales.....	36
4.2 Particulares.....	36
5. Material y Métodos	37
5.1 Obtención de PM ₁₀	37
5.2 Cultivo celular.....	37
5.3 Exposición de las células a PM ₁₀	37
5.4 Extracción de RNA y RT-PCR.....	38
5.5 Inmunodetección de XRCC1 por ensayo de Western blot.....	39
5.6 Daño a DNA evaluado por citometría de flujo.....	41
5.7 Formación de focos de Daño-Reparación del DNA por inmunofluorescencia (Doble tinción).....	42
5.8 Análisis estadístico.....	43
6. Resultados	44
6.1 Evaluación de los niveles de la expresión génica de <i>XRCC1</i> en células expuestas a material particulado.....	44
6.2 Análisis de la expresión de la proteína XRCC1 en células expuestas a PM ₁₀	45
6.3 Niveles de proliferación, daño y muerte en células expuestas a PM ₁₀	46
6.4 Localización celular de XRCC1 y formación de focos de daño al DNA en células tratadas con PM ₁₀	50

7. Discusión.....	52
8. Conclusiones.....	60
9. Perspectivas.....	61
10. Referencias.....	62

Resumen

El crecimiento demográfico y urbano en la Ciudad de México ha producido un incremento en los niveles de contaminación que afectan la calidad del aire. Estudios epidemiológicos registran que la exposición prolongada al material particulado (PM, que por sus siglas en inglés significa Particulate Matter), especialmente a las aeropartículas con un diámetro ≤ 10 μm , producen efectos nocivos para la salud, por lo que se le ha considerado como un factor de riesgo para los habitantes, especialmente los niños, personas de la tercera edad y los que padecen enfermedades respiratorias. La exposición crónica a PM se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiorrespiratorias así como también en el desarrollo de cáncer (especialmente en el pulmón). Debido a su tamaño aerodinámico, las PM_{10} son inhaladas fácilmente y son capaces de penetrar y depositarse en las vías respiratorias profundas. Se ha reportado que la composición química de las PM juega un papel importante en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que produce un aumento en los niveles de estrés oxidante; efecto acompañado por la pérdida en la función anti-oxidante de ciertas enzimas. Las ERO derivadas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las endotoxinas y los componentes metálicos de las PM propician un estado el cual puede desencadenar en la generación de diferentes tipos de daño al DNA, siendo los más comunes la oxidación de las bases y el rompimiento de la cadena sencilla y doble del DNA. El mecanismo de reparación por escisión de bases (BER, que por sus siglas en inglés significa *Base Excision Repair*) es el mecanismo más común por el cual la célula reparan los daños producidos por las ERO. El mecanismo de reparación por BER se lleva a cabo por la acción de 25 diferentes proteínas las cuales pueden formar parte de la vía de reparación por tramo corto o por tramo largo. La proteína XRCC1, la cual se codifica por el gen *XRCC1*, interactúa en ambas vías de reparación de BER y su función se presenta en las primeras etapas de la reparación del DNA al actuar como una proteína de anclaje para los demás componentes enzimáticos involucrados en este mecanismo de reparación. Aunque actualmente no se conocen mutaciones asociadas a la proteína XRCC1 que pudieran alterar su actividad, se han registrado vías y factores por los cuales la función de esta proteína se encuentra desregulada o modificada.

En el laboratorio se ha reportado que la línea celular A459 (células epiteliales de carcinoma de pulmón humano), al estar expuesta a una dosis subletal de PM_{10} colectadas en distintas

zonas de la Ciudad de México, disminuye los niveles de RNA mensajero de los genes de reparación como la oxoguanina-DNA glicosilasa 1 (hOGG1), la Human MutT homologue 1 (hMTH1) y la Human MutL homologue 1 (hMLH1), representativos de distintas vías de reparación. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue profundizar en el conocimiento sobre los eventos iniciales que las PM₁₀ desregulan en los mecanismos de reparación al daño al DNA. Para esto, se evaluó el estado de expresión y localización sub-celular de la proteína XRCC1, por ser la proteína orquestadora en el sistema de reparación por BER, principal vía involucrada en la reparación de daños producidos por la oxidante o pérdida de bases derivados de un estado oxidativo celular. Además, también se evaluó el daño al DNA a través de la medición de γ H2A.X

Los resultados obtenidos indican que las PM₁₀ de la ciudad de México, producen un aumento significativo del 17% en los niveles del RNA mensajero de *XRCC1*. Por otro lado, los niveles de expresión de la proteína XRCC1 disminuyeron significativamente en un 22%, además de observarse que esta proteína se encontró en mayor proporción en el núcleo de las células. Por otro lado, las PM₁₀ no producen cambios en la proliferación, ni inducen apoptosis de manera significativa, pero si provocan rotura en la doble cadena del DNA en estas células. Estos resultados indican una participación de componentes de las PM en la formación de lesiones en la doble cadena del DNA y sugieren una desregulación en el sistema de reparación por la vía de BER, debido a los cambios en los niveles de expresión de la proteína.

1. Introducción.

1.1 Material Particulado (PM)

1.1.1 Contaminación atmosférica

El aire está conformado principalmente por oxígeno, nitrógeno y otros gases en menor cantidad que conforman la atmósfera. La existencia en el aire de otros gases o partículas que no son parte de su composición normal y que se presentan en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida se le denomina “contaminación atmosférica”. Los contaminantes atmosféricos puede agruparse en dos categorías: primarios, si se emiten directamente a la atmósfera y secundarios, si se forman como resultado de reacciones químicas (hidrólisis, oxidación o reacciones fotoquímicas) en las que intervienen los contaminantes primarios (INECC, 2013).

La contaminación atmosférica es un problema latente en las grandes ciudades de los países desarrollados y es un factor de riesgo para la salud de la población (Potter, 1997; Vallejo et al., 2003; OMS, 2011). Estudios epidemiológicos y toxicológicos han demostrado que la exposición a los contaminantes atmosféricos, especialmente al material particulado (PM por sus siglas en inglés que significa Particulate Matter), incrementa el riesgo de padecer enfermedades respiratorias, cardiovasculares y tienen un papel crucial en el desarrollo de cáncer, especialmente el pulmonar, debido a su capacidad de producir daños al material genético (Norman et al., 2007).

1.1.2 Definición y Origen

Una partícula es cualquier material disperso, sólido o líquido, que existe en la atmósfera bajo condiciones normales. Las PM son una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos que varían en origen, tamaño y composición química. Las PM representan casi el 10% de la masa total de los contaminantes en el aire en el Valle de México y se han

asociado recientemente a enfermedades cardiopulmonares y cáncer. El material particulado tiene su origen a partir de dos fuentes bien diferenciadas: naturales y antropogénicas (Pöschl, 2005).

Dentro de las fuentes emisoras naturales se encuentran procesos tales como: la erosión de los suelos, las erupciones volcánicas, la producción de polen de las plantas, tormentas de arena, incendios forestales y ciertos microorganismos (virus, bacterias y protozoarios) y representa aproximadamente 65% de la masa total del material particulado suspendido en el aire. Por otra parte, las fuentes antropogénicas incluyen el uso de combustibles derivados de la biomasa (quema de carbón, leña, residuos orgánicos, etc.), el uso de vehículos motorizados que emplean combustibles derivados del petróleo y procesos industriales tales como fabricadoras de acero y papel, entre otros productos. Aunque las partículas provenientes de las fuentes antropogénicas son menos en masa, sus efectos tóxicos en la salud suelen ser más significativos (Jiménez, 2002; Pope et al., 2006).

1.1.3 Clasificación

Las PM no son una identidad única debido a que está conformada por partículas que pueden clasificarse ya sea por su composición y/o por su tamaño. La manera más común de clasificar las PM en el aire es por su diámetro aerodinámico (tamaño adoptado al interactuar la partícula con el aire), y se dividen en ultrafinas, cuyo diámetro es menor a $0.1 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0.1}$), la fracción fina que comprende partículas con un diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) y la fracción gruesa, que son partículas cuyo diámetro aerodinámico es igual o menor a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) (Pérez-Vidal et al., 2010) (**Fig. 1**).

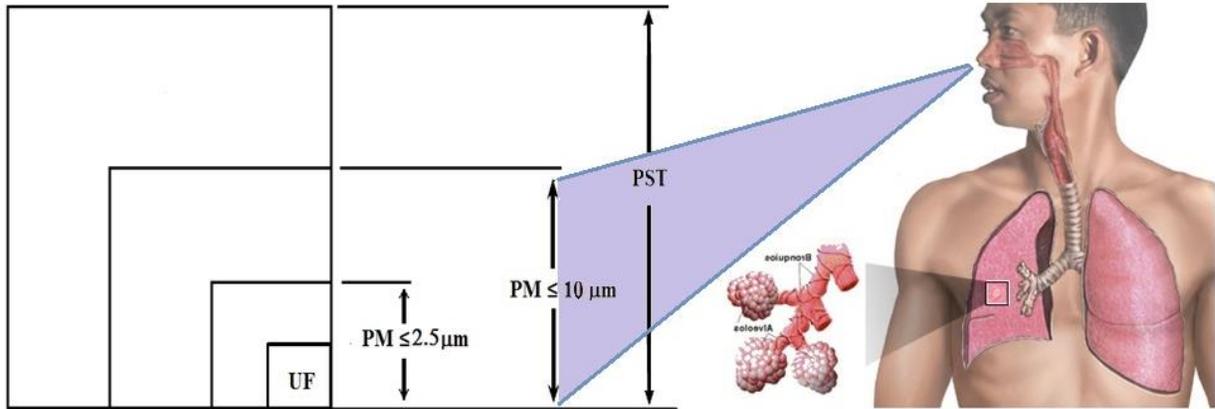


Figura 1. Clasificación por tamaño de las partículas contaminantes (PM). La fracción inhalable que comprende a las PM_{10} y $PM_{2.5}$ puede llegar a las vías respiratorias profundas y depositarse en los alvéolos, lo que altera el intercambio gaseoso (imagen tomada y modificada de Englert 2004).

El tamaño de las partículas es el parámetro más importante en términos de su comportamiento y, por lo tanto, de su distribución en la atmósfera. Dependiendo del tamaño, las partículas tienen diferentes periodos de vida media y capacidad de desplazamiento. Por ejemplo, las partículas finas tienen periodos de vida media en la atmósfera de días a semanas y viajan a distancias de 100 km o más. Por otro lado, las partículas gruesas generalmente se depositan más rápidamente, con una vida media en la atmósfera de solo minutos u horas, lo que les confiere una mayor variabilidad espacial dentro de una misma región (Rojas Bracho y Garibay Bravo, 2003).

1.1.4 Composición

Las aeropartículas al ser una mezcla compleja pueden estar constituidas de diferentes componentes orgánicos e inorgánicos, por lo que es posible encontrar agregados de carbono elemental u orgánico, metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) y material biológico como endotoxinas (Arriaga-Colin et al., 2004). La fracción fina ($PM_{2.5}$) puede tener su origen a partir de la transformación de ciertos productos, como por ejemplo las partículas

de sulfato y nitrato, que se generan a partir de sulfuros y óxidos de nitrógeno, respectivamente (Environment Canada and Health Canada 2000).

Según sea el origen o la fuente de emisión, se puede encontrar una gran variedad de elementos y metales dentro de los componentes de las PM (Miranda et al., 2000), sin embargo se han identificados algunos elementos bases tales como: Zinc (Zn), Plomo (Pb), Vanadio (V), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Cromo (Cr) y Silicio (Si). Dentro de estos elementos los metales y los diferentes componentes orgánicos son importantes en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Vega et al., 2004).

Se ha reportado que las PM₁₀ y PM_{2.5} juegan un papel importante a los daños en la salud debido a que se componen principalmente de sulfatos, nitratos, metales y varios compuestos químicos de origen orgánico, los cuales pueden ser adsorbidos al sustrato. Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en las partículas y las especies reactivas de oxígeno producidas por la composición metálica de las partículas se asocian a una serie de efectos como aberraciones cromosómicas, efectos mutagénicos, formación de aductos y el rompimiento de la cadena del DNA (Vega et al., 2004; Sierra et al., 2005; Villalobos-Pietrini et al., 2006).

1.1.5 Estudios epidemiológicos

Diversos estudios realizados en países industrializados sugieren que los agentes químicos de los contaminantes del aire de las grandes ciudades, pueden tener un papel significativo en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares y del tracto respiratorio, así como algunos tipos de cánceres humanos. Otros estudios epidemiológicos también han demostrado que el aumento en los niveles de contaminación del aire tiene repercusión en la población, especialmente en adultos mayores, niños y personas que sufren de problemas respiratorios (Pope et al., 2002); además de que presenta una asociación con el incremento en los niveles de mortalidad (Borja-Aburto et al., 1998).

Los efectos de las PM se pueden presentar en diversos órganos y tejidos, sin embargo por su pequeño tamaño tienden introducirse al tracto respiratorio a través de la garganta y la nariz,

depositándose en los alvéolos pulmonares, en donde incluso pueden llegar a entrar al torrente sanguíneo y ser transportadas a diferentes partes del cuerpo (Balásházy et al., 2003).

Se ha comprobado que el incremento en los niveles de concentración y la exposición prolongada al material particulado produce alteraciones de vías fisiológicas que se pueden relacionar con morbilidad y mortalidad cardiopulmonar, asociados a diferentes patologías como asma, bronquitis crónica, alteración en la función autónoma cardíaca e incremento en la susceptibilidad a presentar alteraciones en el ritmo cardíaco (**Fig. 2**) (Pope et al., 2006). El material particulado ha sido identificado como un factor de gran importancia para el desarrollo de cáncer, especialmente cáncer de pulmón; ya que se ha relacionado un aumento del 8% en el desarrollo de cáncer de pulmón y un incremento del 2.8% en la mortalidad por cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ (Pope et al., 2002; Kloog et al., 2013). Existen estudios de cohortes que muestran que poblaciones expuestas a altos niveles de contaminantes del aire, tienen de 10 a 30% mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que las poblaciones expuestas a niveles más bajos (Vinikoor-Imletr et al., 2011; Kam et al., 2013). Estas evidencias han permitido que recientemente (Octubre 2013), la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés que significa *International Agency for Research on Cancer*) declarara a la contaminación del aire extramuros (principalmente el material particulado) como causa de muertes por cáncer, y las clasificó en el Grupo I como un carcinógeno para los humanos (Loomis et al. 2013).

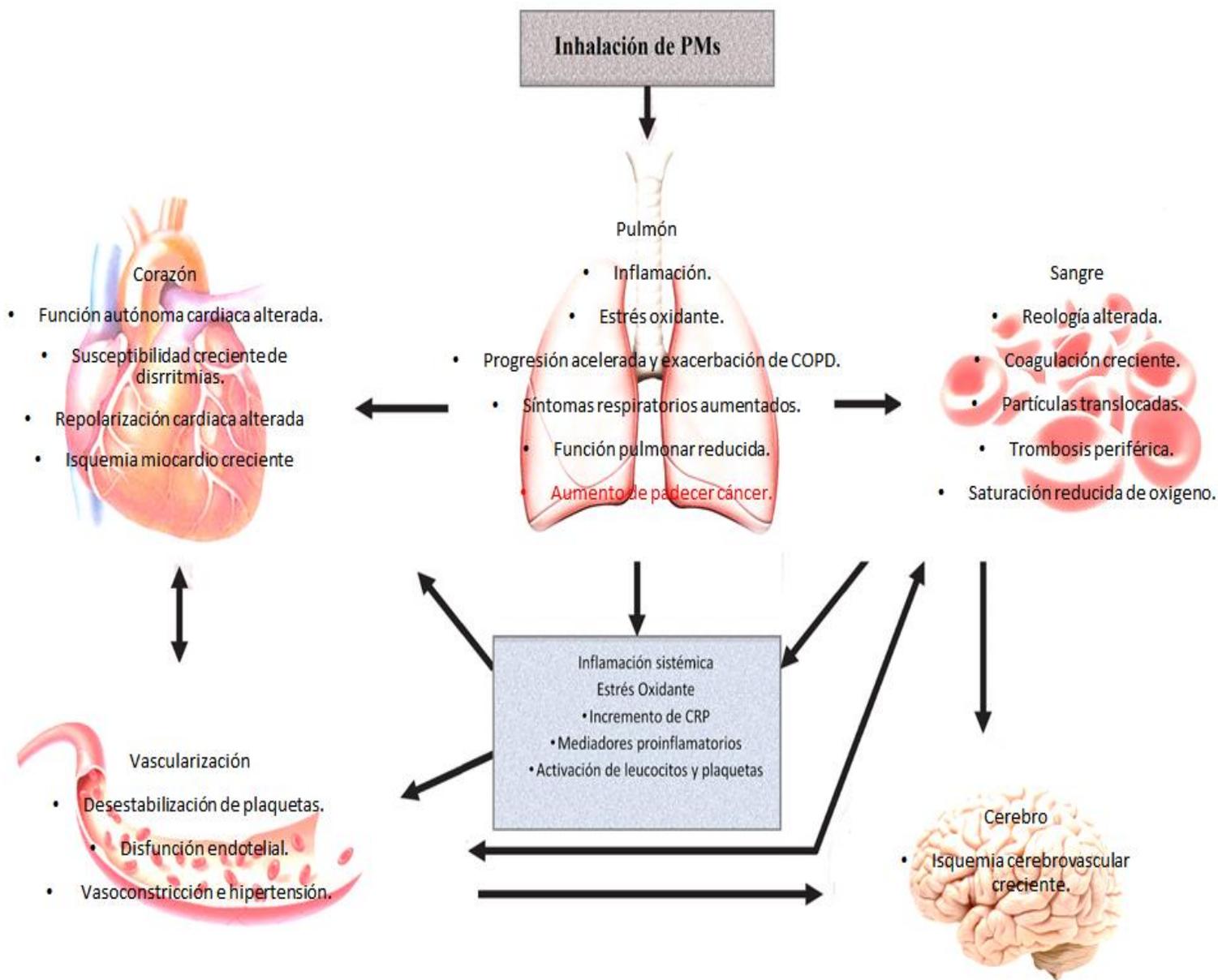


Figura 2. Vías potenciales de daño fisiológico, asociado a la inhalación de PMs (imagen tomada de Pope et al., 2006).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en el año 2012 de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), causó 8.2 millones de defunciones en todo el mundo y se prevé que esta cifra vaya en aumento hasta alcanzar 13.1 millones de muertes en el 2030 (revisado en la página de la Organización Mundial de la Salud, en español

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>). El cáncer de pulmón se identifica como la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, y es la principal causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres (Ferlay et al., 2010). En México, el cáncer de pulmón es el segundo cáncer más frecuente en hombres y la octava neoplasia más frecuente en mujeres; es además la segunda causa de muertes en hombres y la quinta en mujeres (Tabla 1) (Aldaco-Sarvide et al., 2012).

Hombres		Mujeres	
Tipo de Cáncer	Porcentaje (%)	Tipo de Cáncer	Porcentaje (%)
Próstata	15	Mama	13.3
Pulmón	12	Cérvico-uterino	10.4
Estómago	8.1	Hígado y vías biliares	7.3
Hígado y vías biliares	7	Estómago	6.8
Colorectal	5.8	Pulmón	5.1

Tabla 1. Principales causas de muerte por cáncer en hombres y mujeres en el año 2010 (tomada de Aldaco-Sarvide et al., 2012).

A pesar de que el tabaquismo es considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón, en México se le atribuye solo el 66% de los casos. Actualmente se sabe qué factores ambientales tales como exposición al asbesto, la contaminación atmosférica por partículas finas, el radón, compuestos de arsénico, el cadmio, el cromo, la radiación ionizante, entre otros, también pueden contribuir a la carcinogénesis pulmonar (Arrieta et al., 2012).

1.1.6 Estudios toxicológicos relacionados con las PM

Aunque actualmente no se conoce en su totalidad los mecanismos por los cuales las PM₁₀ producen efectos nocivos en la salud humana, se han llevado a cabo diferentes estudios que han demostrado los efectos tóxicos que las partículas producen en los seres humanos. Es importante destacar que los efectos que las PM producen sobre el organismo, están estrechamente relacionados con su composición química y biológica.

Los componentes de las PM juegan un papel importante en el desarrollo y en la perpetuación de una respuesta inflamatoria o en un proceso carcinogénico a nivel pulmonar (Alfaro-Moreno et al., 2002). Estudios realizados en células epiteliales de pulmón humano han demostrado que las PM₁₀ son capaces de causar daño al material genético; los principales daños se producen por la fragmentación y cortes a la cadena del DNA, además de la oxidación de las bases nitrogenadas y la lipoperoxidación de los ácidos grasos (Upadhyay et al., 2003; Choi et al., 2004; Sánchez-Pérez et al., 2009; Chirino et al., 2010). Estos eventos se producen principalmente por la promoción de un estado de estrés oxidante dentro de las células, capaz de generar ERO (Donaldson et al., 2003, Delfino et al., 2005, Chirino YI et al., 2010), lo cual ocurre a través de dos principales razones: la primera por la presencia de metales que constituyen a las PM, los cuales a través de una reacción de Fenton generan ERO (García-Cuellar et al., 2002). La segunda razón es por la liberación de moléculas inflamatorias como son el factor de necrosis tumoral (TNF) y ciertas interleucinas (IL) tales como la IL-6 y la IL-8 (Alfaro-Moreno et al., 2009), ambas moléculas involucradas en el desarrollo de procesos inflamatorios (Moon et al., 1999). Por otro lado, estudios realizados *in vivo* muestran que la exposición a altas concentraciones de PM₁₀ potencia la formación de tumores e incrementan los niveles de mutagenicidad en modelos animales (Ichinose et al., 1997; Sato et al., 2000).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la exposición a una dosis subletal de PM₁₀ (10 µg/cm²) no solo produce daño en el DNA de las células, sino que también promueve la respuesta de daño al DNA (Sánchez-Pérez et al., 2009), lo que desencadena en la activación de los distintos sistemas de reparación presentes en la célula. Sin embargo se ha observado que las PM causan una disminución en los niveles de expresión del RNA mensajero de genes como *hOGG1*, *hMTH1* y *hMLH1* involucrados en las vías de reparación del DNA por escisión de bases (BER, por sus siglas en ingles que significa *base excision repair*) y el

sistema de reparación por mal apareamiento (MMR, por sus siglas en inglés que significa Mismatch repair) (Morales-Báceras et al., en preparación). Mehta y col. reportaron que las PM producen deficiencia en la capacidad de reparación en las células por la alteración en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés que significa *Nucleotide excision repair*), ya que se ven afectados los diferentes componentes enzimáticos que participan en esta vía, lo que potencia la mutagenicidad de varios carcinógenos (Mehta et al., 2008).

1.1.7 Características geográficas y atmosféricas de la ciudad de México

La ciudad de México es una de las ciudades más grandes y con un alto índice de contaminación en el mundo. Factores como la alta industrialización, el incremento de la urbanización y las actividades antropogénicas, han provocado un impacto negativo sobre el ambiente.

Junto con las actividades antropogénicas, el problema de la contaminación del aire en la Ciudad de México se agrava por sus características geográficas, topográficas y meteorológicas. La ciudad se encuentra a una altitud de 2,240 metros sobre el nivel del mar, lo que produce una disminución en los niveles de concentración de O₂, condición que altera la eficiencia del proceso de combustión, lo que genera altas concentraciones de CO e hidrocarburos (Doran et al., 1998).

En la Ciudad de México se reúnen gran cantidad de contaminantes provenientes tanto de fuentes naturales como antropogénicas. Esto genera un mosaico en cuanto al tipo y niveles de contaminación, los cuales tienen elevada importancia en la salud.

Dadas las características geográficas y antropogénicas de la Ciudad de México, esta se ha dividido para su estudio en tres zonas (**Fig. 3**):

- Urbana industrial (norte): Zona caracterizada por presentar principalmente una actividad industrial, que arroja diariamente toneladas de contaminantes al aire y suelos (Miranda et al., 2000).

- Urbana comercial (centro): Zona caracterizada por presentar altos niveles de confluencia vehicular, altos niveles de emisión de gases y pocas áreas verdes (Miranda et al., 2000).
- Urbana residencial (sur): Zona caracterizada por una emisión moderada emisión de contaminantes por automóviles y fuentes naturales. Presenta grandes espacios abiertos y zonas verdes (Rosas et al., 2004).

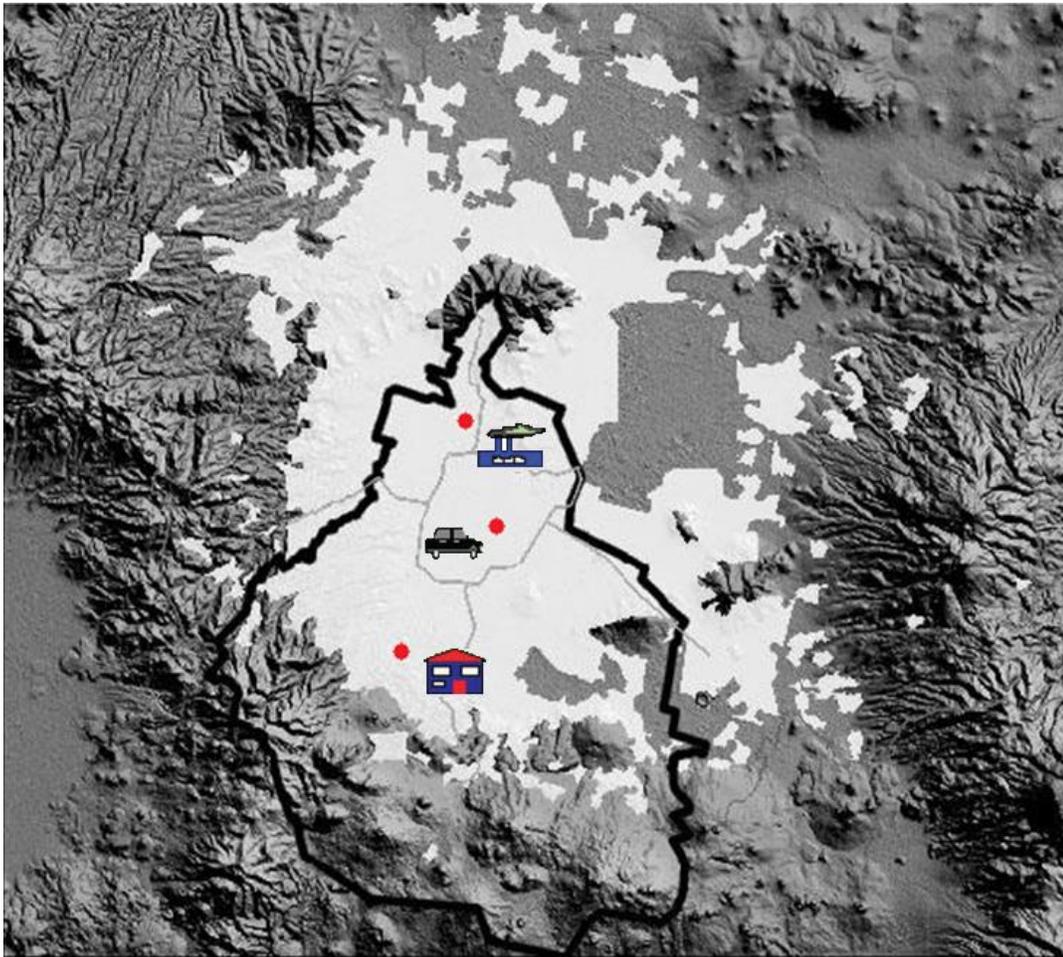


Figura 3. Valle de la ciudad de México. La línea negra limita la ciudad de México y los puntos rojos representan los sitios de muestreo de la zona norte (industrial), centro (comercial) y sur (residencial). En la imagen se pueden observar las cordilleras montañosas y en un color claro, el área del valle donde se concentran los contaminantes atmosféricos según las estaciones del sistema de monitoreo atmosférico (SIMAT) (Tomado y modificado de SIMAT 2013).

La toxicidad y la concentración de los componentes de las PM₁₀ colectadas en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) varían en función del lugar de recolección, lo que sugiere que los efectos celulares están relacionados con el contenido de metales o endotoxinas (Rosas-Pérez et al., 2007). En un estudio realizado por Alfaro-Moreno y colaboradores demostraron que la zona norte, al ser el principal centro de industria de la ciudad de México, contiene los niveles más elevados de metales y azufre; mientras que la zona sur se caracterizó por presentar un mayor nivel de material orgánico (Alfaro-Moreno, et al., 2002).

1.2 Mecanismos de daño y reparación del DNA

Debido a la constitución físico-química de los genes, no se puede garantizar una vida de estabilidad y/o función adecuada, por lo que se requiere de mecanismos que protejan al DNA de daños o alteraciones. En el DNA se producen diferentes tipos de lesiones por tres distintas causas. La primera se da por agentes ambientales tales como la radiación ultravioleta (UV) de la luz del sol, radiación ionizante, y numerosos agentes genotóxicos (tales como PM) las cuales causan alteraciones en la estructura del DNA, lo que ocasiona mutaciones capaces de incrementar el riesgo a cáncer (Hoeijmakers, 2001). La segunda causante son los productos resultantes del metabolismo celular, tales como especies reactivas de oxígeno derivados de la respiración oxidante y productos de la peroxidación de lípidos (más de 100 modificaciones se han identificado en el DNA). Finalmente la tercera comprende la desintegración de las uniones químicas en el DNA bajo ciertas condiciones fisiológicas, como por ejemplo la hidrólisis de las bases nitrogenadas que provocan la formación de sitios abásicos. Sin embargo la lesión que se produce con más frecuencia en el DNA es el corte de cadena sencilla y doble del DNA (Hoeijmakers, 2001).

En la figura 4 se resume algunos de los daños al DNA más comunes.

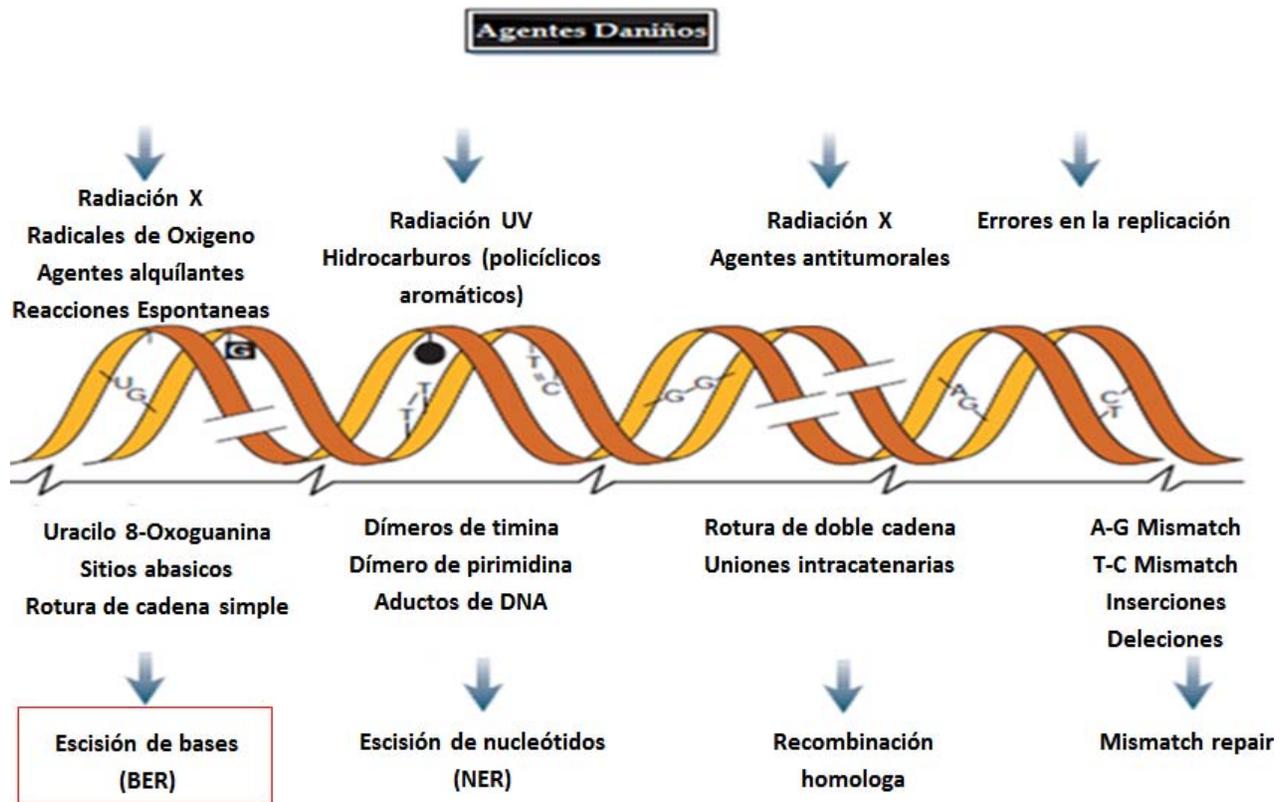


Figura 4. Agentes casuales que dañan el DNA (arriba); ejemplos de las lesiones del DNA inducidas por estos agentes exógenos (centro), y los mecanismos responsables de la eliminación de las lesiones (abajo) a través de las vías de reparación del DNA (tomado de Hoeijmakers, 2001).

1.2.1 Respuesta ante el daño del DNA

Las células se encuentran bajo la continua exposición de agentes endógenos y exógenos capaces de producir daño al DNA, y se ha estimado que se producen alrededor de 20,000 eventos de daño en las células cada día. Los diferentes tipos de lesiones resultantes son rápidamente detectadas y causan la activación de un proceso multifacético en el cual interacciona una red intrincada de vías de señalización conocidas como la respuesta ante el daño al DNA (DDR por sus siglas en inglés que significan *DNA damage response*) (Barzilai

et al., 2004), cuyo objetivo principal es la reparación y facilitación de la replicación del DNA (Harper et al., 2007). Para dar inicio a la respuesta de daño al DNA, las alteraciones producidas deben ser detectadas; este proceso se lleva a cabo por al menos cinco diferentes complejos moleculares. Uno de estos complejos implica la participación de la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) la cual es activada por la rotura de la doble cadena del DNA lo que provoca su auto-fosforilación, evento encargado de mantenerla activa (Bakkenist et al., 2003). Esta proteína, una vez activada comienza a concentrarse en sitios específicos en el núcleo y forman los denominados focos de daño a DNA (Bakkenist et al., 2003). Uno de los sustratos de ATM es la variante de histona H2A.X, la cual pertenece a la subfamilia de la histona H2A. En respuesta ante los daños en el DNA, H2A.X es fosforilada por ATM en el residuo conservado de Serina en la posición 139 (γ H2A.X), (Rogakou et al., 1998, Burma et al., 2001). Esto provoca la formación de focos de daño en el núcleo, los cuales se encuentran co-localizados con los sitios de daños identificados por ATM (Rogakou et al., 1999, Sedelnikova et al., 2002).

Además de detectar el daño en el DNA, ATM también es capaz de regular el ciclo celular a través de la activación de las proteínas serina/treonina cinasa Chk1 (Chk1) y serina/treonina proteína cinasa Chk2 (Chk2). Las proteínas Chk1 y Chk2 se consideran uno de los componentes más importantes dentro de la respuesta por daño al DNA, debido a que están involucradas en procesos relacionados con la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del DNA ya que dan inicio a las diferentes vías de reparación del DNA (Stracker et al., 2009).

Actualmente no se conoce en su totalidad como la vía de señalización DDR conduce a la activación de la vía de reparación por BER, sin embargo se ha reportado que la proteína Chk2 es capaz de modular la activación de esta vía por medio de la fosforilación de XRCC1 cuando se producen lesiones en las bases (Chou et al., 2008). La proteína XRCC1 ha sido identificada no solo por su capacidad de identificar los sitios de daños que se producen en las bases del DNA, sino también por su capacidad de formar complejos con las distintas proteínas involucradas en la vía de reparación de BER. La fosforilación de XRCC1, la cual es modulada por la proteína Chk2, favorece estos procesos, además de proteger a la proteína de ser degradada por el sistema proteosomal (Parsons et al., 2010).

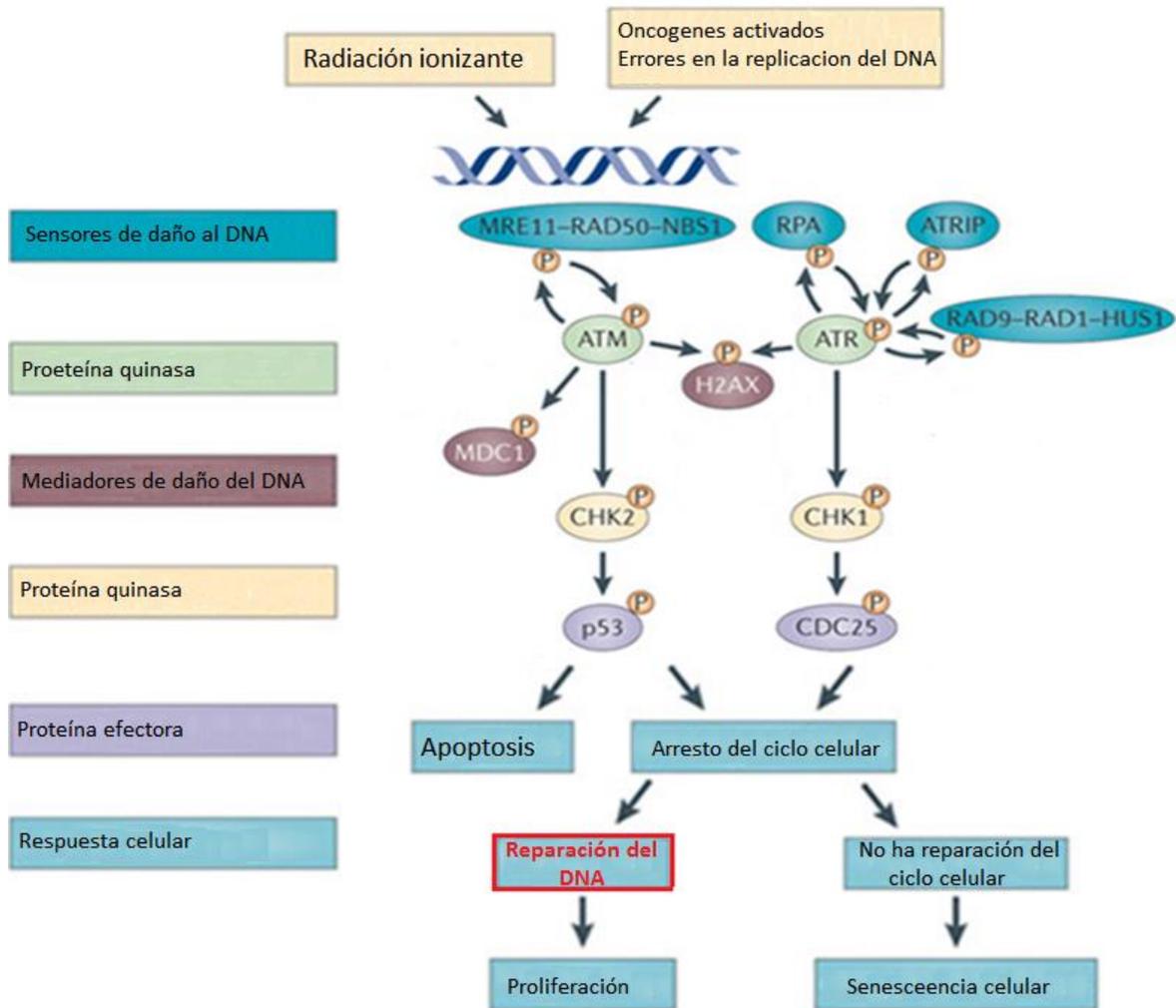


Figura 5. La vía de respuesta ante el daño del DNA se compone de dos principales sensores de daño al DNA: el complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) el cual detecta lesiones producidas en la doble cadena del DNA; y la proteína de replicación A (RPA) la cual junto al complejo RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) detecta lesiones producidas en una de las cadenas del DNA. Estos sensores reclutan la ataxia telangiectasia mutada (ATM) (a través del complejo MRN) y la ataxia telangiectasia-Rad3 (ATR) (a través de la proteína RPA y el complejo 9-1-1), la cual se encuentra unida a la proteína ATR-interacting (ATRIP). Estos a su vez fosforilan (P) a la variante de histona H2A.X en Ser139 (conocida como γ H2A.X) en las regiones proximales a la lesión del DNA. De esta manera, aunque ATM es principalmente activada por el rompimiento de la doble cadena del DNA, ATR es capaz de producir una respuesta ante el estrés genotóxico, causado por el estrés de replicación del DNA, el cual puede ser causado por los oncogenes. γ H2A.X es requerida para el reclutamiento de la proteína MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) la cual sostiene y amplifica la señalización de la vía DDR a través de la acumulación del complejo MRN y la activación de ATM. Eventualmente, la señalización de la vía DDR comienza a alejarse de los sitios de daño debido a la participación de las proteínas cinasas Chk2 (CHK2) (que

es fosforilada principalmente por ATM) y Chk1 (CHK1) (que es fosforilada principalmente por ATR) cuya señalización activa efectores río abajo, tales como p53 y la fosfatasa CDC25. Las respuestas mediadas por la activación de la vía DDR pueden ser: 1) la muerte celular por apoptosis, 2) detención transitoria del ciclo celular seguida ya sea por la reparación del DNA y la reanudación de la proliferación, o 3) la senescencia celular producida por el daño no reparado persistente en el DNA (tomado y modificado de Sulli G et al., 2012).

1.2.2 Tipos de mecanismos de Reparación del DNA

La respuesta de las células frente al daño genético comprende una etapa inicial de reconocimiento del sitio afectado, seguida de una respuesta apropiada: reparación del DNA o muerte celular. Dependiendo del nivel de daño en el DNA y el momento del ciclo celular en el cual ésta tiene lugar, se puede inducir una estrategia de reparación que priorice la supervivencia, aún a expensas de incurrir en un cambio genético. Por lo anterior la ocurrencia de mutaciones y reordenamiento cromosómico no debe ser interpretada como una simple respuesta pasiva frente al daño.

La alteración de nucleótidos es corregida mediante el mecanismo de NER, mientras que la alteración de bases individuales puede ser corregida mediante el mecanismo de BER. Las roturas simples con frecuencia se asocian a la pérdida de una base en el sitio de corte y no pueden ser reparadas solo por la acción de las ligasas, sino que ponen en marcha el mecanismo de reparación por BER. La distorsión de la hélice del DNA causada por la lesión de una de las cadenas se corrige por la indemnidad de la cadena complementaria, lo que permite que la DNA-polimerasa restituya con fidelidad la secuencia original. La reparación de las roturas de las dos cadenas del DNA involucra dos tipos de procesos de reparación: la recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés que significan *Homologous Recombination*) y recombinación no-homóloga (NHEJ por sus siglas en inglés que significan *Non-homologous end joining*) (Webb et al., 2005). La recombinación homóloga, es el mecanismo principal de reparación por el rompimiento de las dos cadenas del DNA y se sustenta en la identidad de secuencias entre ciertas regiones del genoma (la secuencia del DNA de la cual se toma la información debe de tener una identidad de más de 200 bases respecto del sitio dañado). Mediante este mecanismo los extremos del DNA son parcialmente eliminados y el nuevo fragmento del extremo de la cadena simple 3', invade y se extiende

por la doble hélice de la cadena homóloga para poder restaurar la cadena dañada. La recombinación no-homóloga es el mecanismo de reparación más frecuentemente en las células de los mamíferos y es producida por la ruptura las dos cadenas del DNA. Sin embargo, con frecuencia al llevarse a cabo este tipo de reparación se produce la pérdida o alteraciones en la secuencias del DNA (Pérez et al., 2002; Vodicka et al., 2004).

Las cuatro formas básicas de reparación del DNA comprenden la acción de un sistema complejo de proteínas especializadas (**Tabla 2**), cuya actividad, a su vez está ligada a las funciones de duplicación y transcripción del DNA (Hoeijmakers, 2001). Estas proteínas son codificadas por más de 80 genes con un papel directo en la reparación del DNA y más de 30 genes con un papel indirecto.

Tabla 2. Distintos sistemas de reparación presentes en las células eucariontes.

Sistema de reparación	Tipo de daño que reconoce.	Proceso de reparación.
NER	Repara los daños producidos por la distorsión en la doble hélice del DNA producido principalmente por radiaciones y la exposición a hidrocarburos.	En el sistema de reparación de NER puede llevarse a cabo por dos tipos, solo diferenciándose en el reconocimiento del daño. Al momento de reconocer el daño por dos proteínas denominadas XPA y XPC, que posteriormente estarán a cargo del reclutamiento de los demás elementos. Uno de los elementos que se unen al DNA son dos endonucleasas, la XPF y la XPG las cuales cortan la hebra dañada en los extremos 5' y 3' respecto al daño. Al complejo se le incorporan dos proteínas XPB y XPD que las cuales presentan actividad de helicasa y eliminan el fragmento dañado. La sustitución de los nucleótidos correctos se produce por medio de las DNA polimerasas δ y ϵ . Finalmente, el DNA es unido por una DNA Ligasa.
BER	Repara los daños producidos a un solo nucleótido causados por oxidación, alquilación, hidrólisis o desaminación.	El reconocimiento y corte de la base afectada del resto de la hélice se produce por una Glucosilasa. La endonucleasa APE1 produce un corte en el sitio abásico de la cadena dando inicio a la reacción de BER. La polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP) y la polinucleótido cinasa (PNK), son importante para dar inicio al sistema de BER a partir del rompimiento de una cadena. La DNA pol β lleva a cabo la unión y relleno de un solo nucleótido sellado por el complejo XRCC1-ligasa III.

MMR	Corrige los errores que se producen en la replicación y recombinación, que resultan en nucleótidos mal apareados después de la replicación del DNA.	El proceso inicia con el reconocimiento de la lesiones en el DNA por medio de un complejo proteico MutS activado al término de la replicación. Los complejos MutL y MutS, están encargados del reconocimiento de las nuevas bases y discriminan entre las correctas e incorrectas. Esto se lleva a cabo por medio de la activación de una exonucleasa la cual corta y elimina el fragmento de DNA dañado mientras que nucleótidos correctos son colocados por la DNA polimerasa δ . Al final de este proceso la DNA ligasa cierra el gap producido por el corte.
DBS	El proceso repara el corte de las dos hebras de DNA que se producen por diferentes agentes genotoxicos como la radiación ionizantes (rayos X) y las especies reactivas del oxígeno.	Este mecanismo se puede llevar a cabo por medio de dos diferentes mecanismos: <ul style="list-style-type: none"> • Mecanismo de reparación no homólogo de los extremos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Une directamente los extremos que se han roto. ➤ Puede producir la pérdida de nucleótidos (deleciones). • Mecanismo de reparación de unión homólogo de los extremos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Si se produce la replicación, una vez rota la molécula, se busca la información por medio de la cromátida hermana y se recupera la información original. ➤ Si no se produce la replicación, el mecanismo busca el cromosoma homólogo con su información y repara la hebra hermana.

Hasta hace poco se habían caracterizado la secuencia de 115 genes de los más de 130 involucrados en la reparación (Loktionov et al., 2004). La gran variación encontrada en las regiones codificadas de estos genes condiciona la existencia de genotipos muy complejos. Se han reportado casos de individuos que sufren alteraciones en los sistemas de reparación y se caracterizan por tener alteradas la capacidades de reconocimiento y reparación de las lesiones producidas, principalmente por agentes genotóxicos (Berwick et al., 2000). Las mutaciones producidas por un mal funcionamiento en cualquiera de las distintas vías de reparación son raras en las poblaciones, no así los polimorfismos originados de los cambios de aminoácido en proteínas de reparación, lo que resulta en una variación en su función (Ford et al., 2000, Norppa et al., 2004).

1.2.3 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)

El mecanismo de reparación de NER es capaz de remover una amplia variedad de lesiones en el DNA. Este mecanismo se activa únicamente cuando se produce una distorsión en la doble hélice del DNA (Niedernhofer, 2008), característica que hace a este mecanismo sumamente versátil debido a que no requiere de enzimas específicas para cada lesión (Nospikel 2000). La vía de NER es un mecanismo altamente conservado que consiste en una serie de pasos en los que están involucradas más de 25 proteínas (Lans et al., 2010). La vía inicia a través de dos mecanismos de reconocimiento diferentes (reparación global del genoma o acoplada a la transcripción), sin embargo la manera en que se elimina el daño se hace por una vía común. Ambas vías consisten en el reconocimiento del daño, el corte del oligonucleótido dañado, la polimerización del nuevo fragmento usando como molde a la hebra complementaria y finaliza con la ligación del nuevo fragmento (Araújo y Woods, 1999).

1.2.4 Mecanismo de reparación por recombinación homóloga (RH)

Para garantizar la estabilidad genómica es necesario que se lleve a cabo una reparación adecuada de las lesiones producidas en la doble cadena del DNA durante la replicación o por consecuencia de agentes tóxicos que dañan el DNA. Las células eucariontes han desarrollado los mecanismos de recombinación homóloga (RH) y no homóloga (RNH) para reparar principalmente la rotura de la doble cadena del DNA. La RH es un proceso que involucra una interacción con la cromátida hermana, la cual actúa como un cebador para la reparación y es de mayor importancia debido a que previene los daños por fragmentación cromosómica, translocación y deleciones que pudieran llevar a un proceso carcinogénico (Winsey et al., 2000). La RH es una vía de reparación la cual involucra la participación de 16 o más componentes proteicos, entre los cuales se encuentran los productos de BRCA1, BRCA2, XRCC2 y XRCC3 (Goode et al., 2002). Esta vía al igual que las otras se inicia a través del reconocimiento de la lesión producida en el DNA, por medio de la respuesta de daño al DNA lo que produce un estado de la cromatina necesaria para que se produzcan las reacciones de

reparación, lo que favorece el reclutamiento de las proteínas de reparación (Hoeijmakers 2001).

1.2.5 Mecanismo de reparación por escisión de bases (BER)

Debido a que las bases del DNA son particularmente susceptibles a la oxidación mediante las especies reactivas de oxígeno, el organismo desarrolló un sistema de reparación altamente conservado a lo largo de la evolución. Se ha señalado al sistema de BER como el principal mecanismo involucrado en la remoción de lesiones inducidas por ERO, metilaciones, desaminaciones e hidroxilaciones (Christmann et al., 2003).

El primer paso de la vía de BER es la remoción de las bases dañadas o modificadas mediante las DNA glicosilasas. En mamíferos se han reportado al menos 11 diferentes tipos de glicosilasas las cuales reconocen un daño y producen que el enlace glucosídico se hidrolice, lo que causa la liberación de la base dañada. Las glicosilasas se dividen en tipo I y II; las de tipo I remueven la base lo que resulta en un sitio abásico; mientras que las del II no solo remueven la base, sino que también producen un corte a través de la función de la endonucleasa apurínica/apirimidínica (AP1) lo que forma un sitio apurínico en el sitio 3' de la lesión, lo que deja al DNA en cadena sencilla. El resultado de estas reacciones es la ausencia de una base con una desoxirribosa fosfato en el extremo 5' y un radical hidroxilo (OH) en la región 3'. Una vez que la base dañada se remueve, y dependiendo de la extensión del sitio abásico, se inicia la señalización ya sea hacia la vía de reparación de tramo corto (short-patch) o por tramo largo (long-patch) de las vías de BER. Aún no es del todo claro de qué depende la activación de una u otra vía, estudios *in vitro* demostraron que posiblemente esté relacionado con la disposición de los componentes enzimáticos presentes al momento que se produce el daño (Sheila et al., 2007).

En la vía de reparación de tramo corto, la DNA Polimerasa β (DNA pol β) polimeriza los nucleótidos faltantes y remueve el residuo de azúcar que carece de base por medio de su actividad de liasa. Finalmente, el fragmento recién polimerizado es sellado mediante el complejo XRCC1-ligasa 3. Por otro lado, la vía de reparación por tramo largo involucra la participación del DNA pol β , pol δ , y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

para la síntesis del fragmento reparado. Finalmente, la endonucleasa FEN1 remueve el DNA sobrante y la DNA ligasa 1 une los extremos reparados a la hebra del DNA (**Fig. 6**) (Krokan, 2000; Hoeijmakers, 2001).

Se ha reportado que la deficiencia en la vía de reparación por BER se encuentra estrechamente relacionada a diferentes tipos de síndromes, tal como el de Cockayne. Por otro lado, modelos experimentales de ratones mutantes en los que se induce la inactivación de alguna de las proteínas nucleares de BER demuestran letalidad embrionaria. Además los polimorfismos encontrados en XRCC1 están asociados con cáncer de pulmón y otros tipos de cánceres (Schneider et al., 2008).

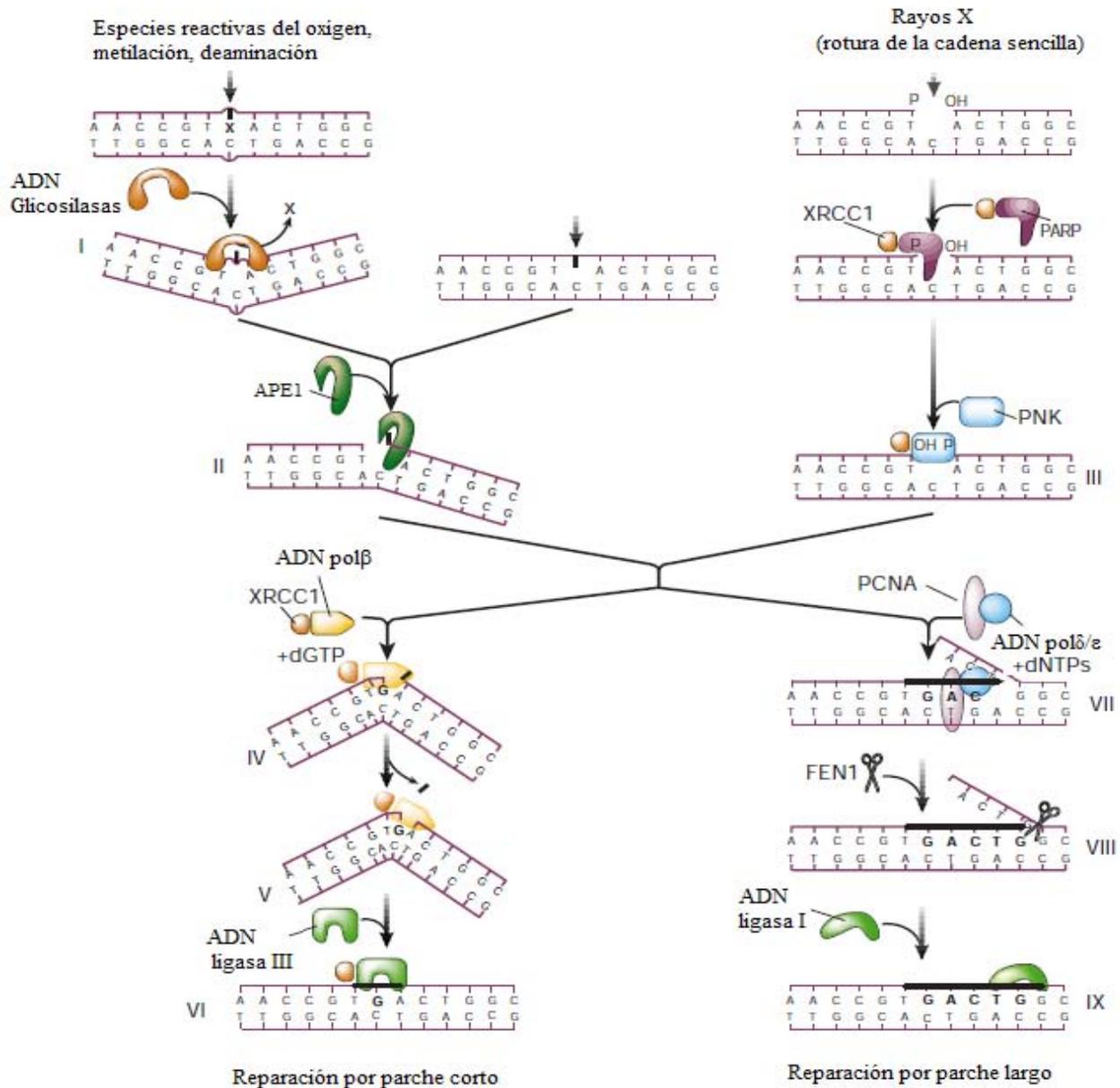


Figura 6. Mecanismo de reparación del DNA por la vía de escisión de base. El proceso inicia cuando se remueven la base dañada de la hélice, al comprimir la “columna vertebral” del DNA, para acomodar la base en la cavidad interna de la proteína DNA glicosilasa. Dentro de la proteína, la base dañada es cortada en el esqueleto del azúcar fosfatado (I). El sitio “abásico” resultante puede ocurrir espontáneamente por hidrólisis del enlace N-glicosídico. El núcleo de la reacción de BER se inicia por un corte en la cadena en el sitio abásico por la endonucleasa APE1, la cual corta a la cadena por el lado 5’ del sitio AP y deja un 3’OH libre (II). La polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP) se une y se activa por las rupturas en la cadena de DNA, reconociendo los sitios de daño; mientras que la polinucleótido cinasa (PNK) se une y protege los extremos para la reparación.

Tanto PARP como PNK son importantes cuando BER se inicia por el rompimiento de una cadena de DNA (III). En mamíferos, el llamado “tramo corto” de reparación, es el modo dominante para el resto de la reacción. El DNA-Pol β , la cual presenta una actividad AP liasa, elimina el azúcar-fosfato abásico. Al termino la DNA- Pol β lleva a cabo el pegado y relleno de un nucleótido (actividad polimerasa) (IV) y remueve el azúcar sin base a través de su actividad exonucleasas (V); esto se sigue entonces por el sello del hueco restante por el complejo XRCC1-ligasa III (VI). El “tramo largo” de reparación involucra la participación de DNA-Pol δ y DNA-Pol ϵ ; y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para la reparación (de 2 a 10 bases), así como la endonucleasa FEN1 para remover el pedazo de DNA que se desplaza, y la DNA ligasa I para sellar la cadena (VII-IX). La proteína XRCC1 interacciona con la mayoría de los componentes centrales de BER y, por lo tanto, puede ser un instrumento en el recambio de proteína (tomado de Hoeijmakers, 2001).

1.3 El gen y proteína XRCC1.

Los genes *XRCC* (por sus singlas en inglés de X-ray repair cross-complementing) han sido identificados por su papel en la protección ante los daños causados principalmente por radiación ionizantes, por lo que han sido señalados como un componente esencial en la estabilidad genética (Thacker et al., 2004). Uno de los primeros genes identificados en esta familia es el gen de *XRCC1*, que sintetiza para una proteína del mismo nombre, la cual tiene la capacidad de restaurar la función reparadora dentro de una línea celular de ovario de hámster mutante (Stern et al., 2001).

La función de la proteína XRCC1 se considera de mayor importancia para mantener la estabilidad genética, debido a que líneas celulares deficientes o que se encuentran mutadas presentan hipersensibilidad a la radiación ionizante así como a los agentes alquilantes. Esto conlleva a la formación y acumulación de lesiones producidas por la rotura de la cadena sencilla del DNA, a un incremento en los niveles de aberraciones cromosómicas espontáneas y deleciones, inducidas principalmente por mutaciones espontáneas (Shen et al., 1998; Thacker et al., 2003). Estudios realizados *in vivo* en ratones mutantes para XRCC1 presentaron un fenotipo de letalidad embrionaria, lo que demuestra la importancia de esta molécula durante el desarrollo embrionario (Ladiges, 2006).

Este gen se clonó y mapeó en el cromosoma 19 del ser humano (19q13.2-13.3), presenta 17 exones y 32252pb, y su proteína pesa 85 kDa. Aunque la función de la proteína XRCC1 en

la reparación del daño en el DNA no está del todo claro, se ha identificado que ésta participa en la reparación producida por la radiación ionizante o por la acción de especies reactivas de oxígeno derivadas de manera endógena y por agentes alquilantes (Caldecott et al., 2003).

Actualmente no se le atribuye ninguna actividad enzimática a XRCC1, sin embargo su característica más notable es la capacidad para interactuar y formar complejos con otras proteínas involucradas en la reparación, tales como AP1, Pol β , PARP1 y con la ligasa III. Además, actúa como una proteína orquestadora de las enzimas que participan en cada una de las etapas del mecanismo de reparación (Loizou et al., 2004; Hang et al., 2007).

Se han identificado al menos tres dominios dentro de la proteína en donde se llevan a cabo las interacciones con las otras proteínas para formar los complejos proteicos. El dominio N-terminal (NTD) es el sitio de unión de la DNA Polimerasa β (Pol β) lo que le permite interactuar con la secuencia de DNA dañado (Dianova et al., 2004), aunque también se ha propuesto que la interacción XRCC1 con la DNA Pol β pudiera definir otro papel de XRCC1 en BER. Estudios realizados *in vitro* muestran que la presencia de XRCC1 limita el número de nucleótidos para remplazar a través de la actividad de la DNA Pol β , lo que sugiere una actividad distinta a la de estabilización de la ligasa (Prasad et al., 2001). XRCC1 también presenta dos dominios BRCT, los cuales tienen motivos conservados identificados por primera vez en BRCA1 (está proteína que participa en la detección y reparación del DNA), que funcionan como mediadores de las interacciones entre las proteínas (Beernink et al., 2005). La proteína PARP forma uniones con el dominio BRCT1 a través de sus dedos de zinc (Duell et al., 2001). Una de las interacciones más importantes se produce en la región BRCT2, en esta región se origina la unión de la enzima ligasa III, la cual forma el complejo proteico encargado de unir las nuevas bases o fragmentos del DNA. Se ha sugerido que el área de unión entre NTD y BRCT1 puede ser una zona de unión para otras proteínas tales como Apex y OGG1 (**Fig. 7**) (Marsin et al., 2003) y PCNA (Fan et al., 2004).

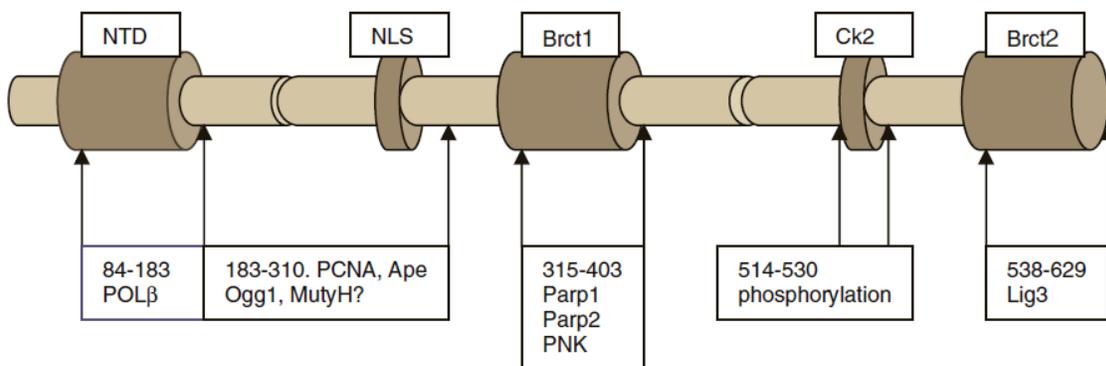


Figura 7. Dominios y sitios de unión e interacción de la proteína XRCC1 (tomado de Ladiges, 2006)

XRCC1 interactúa de manera física y funcional con OGG1, la cual es la glucosilasa humana que da inicio la reparación de BER cuando se presenta el daño por la formación de aductos de 8-oxo-Guanina (8oxoG). Esta base modificada es altamente mutagénica y se ha descrito a BER como el principal mecanismo predominante, encargado de remover este tipo de lesiones (Barnes et al., 2004).

Aunque no se le ha atribuido ninguna actividad enzimática a XRCC1, ésta posee dominios ricos en treonina en donde se producen interacciones con otras proteínas, en especial con la serina/treonina proteína kinasa CHK2 (Chk2) como ya se mencionó antes, Chk2 es una proteína involucrada en la respuesta y reparación ante el daño al DNA. Se ha reportado que en líneas celulares privadas de esta interacción presentan una reducción en sus niveles de reparación y una alta sensibilidad ante los daños por alquilación (Chou et al., 2008). Estos dominios también han sido identificados como sitios de fosforilación de XRCC1 por la proteína quinasa Chk2. Se considera a esta fosforilación de gran importancia para la protección ante la degradación de XRCC1 por el sistema de ubiquitina-proteosomal, además de que le confiere estabilidad en el núcleo (Parsons et al., 2010).

Aunque no se han encontrado mutaciones de este gen en tumores humanos, XRCC1 es altamente polimórfico, se han descrito más de 60 polimorfismos de un único nucleótido, de los cuales aproximadamente 30 se localizan en exones o regiones promotoras (Lamerdin et al., 1995). Un solo polimorfismo dentro de los nucleótidos de este gen ocasiona susceptibilidad a cáncer. Estas alteraciones no conservativas influyen en la capacidad de

reparación del DNA al alterar la interacción proteína-proteína entre la proteína XRCC1 y las otras proteínas involucradas en el sistema de reparación de BER (Sak et al., 2007).

2. Justificación.

La contaminación ambiental es uno de los principales problemas que aquejan a la ciudad de México y representa un factor de riesgo para la salud de la población. Dentro de la contaminación ambiental se encuentra el material particulado presente en el aire (PM), y los antecedentes han demostrado que estas partículas por su composición y capacidad de penetración a las vías respiratorias tienen un mayor efecto dañino en la salud humana. Las células de pulmón son, principalmente, las que presentan más alteraciones en su DNA y sus procesos celulares, producido por los componentes de estas partículas, ya que se exponen directamente a períodos más prolongados. La importancia de identificar los tipos de procesos celulares que se ven afectados por la exposición al material particulado es de gran importancia, ya que nos permitirá entender cómo este material y sus componentes pueden contribuir de manera directa al proceso carcinogénico en tejido pulmonar.

En la ciudad de México la composición y por ende la toxicidad del material particulado depende de las zonas de colección. Esto se da ya que hay zonas con altos niveles de actividad industrial (zona norte), altos niveles de flujo vehicular (zona centro) y zonas mayormente residenciales (zona sur). Aunque se ha identificado que el material presente en las zonas norte y centro producen un mayor daño genotóxicos en las células, se ha observado que las PM₁₀ de la zona sur han adquirido un mayor potencial genotóxico a través de los años, debido al incremento de obras de construcción y del flujo vehicular (Rosas-Pérez et al., 2007). Es por ello que es importante verificar si, además de incrementar su capacidad genotóxica, estas PM también provocan la desregulación de la vía de señalización del sistema de reparación por escisión de bases (BER) en una línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. Se eligió trabajar con esta línea celular debido a que no se encuentran alterados sus mecanismos de reparación del ADN; además de que se encuentran expresando de manera normal a la proteína XRCC1.

Estudios previos han registrado que el material particulado es capaz de producir daño al DNA y al mismo tiempo alterar los mecanismo de reparación de éste. En el laboratorio hemos encontrado que las enzimas hOGG1, hMTH1 y hMLH1 involucradas en la reparación del

DNA, presentan una disminución en su RNA mensajero al ser expuestas a PM₁₀ de las zonas norte y centro de la Ciudad de México, efecto atribuido al estrés oxidante producido por los metales pesados que forman parte del material particulado.

Consideramos que posiblemente la proteína XRCC1 también pueda encontrarse afectada por las PM₁₀, por lo que la realización de este estudio es importante debido a que esta proteína es una de las primeras en coordinar la reparación del DNA producido principalmente por la oxidación de bases, sitios AP y cortes en cadena sencilla y doble del DNA. Su estudio podrá contribuir a un mejor conocimiento del estado de alteración de las vías de reparación del DNA inducido por la exposición a material particulado del aire de zonas urbanas.

3. Hipótesis.

Al exponer células epiteliales de pulmón humano (A549) a una dosis subletal de PM₁₀ de una zona residencial de la ciudad de México, se alterarán los niveles de expresión del gen y de la proteína XRCC1.

4. Objetivos.

4.1 General.

Evaluar los cambios en la expresión y la localización subcelular de XRCC1 inducidos por la exposición a partículas contaminantes del aire con un diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM₁₀) de una zona residencial de la ciudad de México en una línea celular de carcinoma de pulmón humano A549.

4.2 Particulares.

- Determinar los niveles de RNA mensajero de *XRCC1* por medio de la técnica RT-PCR.
- Medir la expresión de la proteína XRCC1, utilizando la técnica de Western blot y por citometría de flujo.
- Evaluar el daño al DNA (usando como marcador a la histona $\gamma\text{H2A.X}$) por citometría de flujo.
- Determinar la localización celular de la proteína XRCC1 por la técnica de inmunofluorescencia.

5. Material y Métodos.

5.1 Obtención de PM₁₀

Las PM₁₀ se colectaron de una zona residencial al sur de la ciudad de México, cuyo factor más importante es el tránsito vehicular. Para realizar la colecta de las PM₁₀ se usó un muestreador de grandes volúmenes (Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA). Las PM₁₀ se colectaron en filtros de nitrocelulosa con un poros de 3.0 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany), 3 días por semana durante el 2007. Los filtros se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta el momento de recuperar las partículas. Las partículas colectadas se rasparon de los filtros cuidadosamente con una hoja quirúrgica (no. 11) en viales de vidrio libres de endotoxinas. Las partículas se mantuvieron en oscuridad y secas a 4°C hasta su uso (Alfaro-Moreno et al., 2009). Antes de utilizar las PM₁₀ se esterilizaron en una autoclave a 121 °C de temperatura en seco durante 15 minutos.

5.2 Cultivo celular

Para la elaboración de este trabajo se utilizó la línea celular de epitelio alveolar humano A549 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en botellas de 75 cm² (Corning 4306641) con medio de cultivo F-12K suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco 16000-044), dejándolas crecer en una incubadora con una atmósfera de CO₂ al 5 % y una temperatura de 37 °C (Nuair CF autoflow) hasta que llegaron a confluencia.

5.3 Exposición de las células a PM₁₀

Después de que las células alcanzaron un 70 % de confluencia, el medio de cultivo fue removido y se reemplazó por medio de cultivo más una dosis subletal de PM₁₀ (10 µg/cm²) de una zona residencial (ZR) del valle de la Ciudad de México dejándose exponer durante 24

horas en todos los experimentos. La exposición al material particulado se realizó en medio libre de suero, debido a que este contiene compuestos capaces de actuar como quelantes de metales, lo que podría inhibir la generación y el efecto de las ERO (Okeson et al., 2004).

5.4 Extracción de RNA y RT-PCR.

La extracción de RNA se realizó a partir de una placa de cultivo de 6 pozos de células expuestas a PM₁₀, como previamente se mencionó. Se retiró el medio de cultivo por vacío y se agregó 1 mL de Trizol (Gibco BRL, Invitrogen) para lisar las células de manera directa en la caja de cultivo. El lisado se resuspendió varias veces con una micropipeta y se depositó en un tubo de microcentrífuga, incubándose por 5 minutos. Para realizar la separación de la fase acuosa (con el RNA) de la fase orgánica (con las proteínas desnaturalizadas) y el DNA en la interfase, en cada tubo se agregaron 200 µL de cloroformo por cada ml de Trizol y se agitó fuertemente (sin vortex), dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugó a 13,700 g a 4 °C por 15 minutos y se recuperó solamente la fase acuosa.

El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con 500 µL de isopropanol a 4 °C y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Al término, se centrifugó a 13,700 g por 15 min. El sobrenadante fue eliminado y el RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75 % a 4 °C mezclándose perfectamente con el vortex y se centrifugó ahora a 5,000 g por 7 minutos. La pastilla se secó con vacío dejándola reposar de 10 a 15 minutos y finalmente se resuspendió en 40 µL de agua tratada con dietil -pirocarbonato (DEPC).

Las muestras de RNA se cuantificaron en un nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Para corroborar la integridad del RNA, se tomó una muestra de 1 µg de RNA total y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en amortiguador TBE (tris-HCl 0.89 M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 25 mM) teñido con bromuro de etidio.

Las muestras de RNA fueron utilizadas para realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA) utilizando kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen), con los oligos específicos para XRCC1:

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Tm (°C)	Tamaño (PB) del fragmento
<i>XRCC1</i>	Cadena sentido (SE): 5_-GTATGCAGGCTCCACGGATGAGAA-3	60	359
	Cadena anti-sentido (AS): 5_-AGGCTTGCGGCACCACCCCATAGAGC-3		

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL, para ello se agregaron 12.5 µL de la mezcla de reacción, 0.5 µL del iniciador sentido 10 µM, 0.5µL del iniciador anti-sentido 10 µM, 25 ng de RNA y 0.5 µL de RT/Taq. El cDNA se sintetizó bajo los siguientes ciclos:

- Un primer ciclo con una etapa de 55 °C y una segunda de 30 min a 94 °C por 1 minuto para la síntesis del cDNA y una pre-desnaturalización.
- 35 ciclos con una etapa de 94 °C por 45 seg, otra etapa de 60 °C (Tm de XRCC1) por 1 min y una tercera etapa de 72 °C por 2 min para la amplificación del PCR.
- Un ciclo con una única etapa de 10 minutos a 72 °C para la extensión final.

El cDNA obtenido del RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) (SIGMA) en amortiguador TBS a 100 volts durante 1:30 hora.

5.5 Inmunodetección de XRCC1 por ensayo de Western blot.

Para medir los niveles de expresión de la proteína se llevó a cabo un ensayo de Western blot. Las células fueron primero cultivadas en placas de 6 pozos, agregando por cada pozo un total de 5.75×10^5 células y se dejaron crecer en medio F12-K y SFB. Una vez que las células llegaron a confluencia del 70 %, se removió el medio y se reemplazó por medio F12-K libre de SFB con las PM₁₀ resuspendidas (10 µg/cm²) y se dejaron incubar por 24 horas (5 % de CO₂ y a 37 °C). Una vez terminado el tiempo de exposición se realizó un lisado total de las células por medio del buffer de lisis (20 mM Tris, 1 % NP-40 y 150 mM NaCl, pH8.0 y un cocktail de inhibidores de proteasas), las células se centrifugaron 5 minutos a 16,000 g. y el

sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20 °C hasta el momento de su uso. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Ácido Bicinconínico, y se usó albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de proteína de concentración conocida.

La electroforesis fue realizada en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % y se cargaron 25 µg de proteína por cada carril y se separaron por 1:30 hora a 160 volts. Posteriormente las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham RPN30D) por medio de una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Trans-Blot SD) con amortiguador de transferencia (Tris 2 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %, pH 8.3), durante 90 minutos a 12 volts. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma p-7170) para verificar la transferencia y similitud de carga entre los diferentes carriles. La membrana fue bloqueada 1 h con agitación en leche descremada al 5% (Nestle Svelty) y BSA al 5 % en TBS-Tween al 0.05 %, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo a proteínas. La membrana se incubó con el anticuerpo primario contra XRCC1 (monoclonal anti-ratón, ab 1838-205, marca ABCAM) a una dilución 1:500 en amortiguador de bloqueo y se mantuvo en refrigeración a 4 °C con agitación suave una noche. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó cuatro veces con PBS-Tritrón X-100 al 0.3 % y ahora se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1:2000 en el amortiguador de bloqueo. El revelado de la inmunoreacción se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Immobilon Western (MILLIPORE, Num.Cat.WBKL S0100) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Como control interno de carga se empleó actina, para lo que se utilizó el anticuerpo primario contra actina (anticuerpo monoclonal, donado por el Dr. Manuel Hernández, Cinvestav-IPN), a una dilución 1:1000 y una dilución 1:3000 para el anticuerpo secundario (Anti-ratón) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Las condiciones de incubación y de revelado fueron las mismas descritas anteriormente.

5.6 Daño a DNA evaluado por citometría de flujo.

Para la evaluación de apoptosis, daño al DNA y proliferación celular se utilizó el siguiente kit (Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit de BD Biosciences, Num.Cat. 562253) y se siguieron las especificaciones del distribuidor para ser evaluado por citometría de flujo. Primero las células A549 se sembraron en placas de seis pozos (5.5×10^5 células) y se dejaron crecer por 24 h a una confluencia del 70 %. Las células se expusieron a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} durante 24 horas; terminado el tiempo de exposición se les agregó $10 \mu\text{L}$ de bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) a una concentración de $10 \mu\text{M}$ y se dejaron incubar durante 1 hora a 37°C lo que permitió la correcta incorporación del BrdU al DNA de las células. Terminado el tiempo, se recuperaron las células que se encontraban en suspensión así como también las células que se encontraban adheridas a la caja y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células se fijaron durante 30 minutos con la solución BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization. Inmediatamente después, las células se permeabilizaron durante 10 minutos y se fijaron nuevamente. Las células fueron incubadas con la DNasa durante 1 hora a 37°C . Pasado el tiempo las células se incubaron con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Volumen de anticuerpo utilizado*
PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-BrdU	5 μl
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti- $\gamma\text{H2A.X}$	3 μl
PE Mouse Anti-Cleaved PARP (Asp214)	5 μl
XRCC1	5 μl

* De acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos se incubaron durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Transcurrido el tiempo las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario fluorocromo de isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución 1:1500, durante 30 minutos; esto se realizó para marcar a la proteína XRCC1 (monoclonal anti-ratón, ab 1838-205, marca ABCAM). Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron y resuspendieron en 1 mL de amortiguador de tinción. La lectura se realizó con el citómetro de flujo (BD FACSCanto™ II) con un estándar de 10,000 eventos por cada muestra con el programa FACSDiva Version 6.1.3. para Windows.

5.7 Formación de focos de daño-reparación del DNA por inmunofluorescencia (doble tinción).

Con la finalidad de observar la localización celular de XRCC1 y su capacidad para formar focos de daño-reparación del DNA se utilizó la técnica de doble tinción para detectar por inmunofluorescencia, usando a γ H2A.X como marcador de estos focos. Para ello las células A549 se sembraron en cámaras de 8 pozos (2.5×10^4 de células por pozo de 0.7 cm^2) dejándolas crecer durante 24 horas. Una vez que las células llegaron a confluencia del 70-80% se procedió a retirar el medio de cultivo y se reemplazó por medio de cultivo F-12K libre de SFB y se le agregó $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} y se incubaron durante 24 horas. Terminado el tiempo de exposición, el medio con PM_{10} fue retirado y las células se lavaron una vez con PBS estéril y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a 37°C . Una vez fijadas, las células se lavaron una vez con TBS y se permeabilizaron con metanol frío durante 10 minutos a -20°C . Pasado el tiempo las células fueron lavadas tres veces con TBS durante 5 minutos y luego tratadas con borohidruro de sodio (NaBH_4) durante 5 minutos a temperatura ambiente, esto para disminuir la auto-flourescencia de las células. Después las células fueron nuevamente lavadas tres veces con TBS durante 5 minutos e inmediatamente se bloquearon con suero de caballo al 10 % y albumina al 1 % durante 2 horas con agitación constante a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo las células se lavaron dos veces con TBS y se incubaron con el anticuerpo primario contra H2A.X fosforilada (S139) (Policlonal anti-conejo, Num. cat. 07-164, marca Millipore) a una dilución 1:250 en BSA al 1%, incubándose toda la noche a 4°C y en agitación; terminado el tiempo de la incubación las

células se lavaron tres veces por 5 minutos con TBS-Tritón X-100 al 0.1 % (TBS-TX) en agitación. Posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo secundario, el cual tiene acoplado el fluorocromo tetrametil rodamina (TRITC) (Policlonal anti-conejo, Num. cat. 111-295-144, marca Jackson immunoresearch), a una dilución 1:400 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y en condiciones de poca luz. Posteriormente las células fueron lavadas nuevamente tres veces por 5 minutos con TBS-Triton X-100 y se incubaron con el anticuerpo primario contra XRCC1 (monoclonal anti-ratón, ab 1838-205, marca ABCAM) a una dilución de 1:250 en BSA 1 %, incubándose toda la noche a 4 °C, en agitación y protegido de la luz (segundo marcaje). Terminado el tiempo de incubación las células se lavaron tres veces por 5 minutos con TBS-TX e incubadas con el anticuerpo secundario, el cual tiene acoplado un fluorocromo de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Policlonal anti-ratón, num cat. 115-096-146, marca Jackson immunoresearch), a una dilución 1:2000 durante 1 horas a temperatura ambiente en agitación y en condiciones de poca luz. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se volvieron a lavar con TBS y fijaron con el medio de montaje (ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI) con DAPI.

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia vertical Axio Imager.D2 (Axion_cam MRm Carl Zeiss) con el objetivo 100x y las imágenes se obtuvieron por medio del programa de computadora ZEN lite para Windows versión de 64-bits. El análisis densitométrico de las fotografías se realizó con el programa de computadora de análisis de imagen ImageJ v 1.48b.

5.8 Análisis estadístico.

Los datos se expresan como promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes y el análisis estadístico se obtuvo con una prueba de “*t* de Student”. Se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como significativo. Los análisis estadísticos y gráficos de los datos se realizaron con el programa Prisma 5 para Windows Versión 5.

6. Resultados

6.1 Evaluación de los niveles de la expresión génica de **XRCC1** en células expuestas a material particulado

Se realizó un ensayo de RT-PCR con el fin de observar si se presentaban cambios en los niveles de RNA mensajero del gen *XRCC1* en células expuestas a una dosis subletal de PM_{10} de una zona residencial. Los resultados mostraron que tanto células sin exponer como células tratadas con PM_{10} expresan al gen de *XRCC1*. Por otro lado, la expresión aumentó significativamente en un 17 % más en aquellas células tratadas con partículas en comparación de las células sin exponer ($p < 0.05$) (**Fig. 8**). Estos resultados demuestran que las PM_{10} indujeron daño a DNA y que las células reconocen este daño, lo que sugiere la activación de la vía DDR y la vía de reparación de BER.

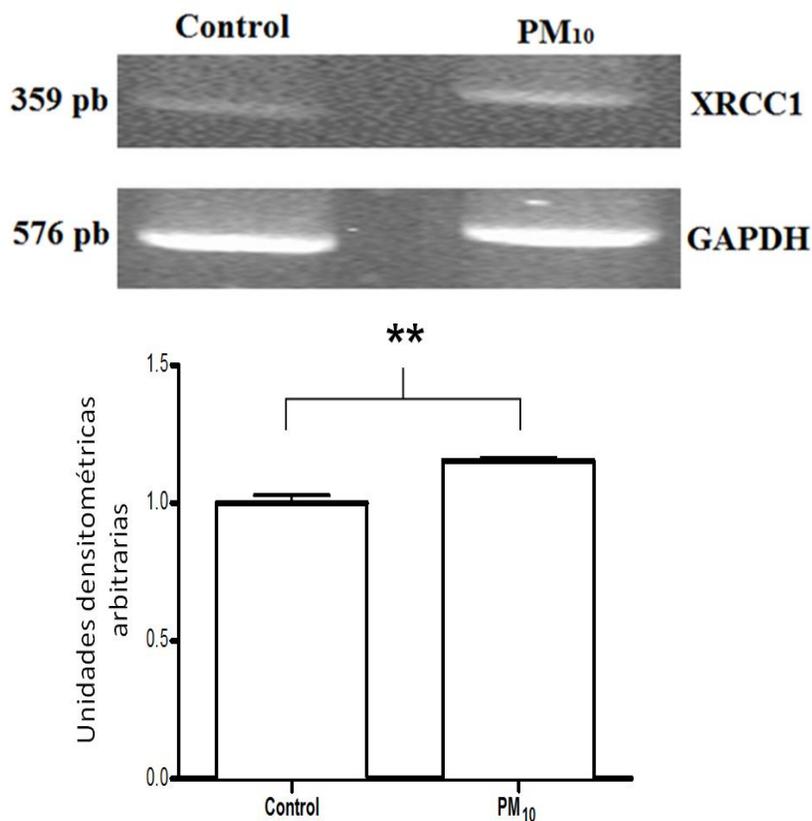


Figura 8.- Expresión génica de *XRCCI* de células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una zona residencial. Se observó un incremento del 17 % en los niveles de expresión génica de *XRCCI* en las células expuestas al material particulado durante 24 horas, respecto al control de células sin exponer. Resultados representativos de 4 experimentos independientes (** $p < 0.001$).

6.2 Análisis de la expresión de la proteína *XRCCI* en células expuestas a PM_{10}

Para observar si los niveles en la cantidad de *XRCCI* coincidían con los niveles de expresión del gen *XRCCI* se utilizó la técnica de Western blot. Contrario a lo observado en la expresión del gen, la cantidad de proteína *XRCCI* disminuyó 22 % respecto a las células que no fueron expuestas a las PM_{10} (Fig. 9).

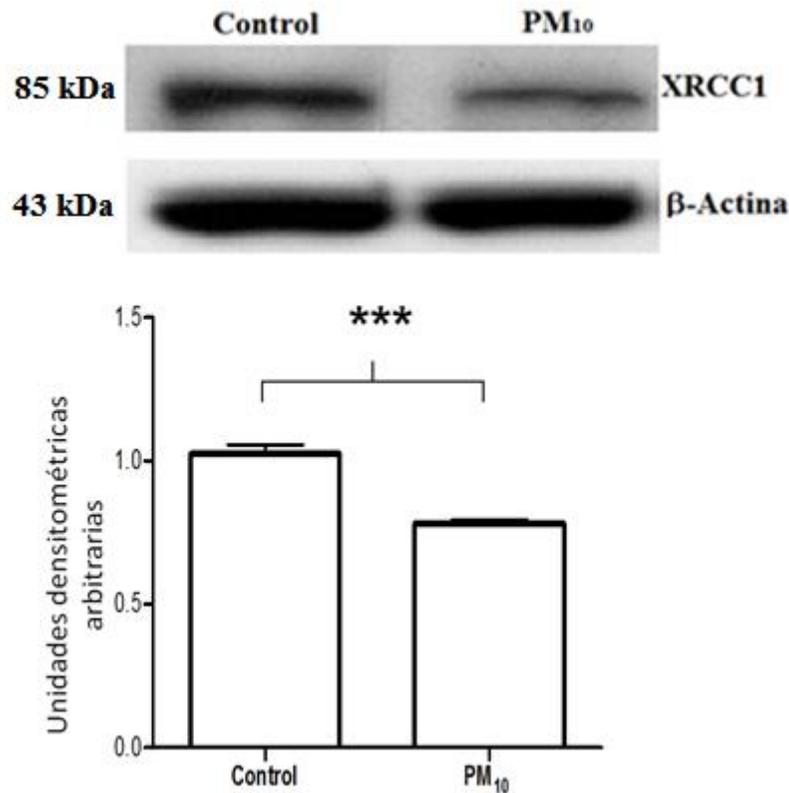


Figura 9.- Niveles de expresión de *XRCCI* en células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una zona residencial. Niveles de expresión de la proteína *XRCCI* evaluada por la técnica de Western blot. Se demuestra una disminución del 22 % a nivel de expresión proteica de *XRCCI* en las células tratadas con PM_{10} de una zona

residencial respecto a las células sin exponer. Se realizó un análisis densitométrico y el resultado obtenido es el promedio de 4 experimentos independientes (**p<0.0005).

6.3 Niveles de proliferación, daño y muerte en células expuestas a PM₁₀

Debido a que se observaron cambios en el mRNA, así como de la proteína de XRCC1, se determinó si las PM₁₀ inducen alteraciones en la proliferación y muerte celular. Para determinar los niveles de proliferación y muerte celular por citometría de flujo, se utilizaron los marcadores BrdU y PARP, respectivamente. Se utilizó a γ H2A.X como un marcador para evaluar los niveles de daño al DNA producido por las PM₁₀ en las células (**Fig. 10**).

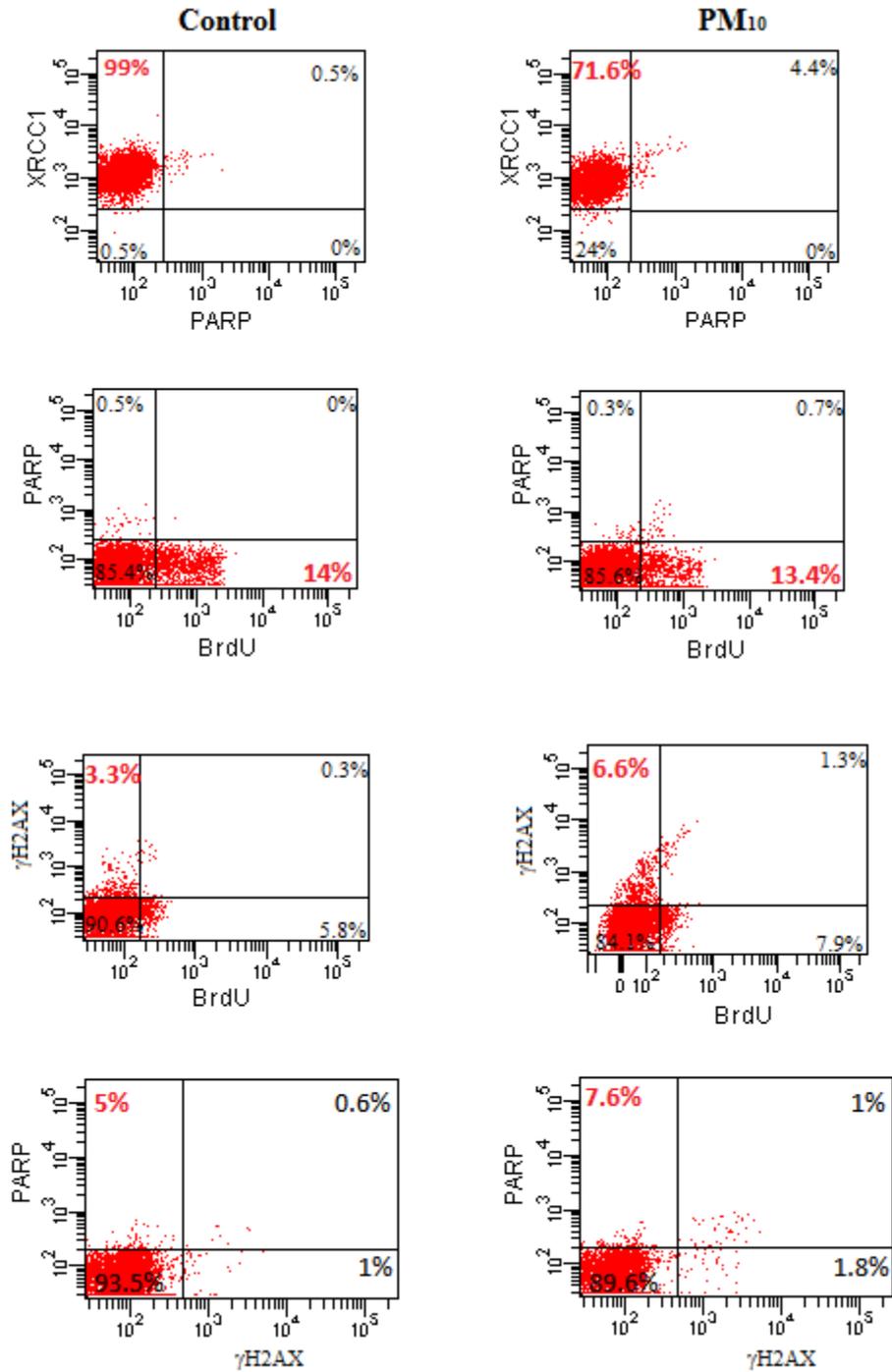
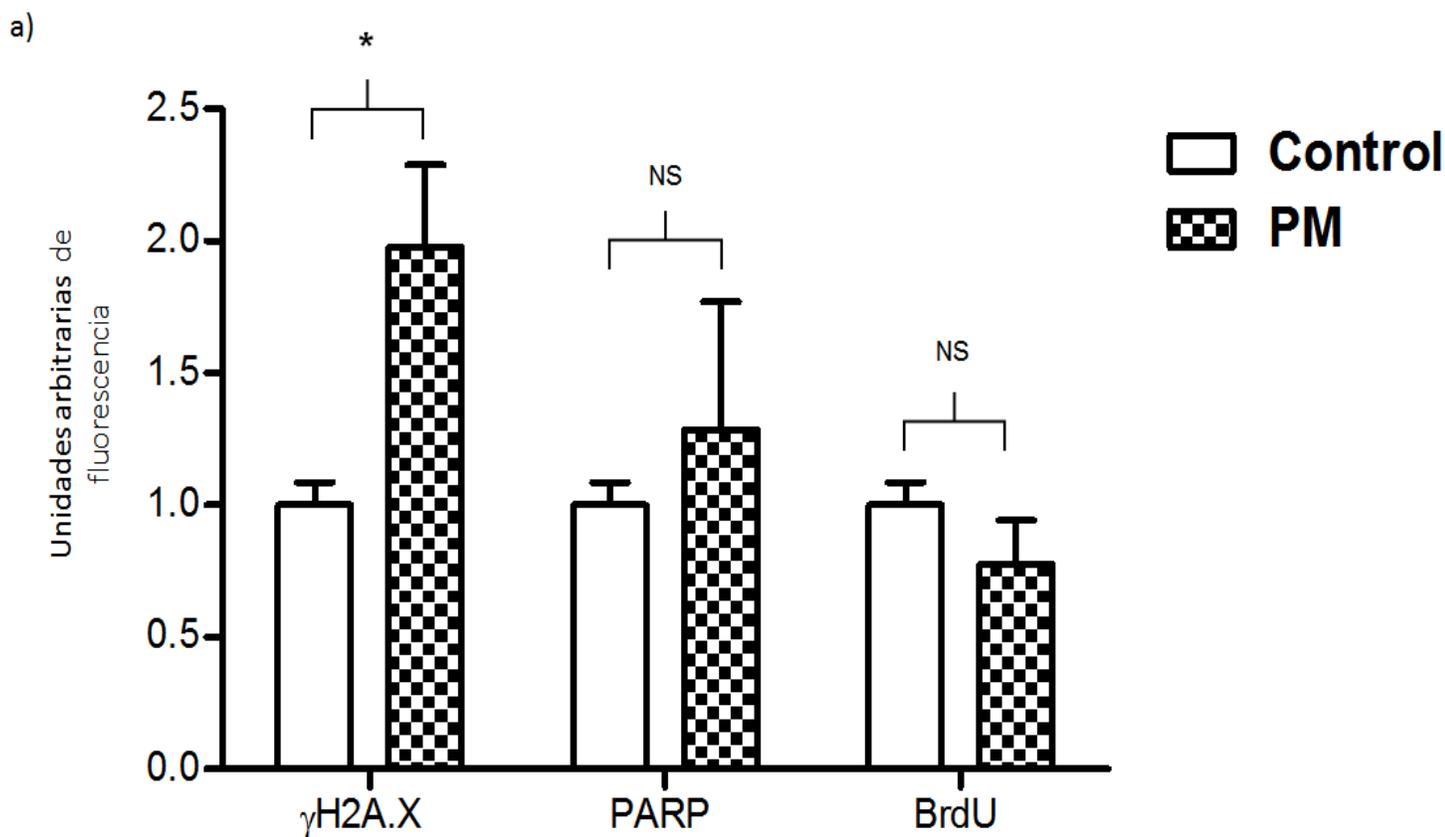


Figura 10.- Evaluación de apoptosis, proliferación y daño en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de una zona residencial. DotPlot del análisis densitométrico de los niveles de apoptosis (PARP), proliferación celular (BrdU), daño al DNA ($\gamma\text{H2A.X}$) y expresión de XRCC1.

Los resultados obtenidos mostraron que las PM₁₀ de una zona residencial produjeron un incremento del doble en los niveles de γ H2A.X, indicándonos que las PM₁₀ ocasionan daño a la doble cadenas del DNA. Sin embargo no producen cambios significativos en los niveles de proliferación y muerte celular (**Figura 11a**). Al igual que en los resultados obtenidos por Western blot, los niveles de XRCC1 disminuyeron en las células expuestas a PM₁₀ (**Figura 11b**), por lo que se puede asegurar que los componentes del material particulado no solo causan daño a nivel de DNA, sino que también provocan una desregulación en los niveles de expresión de esta proteína involucrada en la reparación de bases del DNA. Al no presentarse muerte y las células al seguir en un estado proliferativo, los errores producidos por la desregulación de esta proteína será transmitidas a las siguientes generaciones de células, lo que ocasionará la acumulación de errores y el desarrollo de un proceso carcinogénico.



b)

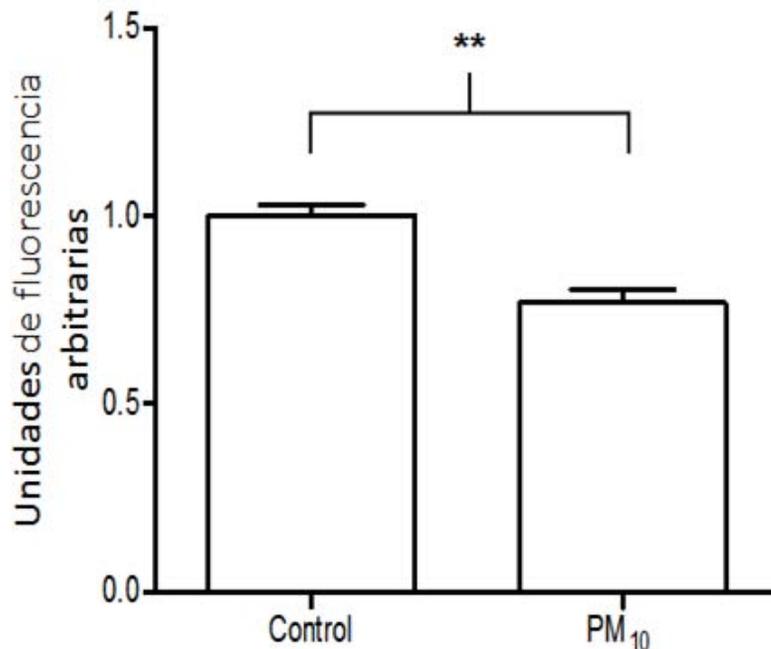
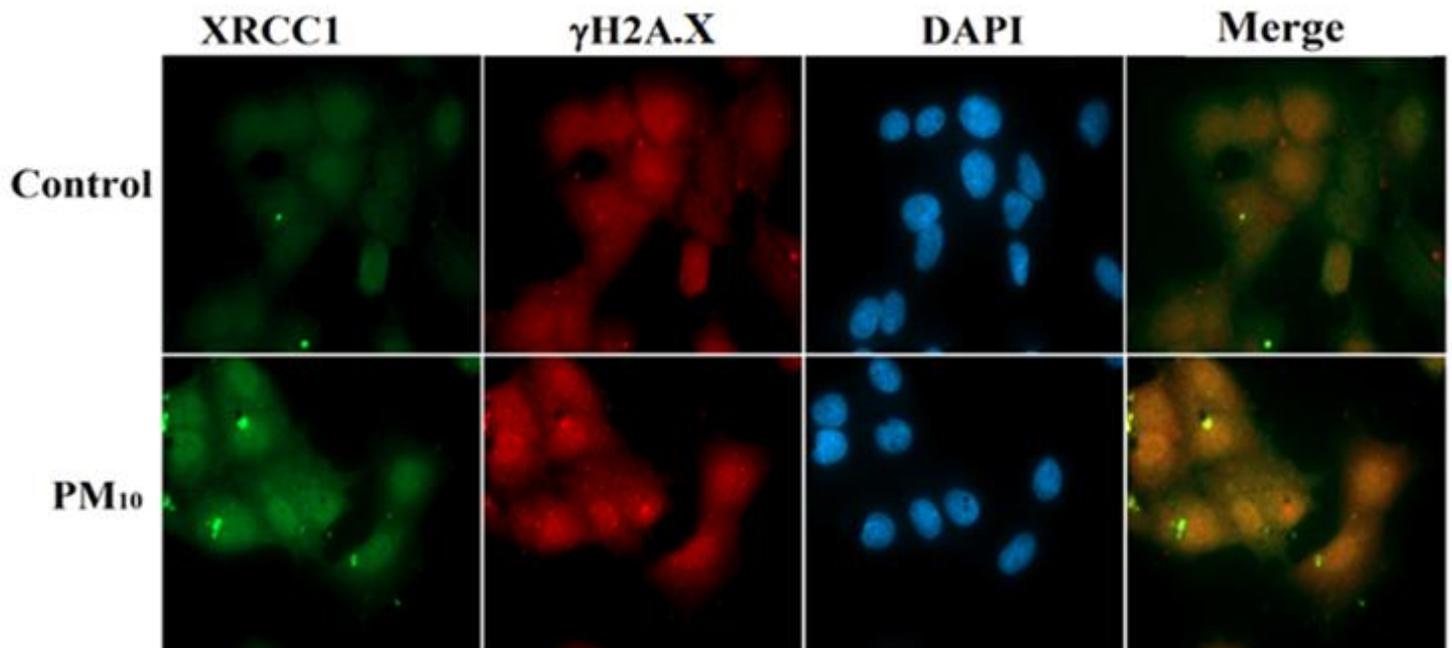


Figura 11.- Evaluación de apoptosis, proliferación y daño en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ de una zona residencial. (a) Los resultados obtenidos por citometría de flujo arrojan que la exposición a una dosis subletal de PM₁₀ (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) produce un incremento en los niveles de DNA dañado debido al aumento de $\gamma\text{H2A.X}$ (dos veces más la expresión respecto al control), lo que indica que las PM₁₀ provocan la rotura de la cadena del DNA. Por otro lado no se registraron cambios significativos en los niveles de proliferación (BrdU) y muerte celular (PARP). Resultado representativo de 4 experimentos independientes. * $p < 0.005$ Control vs PM₁₀ en la expresión de $\gamma\text{H2A.X}$. **(b)** Por citometría de flujo detectamos una disminución del 24 % en los niveles de expresión de XRCC1, lo que corroboró lo observado en el Western blot. Resultados representativos de 3 experimentos independientes (** $p < 0.001$).

6.4 Localización celular de XRCC1 y formación de focos de daño al DNA en células tratadas con PM₁₀

Debido a que la expresión de XRCC1 se ve disminuida, quisimos ver la localización de la proteína. Para ello se realizaron inmunofluorescencias contra XRCC1 para determinar la localización de esta proteína en las células tratadas con PM₁₀, al mismo tiempo se realizó una doble tinción marcando a la proteína histona de reparación γ H2A.X con un fluorocromos diferente, lo que sirvió como marcador de los sitios de DNA dañado (**Fig. 12a**). Los resultados demostraron una mayor abundancia de la proteína XRCC1 (36%) y γ H2A.X (32%) en el núcleo de las células, las cuales se encuentran formando focos de daño (respuesta ante el daño al DNA). Las células sin exponer presentan niveles basales de γ H2A.X, por otro lado, las células expuestas a las PM₁₀ presentaron un incremento en la formación de sitios de daño al DNA, por lo que es posible observar un mayor número de focos de daño en las células tratadas en comparación con las no tratadas.

a)



b)

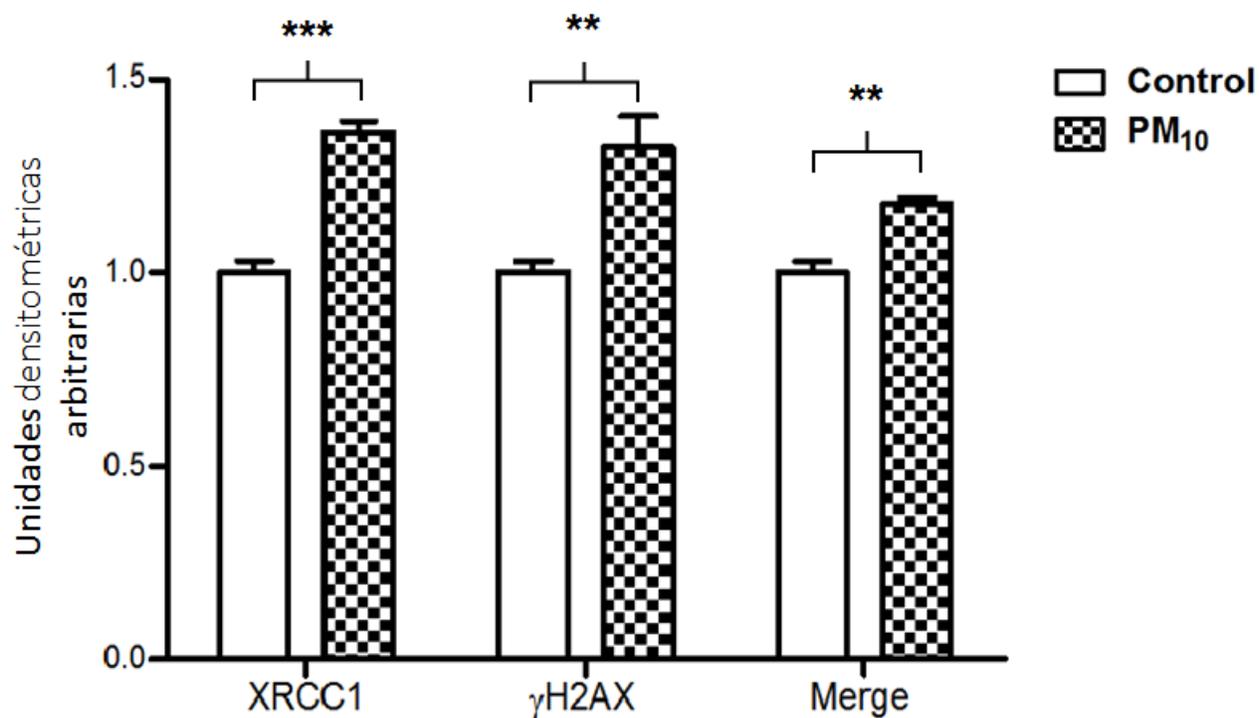


Figura 12.- Localización celular de XRCC1 y formación de focos de daño en células A549 expuestas a 10µg/cm² de PM₁₀ de una zona residencial. (a) La proteína γH2A.X se marcó con Isotiocinato de fluoresceína (FITC), mientras que la proteína XRCC1, se marcó con tetrametil rodamina (TRITC) y los núcleos, con DAPI. **(b)** El análisis cuantitativo de la expresión de las proteínas se realizó mediante densitometría y se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de fluorescencia tomadas en un microscopio para epifluorescencia, con una amplificación de 1000. Las imágenes representan tres experimentos independientes. ***p<0.0005 Control vs XRCC1; **p<0.001 Control vs γH2A.X; **p<0.001 Control vs Merge.

7. Discusión

El crecimiento demográfico y poblacional de la Ciudad de México ha favorecido el establecimiento de industrias y el incremento de tráfico vehicular, lo que ha ocasionado un deterioro en la calidad del aire. En los últimos años, estudios epidemiológicos han confirmado la asociación entre el incremento del material particulado, un contaminante atmosférico, y el aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, respiratorias y cáncer de pulmón (Pope et al., 2006). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos que conllevan a esta asociación, se ha identificado que los componentes de las PM_{10} y $PM_{2.5}$ tales como los metales, las endotoxinas y los HAPs juegan un papel primordial en el desarrollo de diversas patologías a nivel pulmonar, debido a que han sido relacionadas con procesos inflamatorios, lo que puede desencadenar enfermedades como el asma y la bronquitis crónica (Nel, 2005). Se ha identificado que algunos componentes de las PM_{10} son capaces de generar cambios en la estructura del DNA, principalmente por la oxidación de las bases y la generación de sitios abásicos. También se les ha atribuido la capacidad de producir aductos en el DNA y la generación de mutaciones puntuales en la cadena doble o sencilla del DNA, lo que resulta en inestabilidad genética y cromosómica (Traversi et al., 2015). Este efecto provoca una desregulación en los procesos normales de la célula y favorece de manera importante a la carcinogénesis, principalmente a nivel pulmonar. Las PM_{10} también tienen la capacidad de producir alteraciones en los sistemas de reparación del DNA por la vía de NER (Mehta et al, 2008) y de BER (Morales-Bárceñas, datos no publicados). Como se mencionó, el objetivo del proyecto fue registrar posibles alteraciones en XRCC1, una proteína que pertenece al sistema de reparación de BER, producido por las PM_{10} de una zona residencial de la Ciudad de México. Debido a que XRCC1 es una de las primeras proteínas en activarse en el sistema de reparación por BER; así como por su función de proteína de anclaje y la formación de complejos con otras proteínas, la hacen una proteína primordial en la vía de reparación ante los daños por pérdida o alteración de una base nitrogenada o por la ruptura de una de las cadenas del DNA (lesiones más frecuentes en el DNA producidos por la oxidación de las bases y la radiación ionizante). Aunque no se han identificado mutaciones para XRCC1 se ha observado que la alteración en su función originan inestabilidad

genómica, un fenotipo de letalidad embrionaria, y la producción de polimorfismos se han correlacionado con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer y presentar ciertos tipos de síndromes, como el síndrome de Cockayne (Thacker et al., 2003).

Los resultados de Morales Bárcenas en nuestro laboratorio (datos sin publicar), muestran que la exposición a una dosis sub-letal (utilizada en este trabajo) de PM₁₀ de una zona urbana comercial y una zona industrial, producen una disminución significativa en los niveles de RNAm de las enzimas de reparación hOGG1, hMTH1 y hMLH1 involucradas en el sistema de reparación de BER y MMR, respectivamente. Estos datos sugieren que las PM₁₀ reducen la capacidad de reparación del DNA, en sinergia con los agentes exógenos y los metabolitos endógenos, eventos que pueden potenciar la carcinogénesis. Para profundizar en el conocimiento sobre si las PM₁₀ pudieran alterar los mecanismo de reparación al daño al DNA, se propuso este proyecto, en el cual se seleccionó evaluar el estado de expresión y localización subcelular de la proteína XRCC1, no solo por ser una de las primeras proteínas en participar en la vía de reparación por BER, sino porque también es una proteína involucrada en la reparación en la rotura de la doble cadenas del DNA, lesiones producidas por los componentes de las PM₁₀. Además este trabajo tenía como objetivo el relacionar los cambios observados en los niveles de daño al DNA, proliferación y muerte celular en células expuestas a una dosis sub-letal de PM₁₀ provenientes de una zona urbano residencial (zona sur) de la Ciudad de México.

Como primer abordaje se midieron los niveles de RNA mensajero del gen *XRCC1* en células expuestas a PM₁₀. Los resultados obtenidos demuestran que los niveles del RNAm de *XRCC1* se incrementaron en un 17 % respecto a las células sin tratar, lo que indica que las células reconocen de manera adecuada el daño producido por los componentes de las PM₁₀. El incremento de los niveles del mensajero del gen *XRCC1* se presenta cuando las células se encuentran bajo ataques de agentes endógenos y exógenos (Yanagisawaa et al., 1998; Fang-Kircher et al., 1999), como los radicales libres producidos por las ERO derivadas de la exposición prolongada hacia los compuestos tanto orgánicos como inorgánicos contenidos en las PM. Sin embargo, contrario a nuestros resultados, otros trabajos han mostrado que los niveles de expresión del gen *XRCC1* no se ven alterados cuando las células son expuestas a nano-partículas, tales como las nano-partículas de plata, capaces de regular de manera

positiva la expresión de genes involucrados en la vía DDR (*ATM*, *ATR* y *XPA*), así como producir una desregulación de genes involucrados en la vía de reparación de BER (*Mbd4*, *Apex1*, *OGG1* y *Mutyh*) como también en la vía de reparación MMR (*Mutyh*, *Abl1*, *Pms1* y *MSH2*) (AshaRani et al., 2012). Sin embargo, nosotros consideramos que la mezcla compleja puede sinergizar el efecto de los diferentes componentes de las PM y de esta manera incrementar el mensajero de *XRCC1*. Se ha registrado también que la exposición a $PM_{2.5}$, produce una pequeña, pero no significativa, modulación en los niveles de expresión del gen *XRCC1*. Por otro lado, se ha reportado que la exposición a esta fracción de material particulado provoca una reparación deficiente por parte de la proteína *XRCC1*, lo que resulta en una respuesta inflamatoria y en el arresto del ciclo celular (Traversi et al., 2015).

Se ha reportado que la proteína E2F1, la cual es crucial en el control del ciclo celular y en la función de las proteínas supresoras de tumores, es capaz de promover la reparación del DNA por medio de la activación de los sistemas de reparación de BER y el sistema de reparación de un solo nucleótido (Chen et al., 2008). Este efecto es producido debido a que E2F1 se ha identificado como una proteína inducible por daño y un regulador en la expresión de diferentes genes, entre los cuales se encuentran los implicados en la síntesis de proteínas que participan en la reparación del DNA, como *XRCC1*. Resultados han demostrado que E2F1 incrementa los niveles de expresión de *XRCC1* a través de la vía de respuesta ante el daño del DNA; además de que esta regulación promueve también la progresión del ciclo celular y subsecuentemente la proliferación (Chen et al., 2008). Entre los diferentes co-activadores que tiene la proteína E2F1, podemos identificar al receptor de aril hidrocarburos (AhR) como uno de sus principales activadores en las células. Se ha demostrado que los niveles transcripcionales de E2F1 se ven incrementados de manera dependiente a la actividad del receptor AhR y que esta interacción además promueve la proliferación celular (Watabe et al., 2010).

Otra de las maneras en que E2F1 promueve la transcripción de *XRCC1* es a través de la vía de señalización MAPK, la cual es activada por las proteínas PKC, Raf, MEK y ERK (Pintus et al., 2003). Nuestro grupo de trabajo reportó que la proteína ERK se encuentra activada 24 horas después de la exposición a PM_{10} (). Por lo anterior, sugerimos que el incremento en los niveles de transcripción del gen *XRCC1* observados en este trabajo, pudieran estar produciéndose a través de esta vía de señalización.

En este trabajo se reporta que las PM_{10} reducen entre un 22-24% los niveles de detectables de la proteína XRCC1, lo que podría alterar las dos vías por lo que se lleva a cabo el mecanismo de reparación por BER.

En este trabajo observamos una disminución en la cantidad de la proteína XRCC1 pero al mismo tiempo registramos un aumento en la expresión de su RNA mensajero correspondiente. Se ha reportado que existe una correlación entre la concentración de proteína y la abundancia de RNA mensajero, sin embargo en los últimos años se ha encontrado que no siempre se produce esta relación. Existen diversos procesos entre la transcripción y la traducción, así como también factores (como la estabilidad o tiempo de síntesis de la proteína), que pudieran alterar esta relación. Se ha sugerido que en las células procariontes y eucariontes puede incluso presentarse una correlación de ~40% dependiendo del sistema, por lo que se ha propuesto que la abundancia relativa de proteína puede o no ocurrir dependiendo de la proporción de sus niveles relativos de RNA mensajero (Vogel y Macotte, 2012). Por lo anterior, es posible pensar que el efecto observado se produce por lo ya mencionado.

Actualmente no se han reportado mutaciones asociadas a XRCC1, sin embargo, su expresión puede verse afectada por otros mecanismos, tales como la interacción con otras proteínas así como su degradación a través de la vía proteosómica.

Se conoce que la función de XRCC1 se encuentra relacionada con la activación y función de otras proteínas involucradas en el sistema de reparación por BER. Una de estas proteínas es la DNA Ligasa III, la cual al interactuar con el dominio BRCT2 de XRCC1 cataliza la formación de un enlace fosfodiéster en el grupo 3'-hidroxilo (3'-OH) del nucleótido recién sintetizado y la región 5'-fosfato de la cadena del DNA. Esta interacción se requiere para mantener los niveles de expresión de la ligasa del DNA en un estado normal e incrementar la eficiencia catalítica en la reacción de unión. Sin embargo, cuando se produce la ausencia del complejo XRCC1/DNA Ligasa III, la unión de los nucleótidos sintetizados se presenta de manera defectuosa (Caldecott et al., 1994). El funcionamiento del complejo proteico también depende de los dedos de zinc de la DNA Ligasa III, ya que estos permiten la unión del complejo XRCC1/DNA Ligasa III con PARP-1 lo que permite al complejo y otros factores de reparación el localizar los sitios donde se encuentra rota la cadena del DNA

(Leppard et al., 2003). Se ha reportado que algunos metales (como zinc, plomo, vanadio, cobre, magnesio, níquel, cromo y silicio) pueden oxidar los grupos tiol que se encuentran en los dominios de dedos de zinc y por medio de este efecto inhibir la expresión de proteínas, como por ejemplo la DNA Ligasa III y la Poli (ADP-Ribosa) polimerasas (PARP). Este efecto se ha visto en la proteína Xeroderma Pigmentosum tipo A (XPA), la cual es esencial en el reconocimiento del daño al DNA por la vía de NER, en donde al exponer células a altas concentraciones de cadmio se ve disminuida su capacidad de unión al sitio dañado en el DNA (Asmuss et al., 2000).

La proteína PARP interacciona con la proteína XRCC1 en su dominio BRCT1 y su función ha sido reconocida como un sensor de corte que se une a la secuencia del DNA dañada para dar inicio a al sistema de reparación de BER; además también se le ha atribuido la función de reclutar a XRCC1 en los sitios de daño. Después de la activación de PARP, la proteína XRCC1 se comienza a acumular en los sitios Poli (ADP-Ribosa) (pAR). No obstante, pAR comienza a degradarse por la poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) inmediatamente después de su producción. Seguido de la degradación de pAR, XRCC1 comienza a reclutar los componentes enzimáticos para llevar a cabo la reparación del DNA. Está reportado que si no se produce la degradación de pAR, la mayor parte de las moléculas del complejo XRCC1/DNA Ligasa III acumuladas no son capaces de disociarse de pAR por lo que el complejo no sería capaz de acercarse al sitio donde se presenta la rotura en el DNA, para unir el nucleótido sintetizado (Leizhen Wei et al., 2013). Al igual que la DNA Ligasa III, la proteína PARP también presenta dos estructuras de dedos de zinc las cuales le ayudan a acoplarse al DNA, y al verse expuestas a cierto metales, tales como: níquel, cobalto, cadmio, cobre y arsénico pudieran afectar su función, este efecto ha sido reportado tanto en células HeLa como en linfocitos T (Hartwig et al., 2002). En nuestro modelo los resultados obtenido por citometría de flujo reveló que no hubo cambios significativos en los niveles de expresión de PARP por el tratamiento, sin embargo, dado a que no medimos la actividad de esta proteína, podría ser que el tratamiento con PM₁₀ pudiera estar afectando la actividad de PARP y así, indirectamente, afectar la expresión de la proteína XRCC1.

Se ha reportado que la eficacia con que la proteína XRCC1 lleva a cabo el reconocimiento de las lesiones producidas en las bases y la formación de los complejos proteicos, ya sea con

PARP o con la DNA-Ligasa III, está vinculada con la fosforilación que sufre entre los dominios BRCT1 y BRCT2. Esta fosforilación no solo le confiere a la proteína XRCC1 mayor estabilidad al momento de formar los complejos proteicos, sino que también la protege de ser degradada por medio del sistema proteosómico (Parsons et al., 2010, Chou et al., 2008). Se ha reportado que el estrés celular producido por factores ambientales (tales como la exposición a metales o a la radiación ultravioleta) incrementa la actividad proteosómica, lo que ocasiona un aumento en la degradación de diferentes proteínas (Dreger et al. 2009) por lo que pudiera estar degradando a XRCC1 a través de este sistema.

La fosforilación de la proteína XRCC1 es ocasionada mayormente por la proteína quinasa CK2 y se ha reportado que su inhibición conlleva a una reducción en los niveles de XRCC1 fosforilado, lo que resulta en la degradación del complejo XRCC1/DNA Ligasa III por ubiquitinación (Parsons et al., 2010). Por otro lado, se ha visto que esta fosforilación (en el sitio de Thr²⁸⁴) es modulada por la fosforilación que sufre la proteína Chk2 al activarse la vía DDR, para posteriormente dar paso a la activación de la vía de reparación de BER a través de la fosforilación de XRCC1. Experimentos realizados en células mutantes en los sitios de fosforilación Thr²⁸⁴ de XRCC1 y células que presentan Chk2 fosforilada inactivo muestran una disminución en los niveles de expresión de la proteína XRCC1 fosforilada y al mismo tiempo registraron una baja en los niveles de reparación por el sistema de BER (Chouet et al., 2008). Nuestro grupo de trabajo demostró que las PM₁₀ inducen incremento en los niveles totales de la proteína Chk2 en células A549, sin embargo no se observaron cambios en los niveles de la fosforilación de Chk2 comparado con células sin exponer (Sánchez-Pérez et al., 2009). Por lo anterior sugerimos que la disminución en los niveles de expresión de la proteína XRCC1 posiblemente estar relacionada con este mecanismo, de ahí la importancia de medir el estado de fosforilación de la proteína XRCC1.

La fosforilación de la proteína XRCC1 en sus regiones BRCT1 y BRCT2 esta reportada como el principal mecanismo de protección ante su degradación por el sistema proteosómico, por lo que su inhibición resultaría en la disminución en los niveles de expresión. Sin embargo, se han identificado otros mecanismos que favorecen la degradación de esta proteína a través del sistema proteosómico. Se ha reportado que la proteína XRCC1 puede también ser degradada por proteólisis a través de la vía de señalización del adenosín monofosfato cíclico

(cAMP), lo que produce una disminución en la reparación del DNA; sin que se produzcan cambios en los niveles de expresión del mRNA del gen *XRCC1* (Cho et al., 2012). Se ha identificado que el efecto observado de la cAMP sobre los niveles de expresiones de la proteína XRCC1 es mediada por la proteína de intercambio activada directamente por cAMP (Epac-1), la cual regula de manera importante distintos procesos celulares, los cuales incluyen el movimiento de calcio, proliferación celular, supervivencia celular, diferenciación celular, eventos de adhesión célula-célula, secreción, transporte iónico y señalización neuronal (Borland et al., 2009). Otros trabajos demostraron que la exposición a PM puede producir un incremento en los niveles de cAMP en células de pulmón humano, a través de la actividad prolongada del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) el cual también regula el transporte de calcio en las células (Yu et al., 2012).

La función de la proteína XRCC1 no se encuentra regulada solamente por su fosforilación, sino que también puede serlo a través de otras proteínas. Tal es el caso de la proteína JWA, la cual ha sido identificada como una proteína necesaria para una eficiente reparación del DNA ante los daños producidos por el estrés oxidante y en la sobrevivencia celular. Se identificó que la proteína JWA regula la expresión de la proteína XRCC1 tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, por lo que se ha sugerido a JWA como un componente en la vía de BER cuya función es la estabilización de XRCC1. Por ejemplo, en modelos que presentan una inhibición total de JWA se produce una degradación rápida de XRCC1 a través del sistema proteosómico (Wang et al., 2009).

Los niveles de proliferación, muerte y reparación celular que se midieron por medio de la técnica de citometría de flujo, muestran que las células al ser expuestas al material particulado sufren daño en su DNA, principalmente por el corte de la doble cadena, lo que provoca que se disparen procesos de reparación debido a que el porcentaje de células que están expresando a γ H2A.X aumenta el doble respecto al control. Por otro lado, el porcentaje de células que expresan a la proteína XRCC1 disminuye en un 24 %, efecto acompañado con un incremento, pero no significativo, de PARP en células tratadas. Como ya se mencionó anteriormente, la expresión de PARP promueve un efecto negativo en la expresión del complejo XRCC1/Ligasa III al no permitir que se una a los sitios del DNA dañado. En conjunto nuestros resultados sugieren que las células sufren daño en la doble cadena del DNA

(evaluado por la expresión de γ H2A.X) y que las células dañadas posiblemente no se estén reparando de manera adecuada debido a la disminución en la expresión XRCC1 provocado por la exposición de a las PM₁₀, a pesar de que se produce un incremento en el de *XRCC1*; y al no observar cambios significativos en los niveles de proliferación, sugerimos que las PM₁₀ no ocasionan cambios en el ciclo celular. Este resultado sugiere que los componentes tanto orgánicos como inorgánicos de las PM₁₀ están alterando al DNA, principalmente por el rompimiento de la doble cadena del DNA. La célula al reconocer el daño al DNA activa sus diferentes mecanismos de reparación; sin embargo, al encontrarse alterada la expresión de XRCC1 los niveles de reparación por el sistema de BER se verán alterados, lo que resultara en modificaciones en el DNA. Las alteraciones que pudieran presentarse en el mecanismo de reparación por BER y las modificaciones al DNA serán pasadas a la siguiente generación de células debido a que la mayoría aún se encuentran en un estado proliferativo, eventos que en conjunto favorecen a un proceso carcinogénico.

Al analizar la localización de la proteína XRCC1 en las células, se detectó principalmente en el núcleo. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en los que se observa que la proteína XRCC1 se encuentra mayormente en núcleo independientemente si esta fosforilada o no; debido a que la fosforilación de XRCC1 solo se produce en citoplasma (Parsons et al., 2010). Estos resultados sugieren que aunque XRCC1 está en núcleo, al no ser fosforilada (no se evaluó el estado de fosforilación de XRCC1) principalmente por la proteína cinasa CK2, no podría llevar a cabo su función de manera adecuada, aun cuando se encuentran unidas a los sitios de daño. Aun no se sabe con certeza cuál es el efecto biológico de la fosforilación de XRCC1, en especial por la proteína CK2. Sin embargo, se ha sugerido que la fosforilación es requerida para una reparación eficiente del DNA por la oxidación de las bases y la formación de sitios abásicos. Se ha reportado además que al inhibir la proteína CK2 se produce un aumento en los niveles de síntesis de la proteína PARP, lo que indica una acumulación de lesiones no reparadas en la cadena de DNA (Wei et al., 2013).

8. Conclusiones

- La exposición a PM_{10} produce un incremento del 16% en los niveles de expresión de RNAm del gen *XRCC1*. Por otro lado observamos una disminución del 21% en los niveles de expresión de la proteína. Este efecto, podría tener un severo impacto en la reparación del DNA producido por el material particulado, contribuyendo a un mecanismo por el cual se favorezca el proceso carcinogénico.
- La exposición al material particulado indujo un aumento en los niveles de daño al DNA, representado por la rotura de la doble cadena. Por otro lado no se produjo cambios significativos en los niveles de proliferación y muerte celular
- Se observó la formación de focos de daños en el DNA en 32% de células expuestas tratadas, en donde se determinó que existe una co-localización entre la proteína XRCC1 y los sitios de daños representados por el marcaje con $\gamma H2A.X$.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los componentes de las PM_{10} producen daño en el ADN, el cual se encuentra representado por la rotura de la doble cadena; daño que no produce cambios en los niveles de proliferación y muerte celular. El daño que se produce es reconocido por la vía DDR de la célula, lo que provoca la síntesis de las proteínas involucradas en los distintos sistemas de reparación del ADN, como es el caso de XRCC1. Sin embargo, las PM_{10} alteran los niveles de expresión de esta proteína, lo que puede resultar en una reparación deficiente y por ende favorecer un proceso carcinogénico en células pulmonares.

9. Perspectivas

- ❖ Evaluar la eficiencia de la reparación del DNA en las células expuestas a PM₁₀ por medio del ensayo cometa-reparación.
- ❖ Caracterizar el estado de fosforilación de XRCC1, así como el estado de la proteína cinasa CK2 en células expuestas a PM₁₀.
- ❖ Evaluar si la disminución en la expresión de la proteína XRCC1 provoca alteraciones en la interacción y función de otras proteínas involucradas en el mecanismo de reparación por BER, tales como AP1, Pol β , PAPR y la DNA-Ligasa III.

10. Referencias

- Aldaco-Sarvide F, Pérez-Pérez P, Cervantes-Sánchez G, Torrecillas-Torres L y Erazo-Valle A. (2012). Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *GAMO*. **11**: 371 -379.
- Alfaro-Moreno E, Martínez-Romero L, García-Cuellar C, Bonner CJ, Clifford-Murray J, Rosas-Pérez I, Rosales-Sergio P y Osornio-Vargas A. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM₁₀ from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect*. **110**: 715 -720.
- Alfaro-Moreno E, Torres V, Miranda J, Martínez L, García-Cuellar CM, Nawrot S, Tim, Vanaudenaerde Bart, Hoet P, Ramírez-López P, Rosas I, Nemery B y Osornio-Vargas AR. (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**: 528 -535.
- Araújo SJ y Wood RD. (1999). Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutat Res*. **435**: 23 -33.
- Arriaga-Colin JL., West JJ, Sosa G, Escalona SS, Orduñez RM y Cervantes ADM. (2004). Measurements of VOCs IN Mexico City (1992-2001) and evaluation of VOCs and CO in the emissions inventory. *Atmos. Environ*. **38**: 2523 -2533.
- Arrieta O, Campos-Parra AD, Zuloaga C, Avilés A, Sánchez-Reyes R, Manríquez ME, Covián-Molina E, Martínez-Barrera L, Meneses A, Cardona A y Borbolla-Escoboza JR. (2012). Clinical and pathological characteristics, outcome y mutational profiles regarding non-small-cell lung cancer related to wood-smoke exposure. *J Thorac Oncol*. **7**: 1228 -1234.
- AshaRani P, Sethu S, Lim HK, Balaji G, Valiyaveettil S y Hande PM. (2012). Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr*. **3**: 1 -14.
- Asmuss M, Mullenders LF y Hartwig A. (2000). Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicol Lett*. **112-113**: 227 -231.
- Bakkenist CJ y Kastan MB. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. **21**: 499 -506.
- Balásházy I, Hofmann W y Heistracher T. (2003). Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *J. Appl. Physiol*. **94**: 1719 -1725.

- Barnes DE y Lindahl T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet.* **38**: 445 -475.
- Barzilai A y Yamamoto K. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair.* **3**: 1109 -1115.
- Beernink PT, Hwang M, Ramirez M, Murphy MB, Doyle SA y Thelen MP. (2005). Specificity of protein interactions mediated by BRCT domains of the XRCC1 DNA repair protein. *J Biol Chem.* **280**: 30206 -30213.
- Berwick M y Vineis P. (2000). Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an Epidemiologic Review. *J Natl Cancer Inst.* **92**: 874 -897.
- Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S y Loomis D. (1998). Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ Health Perspect.* **106**: 849 -855.
- Borland G, Smith BO y Yarwood SJ. (2009). EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br J Pharmacol.* **158**: 70 -86.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A y Chen DJ. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* **276**: 42462-42467.
- Caldecott KW, McKeown, CK, Tucker JD, Ljungquist S y Thompson LH. (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell Biol.* **14**: 68 -76.
- Caldecott KW. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair.* **2**: 955 -969.
- Chen D, Yu Z, Zhu Z y Lopez CD. (2008). E2F1 regulates the base excision repair gene XRCC1 and promotes DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry.* **283**: 15381 -15389.
- Chirino YI, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas AR, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruiz MC, Segura-García Y, Rosas I, Pedraza-Chaverri J y García-Cuellar CM. (2010). PM₁₀ impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol Lett.* **193**: 209 -216.
- Cho EA y Juhn YS. (2012). The cAMP signaling system inhibits the repair of γ -ray-induced DNA damage by promoting Epac1-mediated proteasomal degradation of XRCC1 protein in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **422**: 256 -262.
- Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH y Cho MH. (2004). Comparative study of PM_{2.5} - and PM₁₀ - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci.* **5**: 11 -18.

- Chou WC, Wang HC, Wong FH, Ding SI, Wu PE, Shieh SY y Shen CY. (2008). Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. *The EMBO Journal*. **27**: 3140 -3150.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP y Kaina B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. **193**: 3-34.
- Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. (2005). Potencial role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect*. **113**: 934 -942.
- Dianova II, Sleeth KM, Allinson SL, Parsons JL, Breslin C, Caldecott KW y Dianov GL. (2004). XRCC1–DNA polymerase β interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic Acids Res*. **32**: 2550 -2555.
- Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jiemenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM y MacNee W. (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic Biol Med*. **34**: 1369 -1382.
- Doran JC, Abbott J, Archuleta J, Bian X, Chow J, Edgerton S, Elliot S, Fernández A, Fast J, Hube JM, King C, Langley D, Leach J, Lee JT, Martín TJ, Martínez D, Martínez JL, Mercado G, Mora V, Mulhearn M, Pena J, Petty R, Porch W, Russell C, Salas R, Shannon J, Shaw W, Sosa G, Tellier L, Templeman B, Watson J, Ehite R, Whiteman C y Wolfe D. (1998). The IMADA-AVER boundary layer experiment in the Mexico City Area. *Bull. Am. Meterological Soc*. **79**: 2497 -2508.
- Dreger H, Westphal K, Weller A, Baumann G, Stangl V, Meiners S y Stangl K. (2009). Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res*. **83**: 354 -361.
- Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, Winkel S, Lunn RM, Tse CK, Eaton A, Mohrenweiser HW, Newman B y Bell DA. (2001). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **10**: 217 -222.
- Englert N. (2004). Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett*. **149**: 235 -242.
- Environment Canada and Health Canada. (2000). Priority substances list assessment report, respirable particulate matter less than or equal to 10 microns”. Canadian Environmental Protection Act, 1999.

- Fan J, Otterlei M, Wong HK, Tomkinson AE y Wilson DM 3rd. (2004). XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2193 -201.
- Fang-Kircher SG, Labudova O, Kitzmueller E, Rink H, Cairns N y Lubec G. (1999). Increased steady state mRNA levels of DNA-repair genes XRCC1, ERCC2 and ERCC3 in brain of patients with down syndrome. *Life Sci.* **64**: 1689 -169.
- Ferlay JI, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C y Parkin DM. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* **127**: 2893 -2917.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME y Glickman BW. (2000). Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis.* **21**: 1977 -1981.
- García-Cuellar CM, Alfaro-Moreno E, Martínez-Romero F, s. Ponce de León Rosales S, Rosas I, Pérez Cárdenas E y Osornio-Vargas AR. (2002). DNA Damage induced by PM10 from different zones of Mexico City. *British Occupational Hygiene Sociesty.* **46**: 425 -428.
- Goode EL, Ulrich CM y Potter JD (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11**: 1513 -1530 p.
- Hang B. (2007). Base Excision Repair, in Wei Q. LL, and Chen D., (ed): DNA repair, genetic instability and cáncer. London, World Science. 23 -24 p.
- Harper JW y Elledge SJ. (2004). The DNA damage response: ten years after. *Cell Press.* **28**: 739 -745.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T y Bürkle A. (2002). Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect.* **110**: 797 -799.
- Hoeijmakers HJ. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* **411**: 366 -374.
- Ichinose T, Yajima Y, Nagashima M, Takenoshita S, Nagamachi Y y Sagai M. (1997). Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* **18**: 185 -192.
- INECC. (2013). “Contaminantes primarios y secundarios” tomado de <http://www.inecc.gob.mx/calibre-informacion-basica/525-calibre-cont-primarios-secundarios>. Consultado en Enero del 2015
- Jiménez-Cisneros Blanca Elena. (2002). La contaminación ambiental en México – Pagina 399. LIMUSA Noriega Editores. México.

- Kam W, Delfino RJ, Schauer JJ y Sioutas C. (2013). A comparative assessment of PM_{2.5} exposures in light-rail, subway, freeway, and Surface street environments in Los Angeles and estimated lung cancer risk. *Environ Sci Process Impacts*. **15**: 234 -243.
- Kloog I, Ridgway B, Koutrakis P, Coull BA y Schwartz JD. (2013). Long- and short-term exposure to PM_{2.5} and mortality: using novel exposure models. *Epidemiology*. **24**: 555 -561.
- Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M y Slupphaug G. (2000). Base excision of DNA in mammalian cells. *FEBS letters*. **476**: 73 -77.
- Ladiges WC. (2006). Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogen*. **25**: 1612 -1619.
- Lamerdin JE, Montgomery MA, Stilwagen SA, Scheidecker DK, Tebbs RS, Brookman KW, Thompson LH y Carrano AV. (1998). Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics* **25**: 547 -554.
- Lans H, Marteiijn JA, Schumacher B, Hoeijmakers JH, Jansen G y Vermeulen W. (2010). Involvement of global genome repair, transcription coupled repair, and chromatin remodeling in UV DNA damage response changes during development. *PLoS genetics*. **6**: e1000941.
- Leizhen Wei, Satoshi Nakajima, Ching-Lung Hsieh, Shinichiro Kanno, Mitsuko Masutani, Arthur S. Levine, Akira Yasui y Li Lan. (2013). Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose). *J Cell Sci*. **126**: 4414 -4423.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB y Tomkinson AE. (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase III α and poly (ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA Single-Strand Break Repair. *Mol Cell Biol*. **23**: 5919 -5927.
- Loizou JI, El-Khamisy SF, Zlatanou A, Moore DJ, Chan DW, Qin J, Sarno S, Meggio F, Pinna LA y Caldecott KW. (2004). The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell*. **117**: 17 -28.
- Loktionov A. (2004). Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett*. **208**: 1 -33.
- Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Baan R, Mattock H y Straif K, IARC (2013) The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol*. **14**: 1262 -1263.

- Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Ménissier-de Murcia J, Le Page F, Boiteux S, de Murcia G y Radicella JP. (2003). Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem.* **278**: 44068 -44074.
- Mehta M, Chen LC, Gordon T, Rom W y Tang MS. (2008). Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat Res.* **657**: 116 -121.
- Miranda J, Crespo I y Morlaes MA. (2000). Absolute principal component analysis of atmospheric aerosols in Mexico City. *Enviro. Sci & Pollut. Res.* **7**: 14 -18.
- Moon C y Becker S. (1999). Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocyte exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol.* **155**: 245 -252.
- Nel A. (2005). Atmosphere. Air pollution – related illness: effects of particles. *Science.* **308**: 804 -806.
- Niedernhofer LJ. (2008). Nucleotide excision repair deficient mouse models and neurological disease. *DNA repair.* **7**: 1180 -1189.
- Norman R, Cairneros E, Witi J, Bradshaw D en colaboración con el grupo de evaluación comparativa de Sudáfrica. (2007). Estimating the burden of disease attributable to urban outdoor air pollution in South Africa in 2000. *S. Afr. Med J.* **8**: 782 -790.
- Norppa H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett.* **149**: 309 -334.
- Nouspikel T y Hanawalt PC. (2000). Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression. *Mol Cell Biol.* **20**: 1562 -1570.
- Okeson CD, Riley MR y Riley-Saxton E. (2004). In vitro alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. *Toxicol in vitro.* **18**: 673 -680.
- Parsons JL, Dianova II, Finch D, Tait PS, Ström CE, Helleday T y Dianov GL. (2010). XRCC1 phosphorylation by CK2 is required for its stability and efficient DNA repair. *DNA Repair.* **9**: 835 -841.
- Pérez M, Dubner D, Michelin S, Gisone P y Carosella E. (2002). Telómeros y reparación de daño genómico: su implicación en patología humana. *Medicina.* **62**: 593 -603.

- Pérez-Vidal H, Lunagómez-Rocha MA y Acosta-Pérez LI. (2010). Análisis de partículas suspendidas totales (PST) y partículas fracción respirable (PM₁₀), en Cunduacán, Tabasco. *Universidad y Ciencia*. **26**: 151 -162.
- Pintus G, Tadolini B, Posadino AM, Sanna,B, Debidda M, Carru C, Deiana L y Ventura C. (2003). PKC/Raf/MEK/ERK signaling pathway modulates native-LDL-induced E2F-1 gene expression and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc. Res*. **59**: 934 -944.
- Pope CA y Dockery DW. (2006). Critical review: health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manage Assoc*. **56**: 709 -742.
- Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K y Thurston GD. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate. air pollution. *JAMA*. **287**:1132 -1141.
- Pöschl U. (2005). Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angew Chem Int Ed Engl*. **44**:7520 -7540.
- Potter JD. (1997). Cancer prevention: epidemiology and experiment. *Cancer Lett*. **114**: 7 -9.
- Prasad R., Lavrik,O.I., Kim,S.J., Kedar,P., Yang,X.P., Vande Berg,B.J. y Wilson,SH. (2001). DNA polymerase β -mediated long patch base excision repair: poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J. Biol. Chem*. **276**: 32411 -32414.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C y Bonner WM. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. **146**: 905 -915.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS y Bonner WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem*. **273**: 5858 -5868.
- Rojas Bracho L y Garibay Bravo V. (2003). Las partículas suspendidas, aeropartículas o aerosoles: ¿hacen daño a la salud?; ¿podemos hacer algo?. *Gaceta Ecológica*. **69**: 29 -44.
- Rosas I, Ruiz G, Raga G, Miranda J, Oleschko C, Castillejos M, Retama A, Osornio Vargas AR. (2004). Evaluation of the relationship composition-toxicity of PM₁₀ and PM_{2.5} in three zones of Mexico City, final report to the comisión ambiental metropolitana and Massachusetts Institute of Technology. Universidad Nacional Autónoma de México: México City.
- Rosas-Pérez, I, Serrano J, Alfaro-Moreno E, Baumgardner D, García-Cuellar CM, Martín del Campo JM, Raga GB, Castillejos M, Drucker Colín R y Osornio Vargas AR. (2007). Relations between PM₁₀ composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. *Chemosphere*. **67**: 12181 -12228.

- Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, y Kiltie AE. (2007). DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *BMC Genet.* **8**: 13.
- Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Herrera LA, Morales-Bárcenas R, López-Saavedra A, González-Ramírez I, Miranda J y García-Cuellar CM. (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**:12 -19.
- Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruiz C, Vázquez-López I y García-Cuellar CM. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM₁₀) of urban air pollutants. *Cancer Lett.* **278**: 192 -200.
- Sato H, Sone H, Sagai M, Suzuki KT y Aoki Y. (2000). Increase in mutation frequency in lung of big blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis.* **21**: 653 -661.
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG y Bonner WM. (2002). Quantitative detection of ¹²⁵IdU-induced DNA double-strand breaks with γ -H2AX antibody. *Radiat Res.* **158**: 486 -492.
- Sheila SD, Valerie LO y Sucharita K. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* **447**: 941 -450.
- Shen MR, Jones IM y Mohrenweiser H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* **58**: 604 -608.
- Sienra, MR, Rosazza NG y Préndez, MM. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmos. Res.* **75**: 267 -281.
- SIMAT. (2013). "Calidad del Aire" tomado de <http://www.aire.df.gob.mx/default.php>. Consultado en Mayo del 2015
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM y Taylor JA. (2001). DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **10**: 125 -131.
- Stracker TH, Usui T y Petrini HJ. (2009). Taking the time to make important decisions: The checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair.* **8**:1047 -54.

- Sulli G, Di Micco R y d'Adda di Fagagna F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*. **12**:709 -720.
- Thacker J y Zdzienicka MZ. (2004). The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair*. **3**:1081 –1090.
- Thacker J y Zdzienicka ZM. (2003). The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair*. **2**: 655 -672.
- Traversi Deborah, Piero Cervella y Giorgio Gilli. (2015). Evaluating the genotoxicity of urban PM_{2.5} using PCR-based methods in human lung cells and the Salmonella TA98 reverse test. *Environ Sci Pollut Res*. **22**: 1279 -1289
- Upadhyay D, Panduri V, Ghio A y Kamp DW. (2003). Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **29**: 180 -187.
- Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF y Cardenas M. (2003). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. **139**: 57 -63.
- Vega E, Reyes E, Ruiz H, García J, Sánchez G, Martínez-Villa G y González U. (2004). Analysis of PM_{2.5} and PM₁₀ in the atmosphere on Mexico City during 2002. *J. Air Waste Manage Assoc*. **54**: 786 -798.
- Villalobos-Pietrinia R, Amador-Muñoz O, Waliszewskib S, Hernández-Mena L, Munive-Colina Z, Gómez-Arroyoa S, Bravo-Cabrera JL, Frías-Villegasa A. (2006). Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10 \mu\text{m}$ in southwest Mexico City. *Atmos. Environ*. **40**: 5845 -5857.
- Vinikoor-Imler LC, Davis JA y Luben TJ. (2011). An ecologic analysis of county-level PM_{2.5} concentrations and lung cancer incidence and mortality. *Int J Environ Res Public Health*. **8**: 1865 -1871.
- Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z y Hemminki K. (2004). Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis*. **25**: 757 -763.

- Vogel C y Marcotte EM. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*. **13**: 227 -32.
- Wang S, Gong Z, Chen R, Liu Y, Li A, Li G y Zhou J. (2009). JWA regulates XRCC1 and functions as a novel base excision repair protein in oxidativestress- induced DNA single-strand breaks. *Nucleic Acids Res*. **37**: 1937 -1950.
- Watabe Yuichi, Nazuka Noriaki, Tezuka Masakatsu, y Shimba Shigeki. (2010). Aryl Hydrocarbon Receptor Functions as a Potent Coactivator of E2F1- Dependent Trascrption Activity. *Biol. Pharm. Bull*. **33**: 389 -397.
- Webb P, Hopper J, Newman B, Chen X, Kelemen L, Giles G, Southey M, Chenevix-Trench G y Spurdle A. (2005). Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **14**: 319 -323.
- WHO (2011). Fact Sheet. tomado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/index.html>. Consultado en Noviembre del 2014
- Winsey S, Haldar N, Marsha H, Bunce M, Marshall S, Harris A, Wonjnarowska F y Welsh K. (2000). A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res*. **60**: 5612 -5616.
- World Health Organization. Air Quality Guidelines. Tomado de <http://www.who.int/peh/air/Airqualitygd.htm>. Consultado en Noviembre del 2014.
- Yanagisawaa T, Uradea M, Yamamotob Y y Furuyama J. (1998). Increased expression of human DNA repair genes, XRCC1, XRCC3 and RAD51, in radioresistant human KB carcinoma cell line N10. *Oral Oncology*. **34**: 524 -528.
- Yu H, Li Q, Kolosov VP, Perelman JM y Zhou X. (2012). Regulation of Particulate Matter-Induced Mucin Secretion by Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors. *Inflammation*. **35**: 1851 -1859.