



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN GESTACIONAL A MATERIAL PARTICULADO Y  
BIOMARCADORES DE RIESGO A LA SALUD EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA  
CIUDAD DE MÉXICO (ZMCM)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**BIÓL. JORGE ALFONSO MACIEL RUIZ**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR**  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO**  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser por mi “*alma mater*” y permitirme crecer académicamente en sus aulas, la vida fue distinta después de haber formado parte de la Universidad de México. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por cobijarme durante mis estudios de doctorado, siempre será un orgullo haber pertenecido a esta gran institución.

Al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas por haberme permitido concluir satisfactoriamente mis estudios de posgrado. Por haberme permitido crecer tanto académicamente.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por aceptarme hace ya algunos años en su grupo de investigación. Por haberme permitido realizar este trabajo que esperamos sea en beneficio de los habitantes de la Ciudad de México. Por sus enseñanzas que he adquirido en la estancia en su laboratorio, por el apoyo brindado y por todos los conocimientos compartidos conmigo que han sido fundamentales en mi crecimiento profesional. Mi más profundo agradecimiento. Por su calidez humana y por mostrarme lo que debe ser un científico, sin lugar a dudar seguiré su ejemplo. Gracias infinitas por haberme apoyado en momentos muy difíciles, usted siempre estuvo ahí. Del mismo modo sabe que puede siempre contar conmigo.

Al Dr. Pavel Petrosyan por haberme ayudado en toda la parte experimental. Gracias por ayudarme a mejorar mi trabajo en el laboratorio, sus consejos y enseñanzas han sido parte fundamental de mi formación científica. Gracias por su enorme apoyo en la estandarización de la técnica de  $^{32}\text{P}$ -postlabeling y su colaboración activa en la determinación de los niveles de aductos de todas las muestras biológicas. Gracias por todas las historias contadas en el laboratorio de radioactividad sobre la historia de Europa y los idiomas a través del mundo.

A la Dra. Claudia María García Cuellar y al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por formar parte de mi Comité Tutoral del Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas, gracias por sus valiosas críticas y sugerencias en el desarrollo de esta investigación las cuales fueron muy importantes para poder concluir este estudio. En cada reunión semestral siempre me aportaron sugerencias que mejoraron sustancialmente nuestro proyecto.

A la Dra. Patricia Ostrosky Wegman, a la Dra. Ana María Salazar y a la QFB. Monserrat Sordo Cedeño por su valiosa contribución en el este proyecto al realizar los cultivos celulares y determinar las frecuencias de micronúcleos. Por sus valiosas críticas y sugerencias en los seminarios que ayudaron a mejorar de manera importante esta investigación.

A la Dra. Tzipe Govezensky por valiosa ayuda en el análisis estadístico de datos, por sus sugerencias y enseñanzas en el uso de las pruebas estadísticas y en el manejo de la base de datos.

A la Técnica Académica Biól. Luz María Chiu Velázquez por su asesoría y ayuda en el manejo del equipo de detección de radiación por centelleo empleado en la técnica de <sup>32</sup>P-postlabeling.

Al M. en C. Efraín Ríos Sánchez por su ayuda en el ensayo de detección de aductos en el DNA. Gracias, por toda tu ayuda y ánimos en culminar este proyecto.

A la Biól. Cristina López Rivera por su ayuda en la identificación de las variantes alélicas determinadas en este proyecto, así como su invaluable colaboración en la terminación de los aductos en DNA en las muestras biológicas.

Al Dr. Renato León por su ayuda en la realización de las determinaciones de aductos en el DNA, por haber generado un estándar de DNA aductado en células HepG2 tratadas con benzo[a]pireno.

Al Dr. Jorge H. Limón Pacheco por haber colaborado de manera importante en la colecta de muestras biológicas del hospital CIMIGen.

A la Dra. María Guadalupe Veloz Martínez y al Dr. Rogelio Robles Morales por dirigir la colecta de muestras biológicas en el Centro Médico Nacional “La Raza” y por establecer el contacto con el Instituto de Investigaciones Biomédicas para iniciar este proyecto.

Al Dr. Rodrigo Ayala Yáñez y al LEO. Andrés Eduardo Nepomuceno Hernández por su interés en estudiar los efectos de la contaminación del aire al colaborar con el Instituto de Investigaciones Biomédicas el permitir llevar a cabo un muestreo en el hospital CIMIGen.

A la Dra. Raquel López Arellano por su valiosa participación en la determinación de los niveles de isoprostanos en plasma sanguíneo en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico de la FES Cuautitlán de la UNAM.

A la Dra. Regina Montero Montoya por su ayuda en la identificación de las variantes alélicas utilizadas en este proyecto de investigación.

Un agradecimiento muy especial a los investigadores que conformaron mi jurado, a la Dra. Teresa Fortoul Vander Goes (presidenta), a la Dra. Claudia Maria García Cuellar (secretaria), al Dr. Diddier Prada Ortega (vocal), a la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez (vocal) y al Dr. Francisco Arenas Huertero (vocal). Por sus valiosas críticas en el trabajo escrito y en general en el proyecto de investigación. Gracias por compartir sus conocimientos y por haber revisado tan minuciosamente, todos sus comentarios mejoraron de manera importante esta tesis

Un especial agradecimiento a todas las voluntarias que confiaron en nuestra investigación y decidieron participar en este proyecto, sin su colaboración la culminación de este proyecto de investigación no hubiera sido posible.

### *A mi familia y amigos*

La culminación de este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo de todos mis seres queridos, familiares y amigos que me brindaron su incondicional apoyo y confianza.

Gracias inmensas, a mi querida Ivette Cruz, por todo tu apoyo en el momento más importante de mi vida, gracias por apoyarme tanto y por todo el amor que me has dado en estos tantos años que llevamos juntos. Gracias por soportar a mi lado las frustraciones y desveladas que conlleva estudiar un doctorado. Gracias por ser el principal pilar en el que siempre recibí apoyo, amor y consejos. Gracias por amarme como soy, me dejaste volar y te uniste a mi vuelo, eres lo que me hace más feliz. Nada será tan reconfortante como un abrazo tuyo dejando claro que todo siempre va a estar bien. Eres lo mejor que tengo en la vida. Estoy muy orgulloso de la persona que eres, un ser humano maravilloso y noble. Soy verdaderamente afortunado por tener en mi existir a alguien tan especial y único como tú.

Gracias por nunca dejarme sólo, recuerda que somos un equipo y que juntos somos invencibles. Siempre podrás contar conmigo. Te amo inmensamente.

Gracias a mis padres Jorge Maciel y Genoveva Ruiz, les estoy profundamente agradecido por haber estado siempre conmigo en esta etapa tan importante de mi vida profesional. Saben que mucho del esfuerzo en este momento fue pensando en ustedes, siempre tratando de ser el mejor estudiante para que estén orgullosos de mi y sobre todo tratando de ser el mejor hijo y el mejor ser humano, tal y como ustedes me enseñaron. Yo me siento muy afortunado de tener a la familia que tengo. Los quiero mucho, nunca dejemos de estar unidos ¡gracias por tanto! Lo que soy es gracias a ustedes y soy el reflejo de ustedes...

A mis hermanos José Alberto Maciel y Jessica Ivette Maciel, queridos hermanos quiero que siempre persigan sus sueños, nunca se detengan, sabemos de lo que estamos hechos y de donde venimos. Yo siempre los voy a apoyar tal como ustedes lo hicieron durante este tiempo. Saben que cuentan con su hermano mayor para toda la vida. Fue un privilegio haber crecido junto a ustedes, riendo, peleando y jugando. Los quiero mucho y también este logro es por ustedes. Inculquemos lo mismo en las pequeñas Monserrat y Stephania Salgado, ¡Las pequeñas inmensas alegrías en nuestra familia!

A mis abuelitos que ya no están con nosotros (Margarito Ruiz y Francisco Maciel) y a mis abuelitas (Carmen Reyes y Elfega Buburrón) que siempre se preocuparon por mí, que estuvieron pendientes de las cosas aventuradas que hacía en la vida, en alegrarse por las decisiones que tomé. Por siempre decirme que era un buen niño. Por cuidarme de pequeño y cuidarme cuando ya era grande. Por pedirle a la vida que todo marchara bien para mí. Los voy a querer por siempre. Un agradecimiento inmenso a todos mis tíos (son muchos) que me apoyaron desde que emprendí este viaje en la biología ¡Gracias!

A mis amigos del alma, Salvador Yanez, Yahir López y Santiago Reyes. Los extraño mucho, la vida nos ha llevado por caminos muy distintos, pero a pesar de ello, las veces que los he visto es como si no hubiera pasado el tiempo o la distancia entre nosotros. Hemos crecido juntos desde que éramos niños, pero ahora estamos en sitios muy lejanos, pero sé que todos los días puedo conversar con ustedes y reír juntos ¡Los reyes de la pólvora!

A mi cainal Cristian Cruz, agradezco haberte conocido por que eres una magnifica persona, puedo decir que somos buenos amigos y que compartimos la misma pasión por los autos. Eres una persona muy sincera y que siempre apoya a los suyos, sigue así. Me ayudaste más que cualquiera cuando todo parecía ser complicado y difícil.

A mi amigo Sergio Vargas, hermano, gracias por siempre estar ahí, eres el amigo más incondicional que tengo. Durante estos años de estudio nos distanciamos un poco, pero, bastaba un mensaje para vernos, platicar y tocar guitarra. Eres como un hermano menor, gracias por escucharme y ser tan buen amigo, eres una persona muy noble y valiosa.

A mi amigo Biól. David Rodríguez, es un gusto saber que decidiste venir a México desde Colombia para crecer académicamente, espero haber contribuido un poco en eso, eres un gran estudiante y un muy buen amigo. A la M. en C. Claudia Huitrón por haber sido una gran amiga desde que entraste al laboratorio y apoyarme en este proyecto en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio Erik, Wendy, Ángel, Luis Ángel y Daniela con los que conviví y siempre trataron de enriquecer mi proyecto en los seminarios. Gracias por todos los buenos momentos, los días de charla y por los días de trabajo en el laboratorio.

Voy por la siguiente aventura de mi vida...

### ***Financiamiento***

Este proyecto fue financiado a través de los siguientes programas o instituciones. Programa Salud y Ambiente del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Red SAI CONACYT 293450, PAPIIT IN208914, CONACYT 219887 y por la Fundación Miguel Alemán. El alumno Jorge Alfonso Maciel Ruiz recibió una beca doctoral por medio de CONACYT con numero 330134.



## **Tabla de contenido**

<b>Portada</b> .....	<b>1</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b>A mi familia y amigos</b> .....	<b>4</b>
<b>Financiamiento</b> .....	<b>7</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>10</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>13</b>
1.1 Contaminación atmosférica .....	<b>13</b>
1.1.1 Material particulado.....	<b>14</b>
1.1.2 Anatomía de las vías respiratorias, mecanismo de depósito y eliminación de partículas...	<b>15</b>
1.1.3 Composición química del material particulado.....	<b>18</b>
1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	<b>20</b>
1.2.1 Metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la formación de aductos en el DNA .....	<b>22</b>
1.2.2 Importancia epidemiológica de los niveles de aductos en el DNA .....	<b>27</b>
1.2.3 Polimorfismos en enzimas del metabolismo de xenobióticos.....	<b>28</b>
1.3 Niveles de micronúcleos y su asociación con la exposición ambiental a PM .....	<b>29</b>
1.4 Exposición gestacional al material particulado e hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	<b>30</b>
1.4.1 Importancia de la barrera placentaria en eventos de exposición gestacional a PM.....	<b>32</b>
1.5 Problemática de contaminantes en la ZMCM.....	<b>33</b>
<b>2. Justificación</b> .....	<b>39</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>40</b>
<b>4. Objetivo general</b> .....	<b>40</b>
4.1 Objetivos particulares .....	<b>40</b>
<b>5. Métodos</b> .....	<b>41</b>
5.1 Obtención de muestras biológicas .....	<b>41</b>
5.2 Diseño del estudio .....	<b>43</b>
5.3 Monitoreo ambiental de los contaminantes en el aire de la ZMCM.....	<b>44</b>
5.4 Determinación de cotinina en orina.....	<b>45</b>
5.5 Purificación del DNA.....	<b>45</b>
5.6 Determinación de aductos en el DNA en sangre por medio <sup>32</sup> P-Postlabeling .....	<b>46</b>
5.7 Determinación de los niveles en plasma de 8-iso-PGF <sub>2α</sub> .....	<b>47</b>
5.8 Identificación de los polimorfismos para GSTM1*0, CYP1B1*3, NQO1*2 y MGMT L84F.....	<b>48</b>

5.9 Cultivo celular de linfocitos humanos, ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN) y parámetros del Citoma .....	49
5.10 Análisis estadístico .....	50
<b>6. Resultados .....</b>	<b>52</b>
6.1 Resultados Parte 1: Aductos en el DNA, variantes alélicas de riesgo y daño oxidante en madres y fetos expuestos a PM en la ZMCM. Cohorte “La Raza” .....	52
6.1.1 Población de estudio .....	52
6.1.2 Monitoreo de las concentraciones de PM <sub>2.5</sub> , PM <sub>10</sub> y Ozono en la ZMCM .....	53
6.1.3 Aductos en el DNA en madres y recién nacidos .....	55
6.1.4 Asociación entre los niveles de aductos y las concentraciones ambientales de PM .....	58
6.1.5 Estimación del Riesgo Relativo en la formación de aductos en el DNA de cordón umbilical .....	62
6.1.6 Niveles de 8-Isoprostano en plasma de madres y recién nacidos.....	63
6.1.7 Efecto de los polimorfismos en los niveles de aductos en el DNA e isoprostanos.....	65
6.2 Resultados Parte 2: Niveles de micronúcleos en linfocitos maternos y de cordón umbilical asociados a la exposición ambiental a PM.....	70
6.2.1 Población de estudio.....	70
6.2.2 Frecuencia de micronúcleos y parámetros del citoma en madres y recién nacidos expuestos a PM en la ZMCM.....	71
6.2.3 Efecto de la exposición a PM sobre la frecuencia de MN ajustada por edad y ocupación materna .....	75
6.2.4 Efecto de la época del año en la formación/eliminación de MN en linfocitos de sangre de cordón umbilical.....	75
<b>7. Discusión .....</b>	<b>76</b>
7.3 Niveles de marcadores de daño en el DNA (aductos y micronúcleos) .....	78
7.4 Niveles de 8-iso-PGF <sub>2α</sub> en muestras de plasma sanguíneo.....	82
7.5 Efecto de las variantes alélicas de riesgo y los niveles de aductos en el DNA.....	82
7.6 Limitaciones del estudio.....	84
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>85</b>
<b>9. Perspectivas .....</b>	<b>86</b>
<b>10. Referencias.....</b>	<b>88</b>
<b>11. Anexos: Artículos publicados derivados de este trabajo .....</b>	<b>106</b>
11.1 Artículos adicionales publicados durante los estudios de posgrado .....	128

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Anatomía del sistema respiratorio humano .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Figura 2.</b> Vía de bioactivación de los PAHs .....	23
<b>Figura 3.</b> Pasos enzimáticos del metabolismo del benzo[a]pireno .....	26
<b>Figura 4.</b> Distribución de las principales vialidades e industrias en la ZMCM.....	34
<b>Figura 5.</b> Distribución espacial de PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> en la ZMCM en el año 2012.....	35
<b>Figura 6.</b> Distribución espacial de contaminantes gaseosos en la ZMCM en el año 2012.....	36
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental y distribución de las muestras biológicas.....	44
<b>Figura 8.</b> Diagrama de la placa de cromatografía en capa fina.....	47
<b>Figura 9.</b> Concentraciones mensuales de PM <sub>2.5</sub> , PM <sub>10</sub> y O <sub>3</sub> de las estaciones de monitoreo de la RAMA de la zona norte de la ZMCM en el periodo 2011-2015 .....	55
<b>Figura 10.</b> Niveles de exposición a PM <sub>2.5</sub> y PM <sub>10</sub> para cada una de las voluntarias en diferentes momentos de la gestación .....	55
<b>Figura 11.</b> Niveles de aductos en madres e hijos expuestos a PM en la ZMCM.....	57
<b>Figura 12.</b> Efectos de la estación del año sobre los niveles de aductos en madres e hijos .....	58
<b>Figura 13.</b> Correlaciones de Spearman entre las concentraciones de PM <sub>2.5</sub> y los niveles de aductos tanto en sangre materna y sangre de cordón umbilical .....	59
<b>Figura 14.</b> Correlaciones de Spearman entre las concentraciones ambientales de PM <sub>10</sub> y los niveles de aductos en sangre materna y sangre de cordón umbilical .....	61
<b>Figura 15.</b> Niveles de <i>8-iso-PGF<sub>2α</sub></i> en plasma materno y de cordón umbilical .....	64
<b>Figura 16.</b> Correlación de los niveles de exposición a O <sub>3</sub> en madres y recién nacidos en diferentes ventanas de tiempo en el último periodo de gestación comparados con los niveles de <i>8-iso-PGF<sub>2α</sub></i> en plasma .....	65
<b>Figura 17.</b> Análisis de distribución empírica acumulada de las combinaciones de genotipos para el polimorfismo <i>CYP1B1*3</i> en madres (MA) e hijos (RN) respecto a los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical .....	69
<b>Figura 18.</b> Variaciones estacionales de los niveles de MN en linfocitos maternos y de cordón umbilical .....	76

## *Índice de tablas*

<b>Tabla I.</b> Estaciones de monitoreo de la RAMA que registran concentraciones ambientales de PM en la ZMCM. ....	<b>36</b>
<b>Tabla II:</b> Criterios de inclusión y exclusión empleados en el estudio. ....	<b>43</b>
<b>Tabla III.</b> Características demográficas y biomarcadores de la población de estudio. ....	<b>53</b>
<b>Tabla IV.</b> Riesgo Relativo (RR) para niveles $\geq 2$ aductos/ $10^8$ nucleótidos en exposiciones de $PM_{10} \geq$ concentración media ( $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) en cordón umbilical durante el último trimestre de la gestación .....	<b>63</b>
<b>Tabla V.</b> Características descriptivas de las variantes alélicas de riesgo estudiadas y su relación con los aductos en el DNA y los niveles de <i>8-iso-PGF<sub>2<math>\alpha</math></sub></i> . ....	<b>67</b>
<b>Tabla VI.</b> Análisis de regresión múltiple entre los niveles de aductos en el DNA (transformados a Log) sangre de cordón umbilical, PM y las variantes alélicas de riesgo en madres y neonatos. ....	<b>68</b>
<b>Tabla VII.</b> Características demográficas de la población de estudio. ....	<b>71</b>
<b>Tabla VIII.</b> Niveles de los biomarcadores de la población de estudio y correlaciones de Spearman con la exposición a PM. ....	<b>72</b>
<b>Tabla IX.</b> Análisis de regresión múltiple entre los niveles de la frecuencia de micronúcleos por 1000 células binucleadas (transformados a Log) sangre de cordón umbilical y sangre materna contra $PM_{2.5}$ , $PM_{10}$ , edad materna y ocupación. ....	<b>74</b>

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México a cargo de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte en colaboración con la Dra. Patricia Ostrosky Wegman, la Dra. Ana María Salazar y la QFB Monserrat Sordo Cedeño del mismo departamento en la misma institución. También se realizó en colaboración con la Dra. Raquel López Arellano del Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico de la FES Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se estableció una colaboración con la Dra. María Guadalupe Veloz Martínez del Instituto Mexicano del Seguro Social y con el Dr. Rodrigo Ayala Yáñez del Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios al Nacimiento.**

## ***1. Introducción***

### ***1.1 Contaminación atmosférica***

Se tiene evidencia epidemiológica y molecular de los efectos deletéreos del aire contaminado sobre la salud humana, se ha estimado que anualmente a nivel mundial mueren alrededor de 9 millones de personas, que representa aproximadamente el 16% de las muertes a nivel mundial [Landrigan et al., 2018]. La contaminación atmosférica es un importante factor que incrementa la morbilidad y la mortalidad en las poblaciones expuestas, inclusive aún más que enfermedades infecciosas como el VIH-SIDA, la tuberculosis o la malaria [Landrigan et al., 2018; Landrigan et al., 2019]. Se estima que a nivel mundial en el año 2016 murieron alrededor de 940,000 niños por exposición a la contaminación ambiental en el agua, en el suelo o en el aire. Dos terceras partes de esas muertes fueron en niños con edades inferiores a los 5 años y más de la mitad de esas muertes ocurrieron durante el primer año de vida [Landrigan et al., 2019].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la contaminación atmosférica hace referencia a la presencia de una o más sustancias a una concentración o a un periodo de tiempo por arriba de los niveles naturales, además que estas sustancias tengan el potencial de producir efectos adversos a la salud humana [IARC, 2015]. A partir del año 2013, la Agencia Internacional sobre la Investigación en Cáncer (IARC, del inglés: International Agency for Research on Cancer), decidió considerar a la contaminación atmosférica como un agente del grupo 1, es decir, que es una sustancia carcinógena para humanos. El estar clasificada en este grupo implica que hay suficiente evidencia mecanística y epidemiológica de su participación en el desarrollo de diversos tipos de cáncer [IARC, 2013, 2015].

Históricamente, se tienen registros de eventos de alta mortalidad provocados por episodios de elevada contaminación atmosférica. Por ejemplo, en diciembre de 1952, en la Ciudad de Londres durante 4 días se experimentó un evento de contaminación atmosférica extrema y se tienen registros de hasta 4,000 muertes entre los días 5-8 de diciembre de tal año. Sin embargo, se atribuyen muertes derivadas de este evento hasta el año 1953 y se calcula que los efectos a la salud se extendieron hasta las 12,000 defunciones [Dooley, 2002; Logan,

1953]. Las concentraciones de partículas totales en Londres previo a este evento oscilaban alrededor de los  $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Sin embargo, durante ese periodo los niveles de partículas se estima que llegaron hasta  $4,500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  [Phalen and Phalen, 2013]. La mortalidad provocada por el evento de Londres y otros eventos de contaminación extrema muestran el efecto deletéreo que tiene la contaminación atmosférica sobre la salud humana. Además, los sobrevivientes pueden ver afectada su salud en años posteriores con padecimientos como asma, alergias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, del inglés chronic obstructive pulmonary disease) y cáncer [Dockery and Pope, 1994; Dockery et al., 1993].

Existen diferentes contaminantes presentes en el aire, dentro de los que se encuentra el material particulado (PM, del inglés: particulate matter), este contaminante ha recibido especial atención debido a la complejidad en sus componentes y en consecuencia de sus efectos negativos sobre la salud humana. El término de material particulado se refiere a todos los compuestos no gaseosos que se encuentran suspendidos en la atmósfera en forma de gotas, partículas sólidas o mezclas de ambas [Stanek et al., 2011].

La OMS recomienda que el límite máximo anual de  $\text{PM}_{2.5}$  es de  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  [IARC, 2013, 2015]. Con imágenes satelitales, se han realizado estimaciones de los niveles de  $\text{PM}_{2.5}$  en todas las regiones del mundo. Con base en esos resultados, se ha estimado que alrededor del 80% de la población global, está expuesta a niveles por arriba de los establece la OMS como límite seguro [van Donkelaar et al., 2010], lo cual convierte a la exposición al PM a un serio problema ambiental.

### ***1.1.1 Material particulado***

El PM puede ser generado por procesos naturales tales como la erosión del suelo, la liberación de polen de las plantas, a incendios forestales o erupciones volcánicas. Sin embargo, también puede ser producido por actividades humanas principalmente a través de la quema de combustibles fósiles para cocinar, generación de energía, procesos industriales y a través de motores de combustión interna, de tal modo que el PM tiene una distribución prácticamente ubicua [IARC, 2013, 2015].

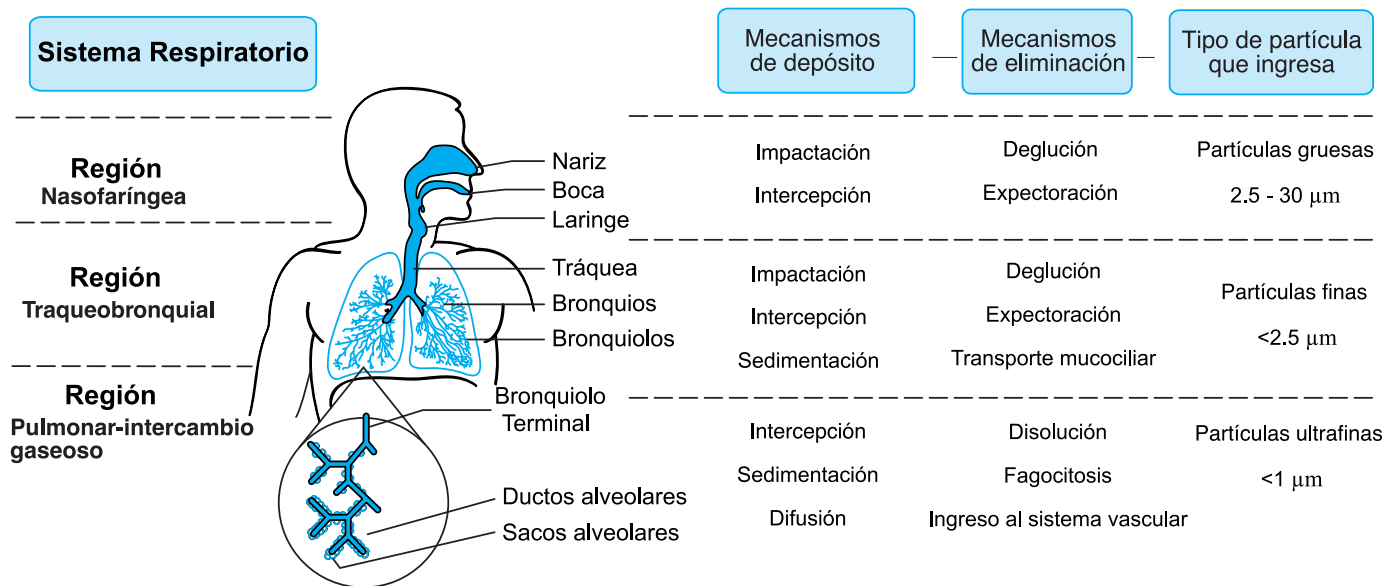
El PM se clasifica por su tamaño aerodinámico, el cual consiste básicamente en el comportamiento que poseen las partículas en la columna de aire, debido a que no todas las partículas tienen el mismo diámetro y no son totalmente esféricas, la clasificación de acuerdo con el diámetro aerodinámico sigue la ley de fluidos de Stokes, en la cual la velocidad de sedimentación de una partícula estará en función del diámetro de la partícula y de la densidad [Maciel-Ruiz, 2013]. Las partículas suspendidas pueden ser clasificadas en tres principales diámetros aerodinámicos, 1) las PM<sub>10</sub> que comprenden tamaños de partículas iguales o inferiores a 10 µm. Este diámetro aerodinámico incluye a las de mayor tamaño que principalmente provienen de procesos de abrasión mecánica, polvo, material biológico suspendido como polen o partes de insectos. 2) El PM<sub>2.5</sub> de tamaños inferiores a 2.5 µm y finalmente, 3) las partículas ultrafinas que pueden llegar a tener diámetros aerodinámicos inferiores a 0.1 µm. Estos dos últimos tamaños de partícula provienen principalmente de condensados generados en eventos de combustión en procesos de manufactura, generación de energía en las centrales termoeléctricas y en los motores de combustión interna de gasolina o diésel [Brunekreef and Holgate, 2002; Dockery and Pope, 1994; IARC, 2015].

### ***1.1.2 Anatomía de las vías respiratorias, mecanismo de depósito y eliminación de partículas***

De manera general, la anatomía de las vías respiratorias se divide en tres regiones principales (Figura 1): 1) la región *nasofaríngea* la cual está implicada en el reconocimiento de sustancias irritantes, en esta región se encuentran las vibrisas nasales que ayudan a filtrar el aire de las partículas de mayor tamaño, 2) la región *traqueobronquial*, que comprende una serie de ductos que se ramifican y terminan originando a los bronquiolos. En esta región existe un epitelio mucociliado que es muy importante en la eliminación de las partículas. Finalmente, 3) la *región alveolar o pulmonar*, compuesta por las regiones terminales de los bronquiolos, los conductos alveolares y de los alveolos. Estos últimos, son la unidad funcional de intercambio gaseoso del sistema respiratorio [Valentine and Kennedy, 2008].



Cuando ingresan por las vías respiratorias las partículas son sometidas a cambios bruscos de dirección y de velocidad del aire. En las vías aéreas superiores, ingresan con gran velocidad en la cavidad nasal; mientras que en la región traqueobronquial la velocidad del aire disminuye drásticamente derivado de las bifurcaciones en esa región de las vías respiratorias y, finalmente en la región pulmonar o de intercambio gaseoso, la velocidad del aire es considerablemente más baja [Brain et al., 2014; Valentine and Kennedy, 2008].



**Figura 1.** Anatomía del sistema respiratorio humano. Las vías respiratorias se dividen en tres regiones principales: La región *nasofaríngea*, la cual está conformada por la nariz, la boca y la laringe, esta sección del sistema respiratorio hay mecanismos específicos de depósito y eliminación y generalmente ingresan partículas gruesas. La región *traqueobronquial* está compuesta por la tráquea, los bronquios y los bronquiolos, en esta región el principal mecanismo de eliminación es el transporte mucociliar y en este compartimento ingresan partículas finas. Finalmente, la región *pulmonar* o de *intercambio gaseoso* comienza en los bronquiolos terminales, los ductos y los sacos alveolares, aquí la eliminación de partículas es compleja y generalmente ingresan las partículas muy pequeñas (Figura tomada y modificada Phalen and Phalen, 2013).

Existen al menos 4 mecanismos por los cuales las partículas ingresan y se depositan en las vías respiratorias. El proceso de *impactación* involucra cambios repentinos en la dirección del aire y por la inercia de la partícula esta termina depositándose en las paredes de la cavidad respiratoria. La *intercepción* ocurre cuando las partículas entran en contacto con la superficie de la vía respiratoria y encuentran en su camino agregados de partículas que no permiten que continúen su viaje. En el proceso de *sedimentación*, simplemente las partículas se depositan

por acción de la gravedad, este tipo de depósito es común en partículas gruesas  $> 10 \mu\text{m}$ . Finalmente, por *difusión* las partículas de menor tamaño  $< 0.5 \mu\text{m}$  se depositan en la región alveolar, en donde la velocidad del aire es muy baja y las partículas se desplazan a través de movimiento browniano [Phalen and Phalen, 2013; Valentine and Kennedy, 2008].

La eliminación de las partículas depositadas en las vías respiratorias se lleva a cabo mediante varios procesos los cuales van a depender del tamaño de la partícula, sitio de depósito y de la solubilidad de la partícula (Figura 1) [Brain et al., 2014]. De manera general, de acuerdo con lo descrito por Brain et al., 2014, las partículas de mayor tamaño que se depositan en la región nasofaríngea son eliminadas por procesos de *deglución o expectoración* (Figura 1). En las vías aéreas superiores e intermedias, la eliminación del PM es llevada a cabo por la unión a mucosas o por *transporte mucociliar* (Figura 1). El mecanismo de transporte mucociliar consiste en una doble capa de moco, la capa superior consiste en mucosidad de alta viscosidad y debajo de esta hay una capa de moco de baja viscosidad. Las partículas se depositan en el moco y son desplazadas a través de células ciliadas hacia la laringe en donde pasan al tracto intestinal por procesos de deglución. En los humanos, el epitelio ciliado se extiende hasta la región bronquiolar, por lo que partículas de tamaño intermedio que se depositan en esa región pueden ser eliminadas por este mecanismo.

En la región alveolar o de intercambio gaseoso, los mecanismos de eliminación de partículas son diferentes debido a que son regiones no ciliadas y la eliminación del PM es más compleja. La eliminación en las regiones no ciliadas ocurre por procesos de *disolución, fagocitosis y admisión al sistema vascular* por el *sistema linfático* (Figura 1) [Brain et al., 2014]. El proceso de *disolución* ocurre en el fluido de revestimiento de las vías respiratorias. Los componentes de las partículas se disuelven y pasan al intersticio celular o al sistema linfático para posteriormente llegar al torrente sanguíneo. Los macrófagos son el principal mecanismo de eliminación de partículas en los alvéolos. Estas células *fagocitan* partículas o fibras y las transportan hasta las regiones ciliadas de las vías respiratorias. Además, la fagocitosis de las partículas previene la penetración a través del epitelio alveolar y se facilita el transporte alveolo-bronquiolo. Finalmente, los macrófagos pueden también facilitar la entrada de las partículas al *sistema linfático* donde se pueden acumular en los ganglios linfáticos o translocarse al torrente sanguíneo (*admisión al sistema vascular*). Las partículas que no son

eliminadas por medio del sistema linfático o por las rutas bronquiales, pueden eventualmente migrar dentro del intersticio a través de macrófagos intersticiales hacia la pleura donde pueden cruzar el endotelio vascular e ingresar al sistema circulatorio [Brain et al., 2014; Valentine and Kennedy, 2008].

El nivel de penetración del PM depende del diámetro aerodinámico de las partículas, conforme el diámetro disminuye, las partículas tienen la capacidad de ingresar más profundamente en las vías respiratorias, inclusive a las regiones alveolares donde ocurre intercambio gaseoso [van Berlo et al., 2012]. De acuerdo con su grado de penetración, reciben denominaciones como (Figura 1): “fracción torácica”, para las partículas gruesas (PM<sub>10</sub>), que pueden depositarse principalmente en la región nasofaríngea de eliminación rápida; “fracción respirable”, o PM<sub>2.5</sub>, es capaz de alcanzar las regiones más profundas del pulmón, depositándose en las regiones bronquiolares y alveolares. Del mismo modo, las partículas ultrafinas < 0.1 µm pueden entrar fácilmente en los alvéolos y depositarse [Valentine and Kennedy, 2008; van Berlo et al., 2012]. Las partículas pueden permanecer y acumularse en el tejido pulmonar; por ejemplo, se han encontrado niveles más altos de PM en el tejido pulmonar de biopsias *post mortem* de habitantes de la Ciudad de México en comparación con las biopsias de Vancouver, posiblemente porque los niveles de PM son más altos en la Ciudad de México, y la acumulación encontrada se correlaciona directamente con las concentraciones de PM [Churg et al., 2003].

Las partículas depositadas en las vías respiratorias inferiores pueden migrar a través del tejido alveolar directamente a la circulación linfática y sistémica y llegar inclusive a otros órganos [Brain et al., 2014; Nemmar et al., 2002]. Existe evidencia de la capacidad de las partículas finas y ultrafinas para atravesar tejidos, migrar en el organismo y llegar al cerebro o la placenta [Geiser et al., 2005; Oberdorster et al., 2004; Wick et al., 2010].

### ***1.1.3 Composición química del material particulado***

El PM tiene una composición muy compleja y además parte de los efectos que tienen sobre la salud humana son derivados de la concentración en el aire. Dependiendo del origen que tengan las partículas, tendrán perfiles de composición distintos. En este trabajo nos centramos

en aspectos específicos de la composición orgánica del PM derivado de la quema de materia orgánica y su relación con la salud humana.

Algunos de los compuestos que se encuentran asociados a las partículas son compuestos derivados del carbono (TC; del inglés: Total Carbon) el cual está compuesto por carbono orgánico (OC; del inglés: Organic Carbon) y carbono elemental (EC; del inglés: Elemental Carbon). En el caso de las partículas ultrafinas se ha reportado que pueden tener en su composición hasta un 80-90% de TC [Kelly and Fussell, 2012]. En estudios realizados en la Ciudad de México se ha demostrado que el PM<sub>2.5</sub> puede estar compuesto por TC en un 55-88%, dependiendo de la fuente de materia orgánica que lo genere [Mugica et al., 2010; Mugica et al., 2008]. Además, se ha reportado que, de esa fracción de TC, está mayormente representado el OC. Esto se determinó analizando diferentes perfiles de emisión empleando distintas fuentes de materia orgánica tales como gasolina, diésel o residuos biológicos y se observó que el PM<sub>2.5</sub> estaba compuesto mayoritariamente de OC [Mugica et al., 2008]. Dentro del OC, se han reportado hasta 200 compuestos distintos que incluyen alcanos, alquenos, compuestos aromáticos, aldehídos, hidrocarburos poliaromáticos y cetonas [Kelly and Fussell, 2012]. Específicamente, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, del inglés: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) son una familia compuestos químicos que tienen gran relevancia en toxicología debido a que varios de ellos son genotóxicos y/o carcinogénicos (en el siguiente apartado se explican a detalle esos efectos).

Además, en las partículas se ha encontrado la presencia de diferentes metales. Este tipo de partículas son principalmente generadas de procesos metalúrgicos o por la combustión de fuentes fósiles como la gasolina o el diésel [Kelly and Fussell, 2012]. En las partículas de la Ciudad de México se ha reportado la presencia de metales como el Fe, Ni, Cr, Cu, Mn, V o Pb [Gutierrez-Castillo et al., 2006; Mugica et al., 2008; Roubicek et al., 2007], estos metales pueden promover reacciones redox que lleven a un estado de estrés oxidante celular. El término "estrés oxidante" se ha definido ampliamente como un desequilibrio de las moléculas pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las oxidantes, lo que podría provocar daños en las biomoléculas, como el DNA, las proteínas o los lípidos [Halliwell and Gutteridge, 2007]. Finalmente, la estructura general de las partículas consiste en un núcleo de carbono elemental al que pueden estar adsorbidas otras sustancias, como los PAHs, elementos metálicos,

elementos biológicos como la endotoxina y compuestos aniónicos o catiónicos [Ristovski et al., 2012]. La superficie de la partícula puede contener metales de transición solubles como el Fe, Cu, Cr y V, que pueden inducir la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) a través de reacciones de tipo Fenton y actuar como catalizadores de las reacciones de Haber-Weiss [Halliwell and Gutteridge, 2007]. La exposición a material particulado rico en metales puede inducir la generación de ROS y la inflamación en sujetos sanos [Schaumann et al., 2004]. El estrés oxidante en tejido pulmonar se ha asociado con COPD y asma [Nel et al., 2001; Sint et al., 2008]. Las ROS pueden reaccionar con macromoléculas como el DNA, proteínas o los lípidos generando alteraciones funcionales y estructurales. Específicamente, el daño a lípidos de membrana o lipoperoxidación se ha asociado con la exposición a PM. Los productos de oxidación del ácido araquidónico como los isoprostanos son excelentes marcadores de la peroxidación lipídica, los altos niveles de estos productos de la peroxidación lipídica se han asociado con varias enfermedades, como la aterosclerosis, el infarto de miocardio, la COPD, el asma, entre otras [Cracowski et al., 2002].

## ***1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos***

Los PAHs son moléculas de carbono que tienen dos o más anillos aromáticos fusionados en distintas configuraciones, pueden estar ordenados de forma lineal o de forma angular, la composición básica de estos compuestos consta simplemente de carbono e hidrógeno [Henkler et al., 2012]. Son moléculas lipofílicas con poca reactividad, esta característica permite que puedan atravesar las membranas celulares y de tal modo llegar a todos los órganos [Ginsberg and Atherholt, 1989]. Estos compuestos son generados a través de procesos de combustión incompleta de materia orgánica como madera, combustibles fósiles (gasolina o diésel), en procesos de refinación del petróleo, plantas de generación de energía basadas en la quema de carbón, incineradores de basura, estufas de carbón e incluso en el humo del tabaco y su formación es favorecida en temperaturas que están en el rango de los 650-900°C [Arenas-Huertero et al., 2011; Henkler et al., 2012]. Se ha reportado la presencia de PAHs en el aire, el agua y el suelo, siendo en este último el sitio en el que se han encontrado mayores concentraciones. En el caso de los cuerpos de agua, es en donde se han encontrado las concentraciones más bajas debido a la baja solubilidad de estos compuestos

[Ramesh et al., 2012]. Dada la amplia distribución de los PAHs, son compuestos que se consideran como agentes xenobióticos ubicuos, lo que los convierte en contaminantes prioritarios para su estudio [Kim et al., 2013; Ramesh et al., 2012]. Los niveles en el aire si bien no son los más altos, es mediante esta vía de exposición por la cual las poblaciones humanas están principalmente expuestas. Se han estudiado varios compuestos pertenecientes a esta familia, algunos con importancia epidemiológica debido a su asociación con diversos tipos de cáncer [IARC., 2010].

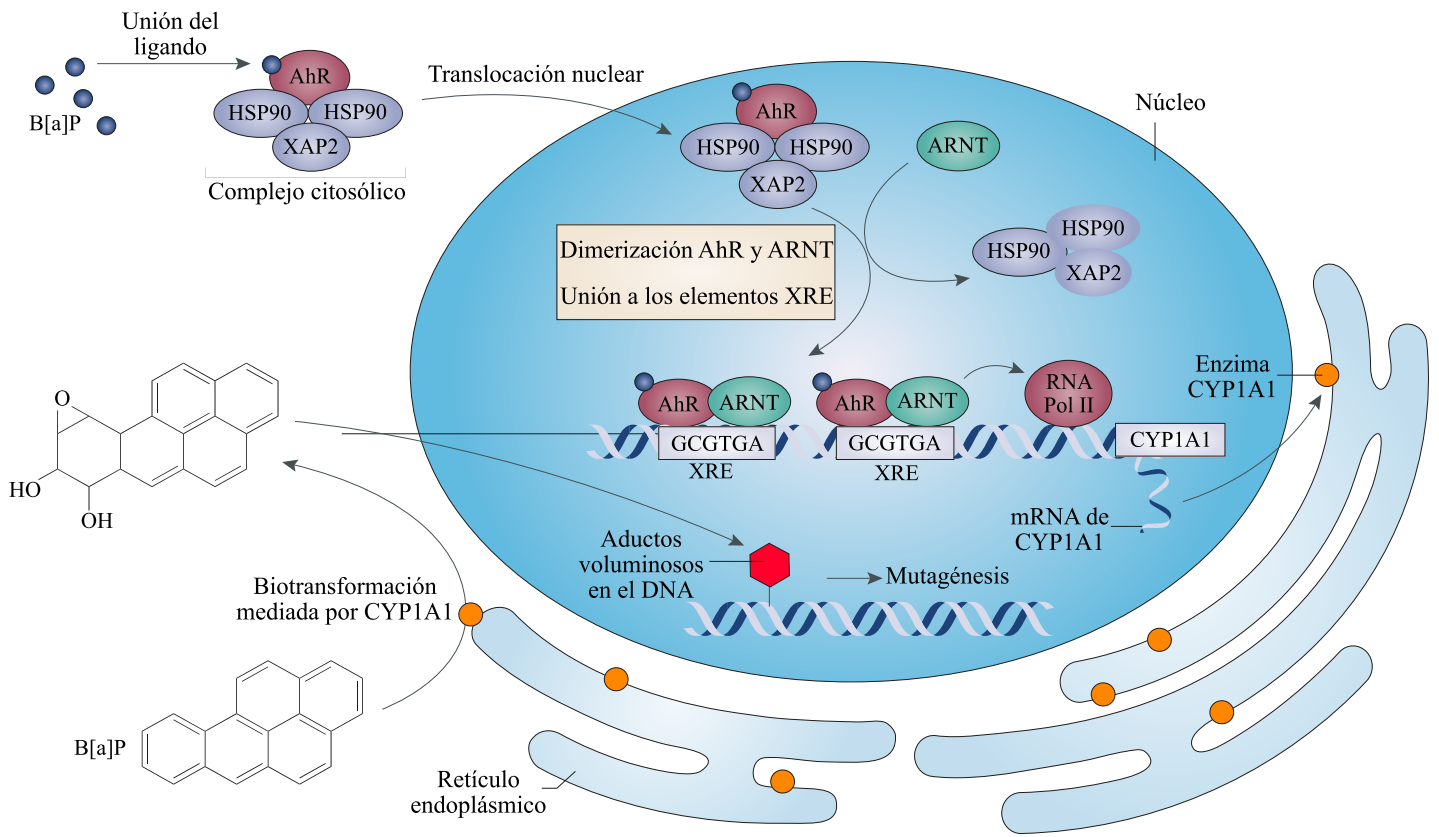
De manera general, los PAHs se encuentran principalmente en dos fases en el ambiente: *fase gaseosa* y *fase particulada*. Los PAHs de bajo peso molecular que consisten principalmente en moléculas de 2-4 anillos principalmente están en la *fase gaseosa* [Kim et al., 2013]. Aunque esos PAHs se consideran menos tóxicos, son capaces de generar daño, se tiene evidencia de algunos compuestos en la posible participación en procesos cancerígenos, por ejemplo, el PAH más simple es el naftaleno, este compuesto se encuentra catalogado por la IARC en el grupo 2B (posible carcinógeno para humanos) [IARC, 2002]. Los PAHs con más de 4 anillos están principalmente asociados al PM debido a su baja presión de vapor (*fase particulada*). La adsorción de los PAHs a las partículas depende de diferentes factores como la humedad, la temperatura y la composición del núcleo de la partícula [Kim et al., 2013]. En general, lo que se ha reportado para la Ciudad de México, las concentraciones de PAHs en la fase de gas y en la fase particulada dependen de diversos factores como la temperatura y la humedad ambiental. Los niveles más altos de PAHs en las partículas se han obtenido durante el invierno, cuando la temperatura es más baja [Kim et al., 2013; Mugica et al., 2010]. En el caso de PAHs de alto peso molecular, el benzo[a]pireno (B[a]P) se encuentra en el grupo 1 de la IARC y se ha convertido en uno de los PAHs más estudiados debido a sus efectos genotóxicos y a su asociación con cáncer [Dybing et al., 2013; IARC., 2010; Phillips, 2005].

Sin importar la ruta de administración, los PAHs se absorben y se distribuyen rápidamente en el organismo. El patrón de distribución de los PAHs en los órganos es muy amplio cuando la administración es intravenosa en modelos animales [Ginsberg and Atherholt, 1990]. Niveles detectables de benzo[a]pireno pueden ser observados en la mayoría de los órganos internos entre los primeros minutos-horas después de su administración [Ginsberg and Atherholt, 1989, 1990], esto es derivado de la composición lipofílica de estos compuestos.

### ***1.2.1 Metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la formación de aductos en el DNA***

La ruta del biotransformación del B[a]P y otros PAHs inicia con la activación de receptores nucleares como el AhR (del inglés: aryl hydrocarbon receptor) (Figura 2), este receptor tiene la capacidad de reconocer diferentes moléculas que tienen como característica principal ser moléculas planas [Xue and Warshawsky, 2005]. Dentro de los principales agonistas que se han descrito para este receptor se encuentran el TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), el B[a]P y otros PAHs [Murray et al., 2014].

En la figura 2 se muestra el mecanismo de reconocimiento y activación de los PAHs dentro de la célula. Inicialmente, el AhR se encuentra en el citoplasma formando un complejo con diferentes proteínas como XAP2 (del inglés: X-associated protein 2) y un dímero de HSP90 (del inglés: heat shock protein 90). Una vez que una molécula agonista como el B[a]P o el TCDD atraviesan la membrana plasmática pueden unirse al receptor lo cual favorece su translocación nuclear a través de la disociación de las proteínas chaperonas con las que coexiste en el citoplasma. En el núcleo, forma un complejo heterodimérico con ARNT (del inglés: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Este complejo proteínico AhR-ARNT tiene la capacidad de reconocer sitios en el genoma conocidos como elementos de respuesta a xenobióticos (XRE, del inglés: Xenobiotic Response Elements) con la secuencia 5'-T/G/TCGTGA/CG/TA/T-3'. Una vez unido el complejo AhR-ARNT al DNA, puede iniciarse la transcripción de genes que poseen la región XRE como los *CYP1A1*, *CYP1B1* o *NQO1* (del inglés: cytochrome p450 1A1, 1B1 y NADPH quinone oxidoreductase; respectivamente); estas enzimas son parte del metabolismo de diversas moléculas como el B[a]P [Baird et al., 2005; Murray et al., 2014].



**Figura 2.** Vía de bioactivación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. El B[a]P se une al receptor nuclear AhR el cual se encuentra habitualmente en el citoplasma acoplado a un complejo inhibitorio compuesto por HSP90 y XAP2. La unión de un ligando al receptor nuclear permite el desacoplamiento del complejo inhibitorio la translocación nuclear de AhR, posteriormente se facilita la interacción con el ARNT dentro del núcleo. El dímero conformado por el AhR (y su ligando) y ARNT permite el reconocimiento de secuencias en el DNA conocidas como Elementos de Respuesta a Xenobióticos (XRE, del inglés: xenobiotic response elements). El complejo heterodimérico funciona como factor de transcripción y puede promover la expresión de genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos como el *CYP1A1*. Una vez sintetizada la enzima *CYP1A1*, esta puede metabolizar al B[a]P y generar metabolitos reactivos que pueden unirse al DNA provocando aductos voluminosos y estos pueden causar mutaciones (Figura tomada y modificada de Murray et al., 2014).

Muchas de las moléculas que tienen actividad genotóxica y carcinogénica, no son biológicamente activas hasta entrar en procesos de modificación y activación metabólica en los que, los compuestos originales generan metabolitos reactivos que pueden reaccionar con macromoléculas celulares, que en este caso son de gran importancia si tienen la capacidad de unirse al DNA [Phillips, 2005].

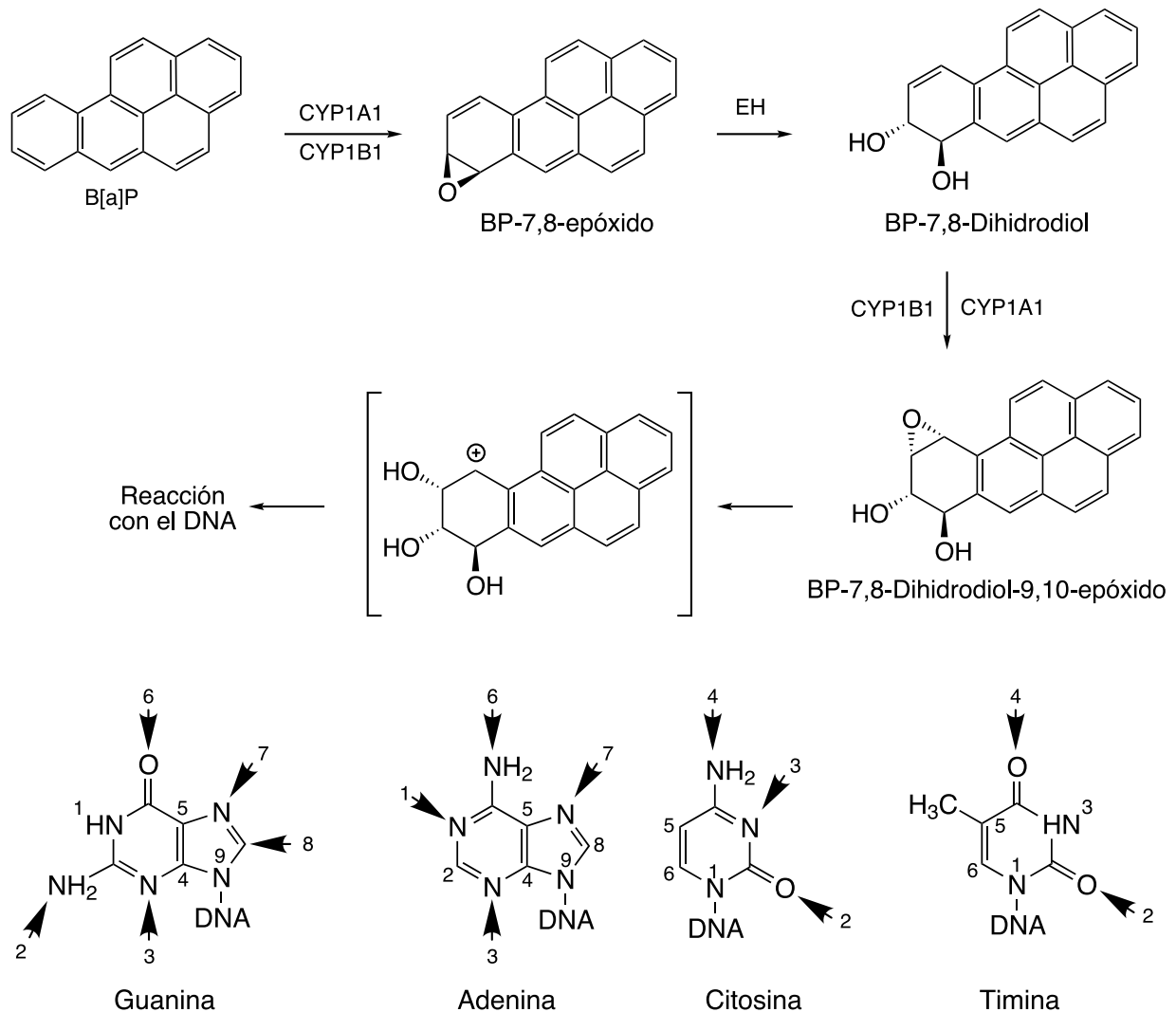


Los PAHs son metabolizados en la célula mediante tres principales vías: la vía CYP1A1/CYP1B1-Epoxido hidrolasa (CYP-EH), la vía citocromo peroxidasa y la vía de las Aldo-Ceto reductasas [Moorthy et al., 2015; Xue and Warshawsky, 2005]. En general, los PAHs son metabolizados por los CYPs y otras enzimas en fenoles, catecoles y quinonas, que al final producen compuestos como los dioles-epóxidos, carbocationes radicales o quinonas reactivas que pueden unirse al DNA [Moorthy et al., 2015]. En este trabajo nos centraremos en la principal vía CYP-EH de metabolismo de PAHs, usando como base la vía de biotransformación del benzo[a]pireno (Figura 3). El B[a]P es biotransformado en las células por los citocromos P450 (específicamente CYP1A1 y CYP1B1) lo cual convierte a las moléculas lipofílicas en sustratos más solubles agregando grupos polares. Inicialmente el CYP1A1/CYP1B1 agregan un grupo epóxido a la molécula generando el BP-7,8-epóxido, este metabolito es oxidado por la epóxido hidrolasa (EH) produciendo BP-7,8-dihidrodiol, finalmente de nuevo la actividad del CYP1A1/CYP1B1 forman otro grupo epóxido para formar BP-7,8 dihidrodiol-9,10-epoxido (BPDE; Figura 2) [Baird et al., 2005; Moorthy et al., 2015; Xue and Warshawsky, 2005]. El BPDE puede ser conjugado con moléculas endógenas a través de enzimas de Fase II que incluyen a las glutatión-S-transferasas (GSTM1, GSTP1) o las glucoronosil transferasas (UDP), el glutatión y el ácido glucurónico son moléculas empleadas en los procesos de conjugación. El conjugado resultante es más soluble en agua que los compuestos anteriores y así es reconocido y excretado de las células a través de los transportadores de membrana ABC.

En el caso del BPDE, esta molécula no es un sustrato adecuado para la enzima epóxido hidrolasa para romper el grupo epóxido y esta molécula es químicamente inestable (Figura 3). El grupo epóxido del BPDE puede romperse y formar un carbocatión, el metabolito transitorio que se forma tiene la vida media suficiente como para viajar al núcleo y reaccionar con el DNA formando enlaces covalentes estables con las bases nitrogenadas, estas modificaciones químicas de las bases nitrogenadas del DNA son denominadas como aductos [Phillips, 2005]. Estas modificaciones químicas tienen la capacidad de alterar la estructura tridimensional del DNA y provocar cambios en la expresión de genes o favorecer la inserción de mutaciones puntuales, del tipo transversiones G-T [Poirier, 2004].

Como se mencionó previamente, los dioles epóxido tienen la capacidad de poder interactuar con el DNA. Sin embargo, tal interacción no es equitativa para las 4 bases nitrogenadas que conforman el DNA (Figura 3). Se ha reportado la preferencia de los dioles epóxido de varios PAHs incluyendo el B[a]P por las guaninas. De manera general, los PAHs que tienen una estructura molecular plana tienen preferencia para formar aductos en los residuos de guanina, con una preferencia que oscila entre el 80-95% de los aductos generados, las adeninas son los nucleótidos que forman aductos frecuentemente después de las guaninas [Sayer et al., 1991; Xue and Warshawsky, 2005].

La alta reactividad de los dioles epóxido por las bases púricas del DNA está relacionada con la formación de aductos en secuencias ricas de guaninas. Es decir, la formación de aductos en el DNA no es aleatoria y obedece a diversos factores, de los más importantes son la cantidad de residuos de guanina. Se han identificado sitios frecuentes de formación de aductos en genes importantes, tal fenómeno está relacionado con la secuencia de nucleótidos. Se ha reportado la formación preferencial en sitios específicos de los genes *P53* y *KRAS* [Denissenko et al., 1996; Tretyakova et al., 2002]. Otro factor que puede influir la preferencia de la formación de aductos en el DNA es el estado de metilación, se ha reportado la formación preferencial de los aductos en el DNA en sitios CpG metilados. Es decir, la presencia del grupo metilo de la 5-metil-citosina adyacente a una guanina, incrementa la frecuencia de formación de aductos comparada con una secuencia en dinucleótidos CpG no metilados [Denissenko et al., 1996; Herbstman et al., 2012; Hu et al., 2003; Tretyakova et al., 2008; Tretyakova et al., 2002].



**Figura 3.** Pasos enzimáticos del metabolismo del benzo[a]pireno (B[a]P). El compuesto parental B[a]P es oxidado a través de los citocromos CYP1A1 y CYP1B1 para formar el metabolito BP-7,8-epóxido, posteriormente este compuesto es sustrato de la enzima Epóxido Hidrolasa (EH), la actividad de esta enzima genera como producto al BP-7,8 dihidrodiol el cual es metabolizado por los CYP1A1 y CYP1B1 para generar el BP-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido. Este diol-epóxido puede ser conjugado con moléculas endógenas como el Glutatión o el Ácido Glucorónico. La acumulación del diol-epóxido puede provocar la ruptura del grupo epóxido y generar un carbocatión reactivo que puede reaccionar con el DNA. De las 4 bases nitrogenadas, la guanina es la base en la que principalmente se forman los aductos. Las flechas en las estructuras de las bases muestran los sitios en los cuales pueden formarse aductos (Figura tomada y modificada de Phillips, 2005).

### ***1.2.2 Importancia epidemiológica de los niveles de aductos en el DNA***

La primera asociación epidemiológica entre un agente tóxico y una enfermedad fue relacionada en el año de 1775 por el médico y cirujano británico Percival Pott, en ese año fue establecida la asociación entre el desarrollo de cáncer de escroto y el contacto con el hollín (el cual posee altos niveles de PAHs) presente en las chimeneas, esta asociación fue establecida en los limpiadores de chimeneas que eliminaban la acumulación de hollín con poca protección o desnudos [Baird et al., 2005; Brown and Thornton, 1957; Poirier, 2004]. Posteriormente, diversas autoridades europeas recomendaron el aseo frecuente en los limpiadores de chimeneas. Con la implementación de esta práctica, 100 años después ya se reportaban pocos casos de cáncer escrotal en los trabajadores de las chimeneas. Sin embargo, en Inglaterra no se había implementado tal práctica, los casos de cáncer escrotal permanecían todavía elevados [Poirier, 2004].

Los aductos en el DNA son considerados como un biomarcador de dosis biológicamente efectiva debido a que representan la cantidad de agentes genotóxicos unidos covalentemente al DNA y que han escapado de los procesos de desintoxicación y reparación del DNA [Castano-Vinyals et al., 2004; Godschalk et al., 2003; Poirier, 1997]. Además, los aductos en el DNA han sido considerados como un biomarcador de riesgo para desarrollar distintos tipos de cáncer [Poirier, 2004].

Los aductos en el DNA, y principalmente los de tipo voluminosos (de ahora en adelante aductos) provenientes de moléculas de alto peso molecular como los PAHs, pueden interferir con la transcripción regular de genes importantes y afectar el proceso de replicación del DNA que induce mutaciones en secuencias críticas como los genes *P53* o *RAS* que pueden contribuir a la tumorigénesis [Denissenko et al., 1998; Denissenko et al., 1996; Harris, 1996; Luch, 2005, 2006].

Se ha descrito que las mutaciones provocadas por PAHs generan firmas mutacionales en carcinomas típicos de las vías aéreas incluyendo cáncer de pulmón o de laringe. Estos tipos de cáncer son provocados por la exposición al humo del tabaco, por lo que se considera a los aductos en el DNA como un evento necesario en el proceso de carcinogénesis química [Alexandrov et al., 2016; Alexandrov et al., 2013].

### 1.2.3 Polimorfismos en enzimas del metabolismo de xenobióticos

Cuando en una población existen múltiples alelos de un gen se dice que este gen presenta polimorfismo genético. Estas variantes genéticas en el genoma humano, pueden originarse por Repeticiones Cortas en Tándem (STRs), Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs) o Variantes en el Número de Copias (CNVs) [Beedanagari et al., 2014]. Específicamente, los SNPs han mostrado ser relevantes en enzimas del metabolismo de xenobióticos, debido a que pueden afectar su expresión o actividad. Estos cambios en las enzimas pueden tener consecuencias en los niveles de daño provocados por el agente tóxico. Se han reportado variantes genéticas en enzimas de fase I y de fase II en los procesos de desintoxicación de xenobióticos [Banks et al., 2014].

Se ha documentado la presencia de variantes alélicas de riesgo en genes implicados en el metabolismo de los PAHs. Las variaciones genéticas en la actividad enzimática pueden alterar el efecto de la exposición ambiental. Estudios epidemiológicos han vinculado varios polimorfismos con niveles más altos de daño en el DNA o un mayor riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer [Georgiadis et al., 2004; Godschalk et al., 2003; Johansson and Ingelman-Sundberg, 2011; Zanger and Schwab, 2013]. Por ejemplo, las variantes *GSTM1\*0* (delección) y *CYP1A1* se asociaron con un mayor riesgo de parto prematuro y un menor peso al nacer de los neonatos de madres altamente expuestas a PM<sub>10</sub> en Corea del Sur [Suh et al., 2008; Suh et al., 2007]. Las variantes nulas de *GSTT1* y *GSTM1* también se han asociado con bajo peso al nacer en una población guatemalteca [Thompson et al., 2014]. Algunos polimorfismos en las enzimas CYP450 implicados en el metabolismo de los PAHs se relacionaron con los niveles de aductos en el DNA en muestras de sangre de madres y sus recién nacidos expuestos a PAHs [Iyer et al., 2016; Wang et al., 2008].

En estudios realizados en cohortes de habitantes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) expuestos al humo del tabaco o al PM se encontró que la presencia de variantes de riesgo como *CYP1B1\*3* (rs1056836), *GSTM1\*0* y *MGMT L84F* se asocia con un incremento en los niveles de aductos en el DNA de sangre periférica [Garcia-Suastegui et al., 2011; Molina et al., 2013].

Es importante destacar que, aunque la enzima MGMT (del inglés: O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase) no está encargada de la reparación de aductos, el polimorfismo *MGMT L84F* se ha asociado con mayores niveles de aductos en el DNA [Duan et al., 2013; Molina et al., 2013]. Se ha sugerido que el mecanismo mediante el cual MGMT tiene efecto sobre los niveles de aductos, es mediante la posible interacción con receptores nucleares, como el receptor de estrógenos [Teo et al., 2001]. MGMT podría entonces interactuar con el motivo LXXLL de los receptores nucleares inhibiendo su función [Bobustuc et al., 2012; Gouws and Pretorius, 2011; Kaina et al., 2007; Teo et al., 2001]. Se ha hipotetizado que MGMT podría interactuar con la proteína AhR inhibiendo la transcripción de CYP1A1 y CYP1B1, disminuyendo así la formación de aductos en el DNA y la variante *MGMT L84F* podría de esa manera modular los niveles de aductos [Molina et al., 2013].

### ***1.3 Niveles de micronúcleos y su asociación con la exposición ambiental a PM***

Además de los aductos en el DNA, otro tipo de daño genotóxico que se ha asociado con la exposición al aire contaminado es la frecuencia de micronúcleos. Los micronúcleos (MN) son pequeños cuerpos extranucleares que son identificables fácilmente a través de microscopia en células que han pasado por procesos de división celular y que los fragmentos cromosómicos no tienen centrómeros. Los MN pueden ser el resultado de un amplio espectro de alteraciones celulares, que van desde el mal acoplamiento de la tubulina, defectos en las proteínas que conforman el cinetocoro, modificaciones epigenéticas, formación de puentes nucleoplasmáticos o rompimientos de doble cadena en el DNA [Fenech et al., 2011; Pavanello and Lotti, 2014]. La frecuencia de MN se ha asociado con un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer [Bonassi et al., 2008; Bonassi et al., 2007]. Además, se sabe también que la frecuencia de este biomarcador incrementa con la edad [Kirsch-Volders et al., 2011; Peace and Succop, 1999]. Sin embargo, se han usado para evaluar la exposición a agentes clastogénicos o aneugénicos, por ejemplo, se ha usado para evaluar la exposición a PAHs o PM [Levario-Carrillo et al., 2005; Pavanello et al., 2009; Pavanello et al., 2008; Pavanello et al., 2010; Roubicek et al., 2007].

La evaluación de la frecuencia de MN se ha llevado a cabo *in vitro* en distintas líneas celulares y en muestras *in vivo* incluyendo sangre periférica, en muestras de médula ósea o

linfocitos. Sin embargo, el ensayo de detección de MN en linfocitos humanos es el método más usado para evaluar la exposición a agentes genotóxicos [Beedanagari et al., 2014; Fenech et al., 2011; Pavanello and Lotti, 2014].

#### ***1.4 Exposición gestacional al material particulado e hidrocarburos aromáticos policíclicos***

En 1992 se propuso la hipótesis DOHAD (Developmental Origins of Health and Disease) por Barker, en la cual se propone que las alteraciones en el ambiente intrauterino pueden incrementar el riesgo a desarrollar diversas enfermedades en la edad adulta. Las alteraciones *in utero* pueden corresponder a adaptaciones a factores maternos que pueden ser perjudiciales posteriormente en la vida extrauterina [Barker, 2004, 2007; Perera and Herbstman, 2011; Swanson et al., 2009]. Durante los eventos de exposición prenatal a agentes tóxicos, la madre es afectada por los agentes tóxicos y por consiguiente el feto también. Además, se debe considerar que las células reproductivas del feto pueden estar sometidas a los efectos tóxicos del agente en cuestión, por lo que durante un evento de exposición gestacional, tres generaciones pueden estar afectadas, lo cual podría implicar alteraciones transgeneracionales [Perera and Herbstman, 2011].

La transferencia de los PAHs a través de la placenta se ha documentado en modelos animales, y se ha reportado que los niveles de dioles epóxidos pueden llegar a ser hasta un orden de magnitud menor que los detectados en sangre materna [Neubert and Tapken, 1988; Srivastava et al., 1986]. Además, el mismo fenómeno podría estar también ocurriendo en poblaciones humanas expuestas a PAHs, se ha propuesto que el feto puede llegar a ser hasta 10 veces más susceptible a los efectos tóxicos de los PAHs [Perera and Edwards, 2011].

En estudios poblacionales se encontró que los niveles de aductos en el DNA de las madres correlacionan con los aductos detectados en sangre de cordón umbilical, lo cual demuestra que la exposición materna a PAHs afecta directamente los niveles de daño en el feto [Jedrychowski et al., 2013]. Además, en diversos estudios se ha encontrado que los niveles de aductos detectados en recién nacidos son siempre iguales o superiores a los detectados en sangre materna, y el efecto es el mismo en madres residentes de ciudades con diferente grado de contaminación [Perera et al., 2005b; Topinka et al., 2009].

La exposición gestacional a contaminantes ambientales como el PM, está asociada con diferentes efectos a nivel del desarrollo y puede tener implicaciones clínicas. La exposición *in utero* al humo del tabaco y/o PAHs se ha asociado con un incremento en el riesgo a presentar restricción intrauterina del crecimiento (IUGR) [Choi et al., 2008; Dejmek et al., 2000]. Se han realizado investigaciones en las que se ha evaluado el efecto de la exposición gestacional a PAHs y el incremento en el riesgo a presentar nacimientos pretérmino o bajo peso al nacer [Bell et al., 2010; Brauer et al., 2008; Ebisu et al., 2016; Ha et al., 2014; Padula et al., 2014]. Los datos publicados sugieren que el periodo crítico de exposición parece ser el último trimestre del embarazo. El riesgo a desarrollar estos efectos puede estar en función de variantes alélicas de riesgo en genes relacionados con el metabolismo de los PAHs como los citocromos P450 y las glutatión S-transferasas [Sram et al., 2006; Suh et al., 2008; Suh et al., 2007; Wang et al., 2008].

Hay evidencia de los efectos de la exposición a PM o PAHs durante el embarazo y el desarrollo del sistema nervioso central. Algunos trabajos han mostrado la sensibilidad del feto a la exposición ambiental a PM o PAHs [Costa et al., 2017; Heusinkveld et al., 2016]. Cambios en el desarrollo de las estructuras del sistema nervioso central pueden afectar las funciones cognitivas básicas y tener consecuencias directas en la edad adulta y afectar la calidad de las personas [Harris et al., 2016; Morales-Suarez-Varela et al., 2017]. Se ha demostrado mediante imágenes de resonancia magnética que a la edad de 9 años, la exposición gestacional a los PAHs pueden afectar negativamente el tamaño de la sustancia blanca cerebral y las medidas del hemisferio izquierdo, lo cual se ve reflejado en alteraciones en pruebas cognitivas y sociales de los niños afectados [Peterson et al., 2015]. En niños con edad de 3 años aproximadamente, la exposición prenatal a PAHs se asoció con un riesgo incrementado de presentar retraso del desarrollo neurológico en comparación con los niños menos expuestos. Además, los niveles de BDNF (del inglés: brain-derived neurotrophic factor; neurotrofina fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central) en sangre del cordón umbilical se asociaron negativamente con los niveles de aductos en el DNA [Perera et al., 2015; Perera et al., 2006].

A nivel epigenético se tiene evidencia de los efectos adversos del PM y sus constituyentes a nivel de metilación del DNA, se ha asociado con cambios en la expresión de genes



importantes en patologías como el asma o en la activación de retrotransposones. Se tiene evidencia que los mecanismos de reparación del DNA como la reparación por escisión de bases (BER, del inglés: base excision repair) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés: nucleotide excision repair) pueden participar de manera indirecta en la desmetilación activa del DNA [Grin and Ishchenko, 2016; Wu and Zhang, 2010]. Se ha sugerido que el mecanismo NER podría eliminar los patrones de metilación del DNA [Sadikovic and Rodenhiser, 2006; Sadikovic and Rodenhiser, 2012]. De manera más específica, se ha descrito que la exposición a largo plazo a PAHs provoca la hipometilación global del genoma en muestras de cordón umbilical [Herbstman et al., 2012; Herbstman et al., 2013; Wilhelm-Benartzi et al., 2012]. De manera particular, en estudios *in vitro* se ha demostrado el efecto de la exposición a B[a]P sobre los patrones de metilación de las regiones promotoras de los elementos repetidos LINE-1 (del inglés: long interspersed nuclear element-1) [Teneng et al., 2011]. En otros estudios, se ha observado que la exposición gestacional a PAHs y la metilación de los ciertos genes, como ACSL3 (del inglés: Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3) incrementan de manera muy importante el riesgo desarrollar asma durante los primeros 5 años de vida [Perera et al., 2009a]. También, cambios en la metilación del promotor de IFN $\gamma$  (del inglés: interferon gamma) sugieren una mayor susceptibilidad de a desarrollar asma frente a exposiciones *in utero* a PAHs [Tang et al., 2012].

#### ***1.4.1 Importancia de la barrera placentaria en eventos de exposición gestacional a PM***

La placenta tiene diferentes funciones a lo largo del desarrollo gestacional. La placenta se empieza a formar aproximadamente entre el día 6-7 posterior a la concepción y en ese estadio inicial tiene como función facilitar la implantación del embrión [Myren et al., 2007]. Es una estructura que conecta dos organismos que son genéticamente distintos y posterior al proceso de implantación cumple la función principal de transporte de nutrientes, oxígeno y hormonas al feto en desarrollo. Requiere de una gran irrigación vascular y altos niveles de producción de energía para proveer al feto de los nutrientes necesarios [Syme et al., 2004; Vähäkangas et al., 2014].

En toxicología, la placenta tiene gran relevancia porque es un órgano que controla el flujo de agentes xenobióticos a la sangre fetal. Se ha estudiado el efecto de estos agentes sobre la placenta y de manera contraria, el metabolismo de la placenta ante los xenobióticos [Myllynen et al., 2005]. En el tejido placentario se ha demostrado que se expresan todas las enzimas para el metabolismo de los PAHs, específicamente, la placenta tiene todas las enzimas para poder metabolizar el B[a]P [Hakkola et al., 1996; Myllynen et al., 2005; Myren et al., 2007] y posiblemente, la presencia de estas enzimas ha permitido la detección de aductos en este tejido [Karttunen et al., 2010; Topinka et al., 2009]. Se ha demostrado que la exposición al humo del tabaco puede inducir enzimas de fase I como el CYP1A1 en placenta [Suter et al., 2010]. Además, se ha reportado la expresión del CYP1A1 y del CYP1B1 en otros tejidos fetales distintos a la placenta como el hígado, cerebro, riñón y pulmón [Hakkola et al., 1997]. Esta información sugiere que los tejidos fetales podrían tener participación en el metabolismo de diferentes agentes xenobióticos, específicamente en el metabolismo de los PAHs. Es importante mencionar que la detección de aductos en placenta es posible, a pesar de que es un tejido que al momento del parto ya se encuentra en degradación [Randerath et al., 1989].

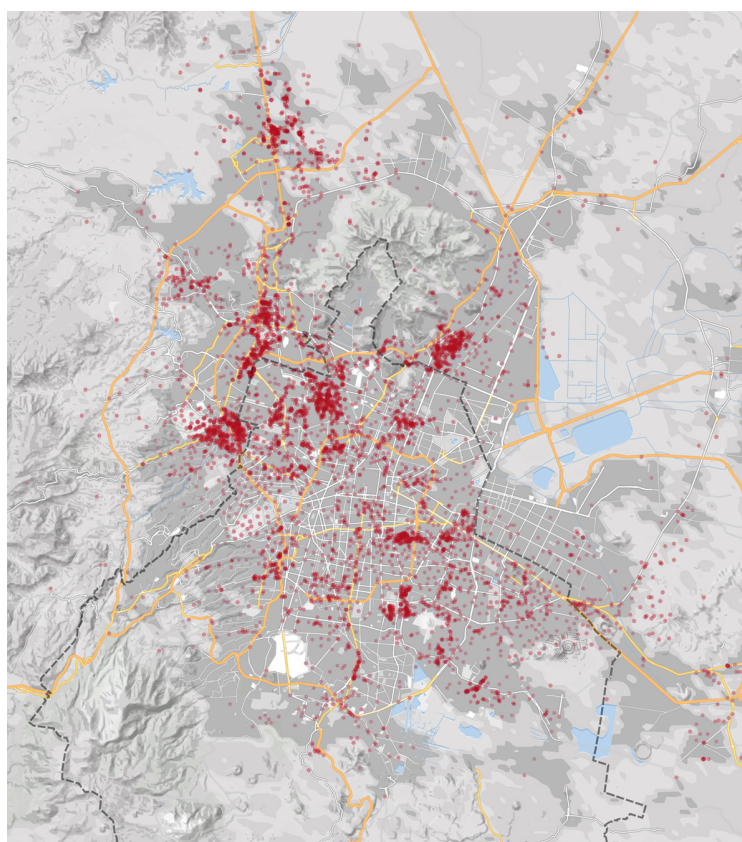
La mayoría de las sustancias que tienen la capacidad de cruzar la placenta, comparten la característica de ser moléculas lipofílicas, lo cual les permite atravesarla a través de difusión pasiva [Myllynen et al., 2005; Myren et al., 2007]. Inclusive, se ha reportado que la placenta es un órgano propenso a acumular compuestos liposolubles [Vähäkangas et al., 2014].

### ***1.5 Problemática de contaminantes en la ZMCM***

De acuerdo con la descripción de la Secretaría de Medio Ambiente [SEDEMA] la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) tiene una superficie de 7,732 km<sup>2</sup>, de la que el 19% lo cubre la Ciudad de México y el 81% restante, el Estado de México. Posee una altitud promedio de 2240 metros sobre el nivel del mar. La altitud en la que se encuentra la ZMCM con una concentración de oxígeno 23% menor a la que se puede encontrar al nivel del mar, ocasiona que los procesos de combustión sean deficientes, por lo tanto, sean emitidas mayores cantidades de contaminantes [SEDEMA, 2008, 2010, 2014]. Anualmente en la

ZMCM se generan hasta 31 mil toneladas de  $PM_{10}$  de las cuales el 41% son  $PM_{2.5}$  (Figura 4; aproximadamente 13 mil toneladas) [SEDEMA, 2014].

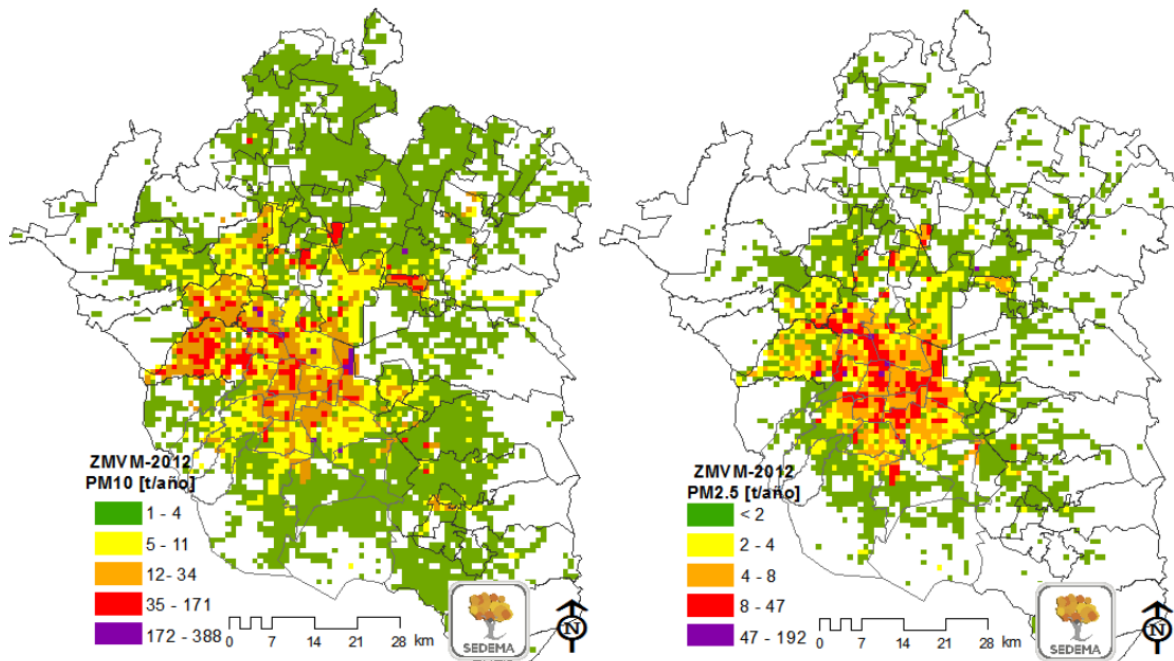
La ZMCM consta de 16 alcaldías de la Ciudad de México y 59 municipios del Estado de México en donde habitan alrededor de 21 millones de personas, circulan aproximadamente 5.3 millones de vehículos (80% transporte vehicular particular, 7% transporte público y 13% transporte de carga) y se tiene registro de 2410 establecimientos comerciales y 1935 industrias (Figura 4). En conjunto, toda esta actividad favorece la emisión de los contaminantes en la ZMCM [SEDEMA, 2014].



**Figura 4.** Distribución de las principales vialidades e industrias en la ZMCM. En la imagen se pueden apreciar en puntos rojos los sitios en los cuales se encuentran industrias reportadas ante la Secretaría de Medio Ambiente. Los conglomerados de industrias se encuentran principalmente en la zona norte de la Ciudad de México. Las líneas amarillas muestran las principales vialidades y autopistas. En líneas blancas se muestran las vialidades primarias (Figura tomada del Informe de la Calidad del Aire en la Ciudad de México, SEDEMA, 2014).

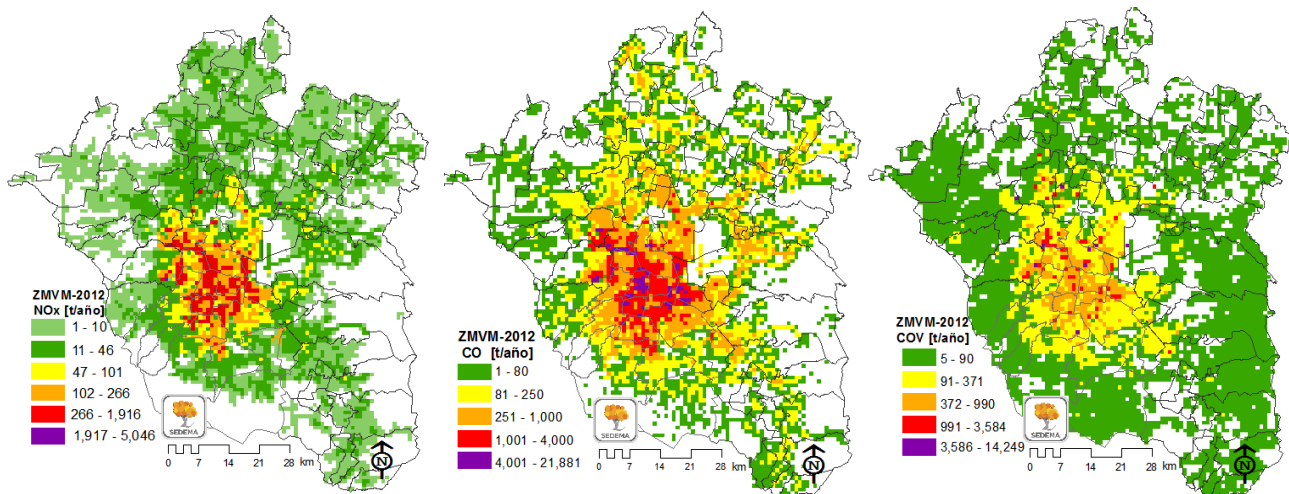
La ZMCM está delimitada por un complejo de cadenas montañosas en el sur que pertenecen al Eje Neovolcánico Transversal que dificultan la libre dispersión de los contaminantes generados por diversas actividades antropogénicas. Gran parte de los componentes del aire contaminado en la ZMCM son generados en el norte de la ciudad, se puede notar que los niveles más altos de  $PM$ , óxidos de nitrógeno y monóxido de carbono se localizan en esa zona (Figura 5 y 6) [SEDEMA, 2010]. La posición latitudinal de la ZMCM es otro factor

importante involucrado en la generación de contaminantes, ya que la radiación solar al ser intensa favorece reacciones fotoquímicas que tienen como producto principal la generación de altos niveles de ozono. Los altos niveles de contaminantes en varias zonas de la ciudad son generados principalmente por la intensa actividad vehicular y la presencia de fuentes fijas de emisión; en el caso de las zonas periféricas de la ZMCM, las emisiones son atribuidas a las vialidades sin pavimentar y las concentraciones son más bajas [SEDEMA, 2008].



**Figura 5.** Distribución espacial de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en la ZMCM en el año 2012. En escala de colores representan las concentraciones de PM<sub>10</sub> (izquierda) y PM<sub>2.5</sub> (derecha), en ambos mapas se puede apreciar la distribución predominante de las partículas en la zona norte de la Ciudad de México, lo cual se asocia con la gran cantidad de fuentes estacionarias de emisión de contaminantes (Figura tomada de SEDEMA, 2012).

En la ZMCM existe una Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA), que consta de 32 estaciones de monitoreo distribuidas en toda la zona metropolitana y registran los niveles de los contaminantes criterio en tiempo real cada hora. En la Tabla I se enlistan las estaciones de monitoreo que registran concentraciones ambientales de PM en la ZMCM y que fueron usadas para estimar los niveles de exposición en nuestro estudio.



**Figura 6.** Distribución espacial de contaminantes gaseosos en la ZMCM en el año 2012. En escala de colores se pueden apreciar las concentraciones de NOx (óxidos de nitrógeno; izquierda), CO (monóxido de carbono; centro) y COVs (compuestos orgánicos volátiles; derecha). Estos contaminantes son precursores de O<sub>3</sub> (ozono), a través de reacciones fotoquímicas en la atmósfera se produce el O<sub>3</sub>, el cual junto con el PM es uno de los contaminantes más importantes en la ZMCM. La distribución de los contaminantes predomina en la zona norte de la Ciudad (Figura tomada y modificada de SEDEMA, 2012).

**Tabla I. Estaciones de monitoreo de la RAMA que registran concentraciones ambientales de PM en la ZMCM.**

PM <sub>2.5</sub>		PM <sub>10</sub>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Camarones</li> <li>• Gustavo A. Madero</li> <li>• San Agustín</li> <li>• UAM Xochimilco</li> <li>• San Juan de Aragón</li> <li>• Tlalnepantla</li> <li>• Xalostoc</li> <li>• Pedregal</li> <li>• Coyoacán</li> <li>• Benito Juárez</li> <li>• Hospital General</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Investigaciones Nucleares</li> <li>• Merced</li> <li>• Santa Fe</li> <li>• Miguel Hidalgo</li> <li>• Milpa Alta</li> <li>• Nezahualcóyotl</li> <li>• UAM Iztapalapa</li> <li>• Ajusco Medio</li> <li>• Ajusco</li> <li>• Centro de Ciencias de la Atmósfera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acolman</li> <li>• Atizapán</li> <li>• Milpa Alta</li> <li>• Miguel Hidalgo</li> <li>• Camarones</li> <li>• Cuautitlán</li> <li>• Tláhuac</li> <li>• Cuajimalpa</li> <li>• FES Acatlán</li> <li>• San Agustín</li> <li>• UAM Iztapalapa</li> <li>• Santa Fe</li> <li>• Tlalnepantla</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tultitlán</li> <li>• Merced</li> <li>• Ajusco Medio</li> <li>• Villa de las Flores</li> <li>• Xalostoc</li> <li>• Hospital General</li> <li>• Pedregal</li> <li>• Chalco</li> <li>• Iztacalco</li> <li>• Benito Juárez</li> <li>• Investigaciones Nucleares</li> </ul>

Se ha observado que uno de los principales componentes del PM presente en la ZMCM, es el carbono elemental (EC) y el carbono orgánico (OC), este último en mayor proporción [De Vizcaya-Ruiz et al., 2006; Mugica et al., 2010; Mugica et al., 2008; Mugica et al., 2009]. En un estudio realizado en México, se analizó la composición del PM<sub>2.5</sub> en diversos procesos de combustión. De manera muy interesante, se observó que independientemente del tipo de material orgánica usada en los procesos de combustión, el principal componente en el PM<sub>2.5</sub> eran los compuestos asociados al carbono orgánico [Mugica et al., 2008]. Dentro del OC se encuentran los PAHs que tienen una enorme relevancia epidemiológica, como ya se mencionó estos compuestos son agentes mutagénicos y carcinogénicos [Dybing et al., 2013; IARC, 2013, 2015].

Se ha demostrado que el PM de la ZMCM tiene la capacidad de inducir la producción de citocinas proinflamatorias en ensayos *in vitro* con diversas líneas celulares [Manzano-Leon et al., 2013; Sanchez-Perez et al., 2014]. Igualmente, en ensayos *in vitro*, se ha observado que las partículas de la ZMCM, específicamente las PM<sub>10</sub>, tienen la capacidad de inducir daño al DNA [Sanchez-Perez et al., 2009]. Además se ha documentado que hay un incremento de la frecuencia de micronúcleos [Roubicek et al., 2007] y daño al DNA evaluado mediante ensayo cometa [De Vizcaya-Ruiz et al., 2006], los trabajos citados anteriormente fueron realizados en células pulmonares A549. Adicionalmente, se tiene evidencia que muestra que las PM de la ZMCM tienen el potencial de inducir apoptosis [Alfaro-Moreno et al., 2002]. También se ha documentado que el PM de la ZMCM tiene la capacidad de inducir aductos en el DNA, esto evaluado igualmente en células A549 [Salcido-Neyoy et al., 2015] y en modelos de exposición aguda y subcrónica en ratas Sprague-Dawley [Aztatzi-Aguilar et al., 2018; Maciel-Ruiz, 2013].

Se ha demostrado que las partículas de la ZMCM que tiene diferencias en su composición, dependiendo de la zona en la que se hayan colectado. Las partículas provenientes de la zona norte han mostrado tener un mayor contenido de PAHs, en cambio las partículas de la zona centro, predominan los metales [Manzano-Leon et al., 2013]. Las concentraciones de PM en la ZMCM son dependientes de la estación del año (estación seca y estación de lluvias) [Garcia-Suastegui et al., 2011; Mugica et al., 2008; SEDEMA, 2008, 2010]. Se ha descrito que los niveles de PAHs asociados al PM son más altos en la época seca del año [Amador-

Munoz et al., 2011; Mugica et al., 2010]. Estas variaciones están relacionadas con la severidad de los efectos tóxicos. Un estudio longitudinal en adultos jóvenes en la ZMCM mostró que los niveles de aductos en el DNA guardan una relación directa con la época del año, siendo más altos durante la estación seca [García-Suastegui et al., 2011].

En la ZMCM la evidencia epidemiológica de los efectos del PM y los PAHs en periodos vulnerables de la vida como el desarrollo gestacional es prácticamente nula. No se conoce el potencial de estos contaminantes para generar daño en el DNA de la población expuesta. Previo a este estudio, solamente en el trabajo de García-Suastegui et al., 2011 se evaluó el potencial de los PAHs ambientales para formar aductos en el DNA en población expuesta a partículas ambientales.

Finalmente, a pesar de los esfuerzos gubernamentales para mejorar la calidad del aire, no ha sido posible cumplir los niveles mínimos de exposición a PM que recomienda la Norma Oficial Mexicana y la OMS (para  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$ ). Es importante resaltar que en México no existe hasta el momento ninguna norma que regule los niveles de PAHs en el ambiente, por lo que es necesario reportar los efectos que tienen estos compuestos en las personas expuestas de la ZMCM para conocer su potencial tóxico. Los datos presentados en el presente trabajo son la primera evidencia molecular de los efectos del PM en la salud perinatal, debido a que los niveles de daño al DNA pueden tener consecuencias en la niñez y la vida adulta.

## ***2. Justificación***

En la ZMCM debido a las actividades antropogénicas, a la alta densidad poblacional y a las condiciones geográficas existen grandes emisiones de contaminantes a la atmósfera, dentro de los cuales se incluye al PM y el O<sub>3</sub>. La ZMCM es una de las zonas más contaminadas de México y es muy importante poder evaluar los efectos de tales contaminantes en periodos importantes de la vida como el desarrollo gestacional. Los niveles de aductos en el DNA en muestras fetales no se han determinado en la ZMCM en ningún estudio previo. La frecuencia de micronúcleos, así como los aductos en el DNA son marcadores que han sido asociados con daño genotóxico, con potencial en implicaciones a largo plazo como el desarrollar cáncer. El estudio de estos marcadores nos podría permitir conocer los efectos y las posibles consecuencias de vivir en una ciudad con elevados niveles de contaminación. Se sabe que el feto es vulnerable a los cambios en el ambiente intrauterino, incluyendo la exposición a agentes xenobióticos. Por tal motivo, es fundamental conocer en qué grado y a qué niveles la exposición a contaminantes atmosféricos está afectando a los recién nacidos expuestos a PM en la Ciudad de México.



### **3. Hipótesis**

Las concentraciones ambientales de contaminantes atmosféricos como el PM y el O<sub>3</sub> incrementarán los marcadores de daño al DNA tales como los aductos en el DNA y la frecuencia de micronúcleos. Del mismo modo, el estrés oxidante en muestras de sangre materna y de sangre de cordón umbilical se asociará con los niveles de contaminantes atmosféricos. Además, los niveles de aductos estarán relacionados con las variantes alélicas de riesgo de la población.

### **4. Objetivo general**

Evaluar los niveles de daño genotóxico y de estrés oxidante derivados de la exposición prenatal a PM y O<sub>3</sub> en mujeres gestantes de la ZMCM. Analizar si existen grupos más susceptibles a los efectos tóxicos de los PAHs al ser portadores de variantes de riesgo.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Evaluar los niveles de aductos en el DNA de sangre de cordón umbilical de recién nacidos y en sangre periférica de madres.
- Identificar los polimorfismos en las muestras para las siguientes variantes alélicas *GSTM1\*0*, *CYP1B1\*3*, *NQO1\*2* y *MGMT L84F* y ver su relación con los niveles de aductos e isoprostanos en madres y recién nacidos.
- Correlacionar los niveles de aductos en las madres y los recién nacidos con los niveles de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> reportados por la RAMA de acuerdo con el lugar de residencia.
- Determinar los niveles de 8-isoprostano (*8-iso-PGF<sub>2α</sub>*) en muestras de plasma materno y plasma de cordón umbilical y analizar su relación con los contaminantes analizados.
- Determinar la frecuencia de micronúcleos y los parámetros celulares en cultivos de linfocitos maternos y de cordón umbilical y analizar su asociación con los niveles de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> en la ZMCM de acuerdo con el sitio de residencia.

## **5. Métodos**

### **5.1 Obtención de muestras biológicas**

Se colectaron muestras de sangre y orina de 150 de mujeres que aceptaron participar voluntariamente en el proyecto, también se colectaron muestras de las placentas y de sangre del cordón umbilical al momento del nacimiento. La colecta de las muestras fue en la Unidad Médica de Alta Especialidad, del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 “Dr. Víctor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez”, del Centro Médico Nacional “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), ubicado al norte de la Ciudad de México. La mayoría de las mujeres reclutadas en este hospital vivían en la zona norte de la Ciudad, al ser derechohabientes del IMSS las pacientes eran enviadas desde sus unidades médicas familiares, las cuales están ubicadas en la zona norte. Las muestras fueron colectadas en el periodo de febrero del 2014 a diciembre del 2015.

Posteriormente y de manera similar, se incorporaron al estudio 108 mujeres embarazadas que acudían al Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios al Nacimiento (CIMIGen), de las cuales se colectaron las mismas matrices biológicas. El CIMIGen está localizado en la zona oriente de la Ciudad de México, el hospital tiene convenios con la UNAM a través de su Escuela Nacional de Enfermería y Obstetricia y gran parte de las mujeres reclutadas vivían en la zona oriente de la Ciudad. El periodo de muestreo fue de octubre del 2016 a mayo del 2018.

Los muestreos en ambos hospitales se realizaron de manera uniforme en las distintas épocas del año con el fin de tener un tamaño de muestra similar entre las estaciones de lluvias y secas y así poder comparar los efectos de la contaminación atmosférica en nuestras poblaciones de estudio.

Ambos protocolos fueron aprobados por los Comités de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios al Nacimiento.

En términos generales, se reclutaron mujeres embarazadas con los siguientes criterios: que fueran mujeres no fumadoras con un intervalo de edad de 19-35 años, que hayan permanecido al menos los últimos 3 meses de la gestación en la ZMCM, sin enfermedades crónicas como diabetes o hipertensión y que el nacimiento haya sido a > 36 semanas de gestación (a término) (ver Tabla II). Las voluntarias fueron invitadas a participar en el estudio en una consulta previa o al momento de la admisión hospitalaria durante la labor de parto. Previamente, se revisaron los expedientes médicos para establecer si eran probables candidatas para ingresar al estudio.

Las mujeres voluntarias posterior a que se les informara la finalidad y los objetivos del estudio firmaron una carta de consentimiento informado. Durante la entrevista se les hicieron preguntas en relación con sus hábitos personales y alimenticios para descartar elementos de confusión como el consumo de comida frita o carbonizada, tabaquismo, enfermedades crónicas, la cercanía de su domicilio a fábricas o gasolineras, lugar de residencia, edad materna, ocupación, consumo de fármacos o exposición ocupacional a agentes genotóxicos. Todas las voluntarias que participaron en este estudio durante toda la gestación consumieron hierro y ácido fólico dentro de los cuidados prenatales.

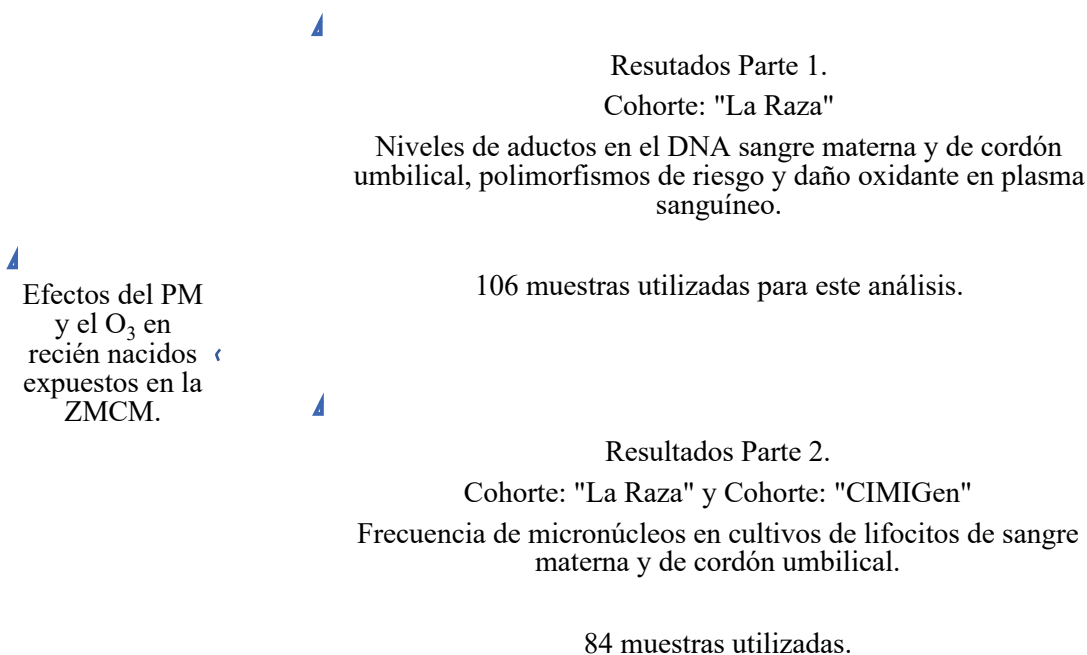
Se colectaron 10 mL de sangre periférica de la madres y 10 mL de sangre de cordón umbilical del recién nacido en tubos Vacutainer con EDTA K2. Del mismo modo, fueron colectados otros 6 mL de sangre materna y 6 mL sangre fetal en tubos Vacutainer con Heparina. Además, se tomaron 5 cm<sup>3</sup> de tejido de placenta en su cara materna y 5 cm<sup>3</sup> de cara fetal en tubos estériles. Asimismo, se colectaron de 10-20 mL de orina de las madres para realizar las determinaciones de los niveles de cotinina. Las muestras biológicas se colocaron a -20°C, para enviarse de manera inmediata al Instituto de Investigaciones Biomédicas, en donde se almacenaron a -80°C para gradualmente iniciar su procesamiento y análisis. Las muestras de sangre heparinizada se mantuvieron a temperatura ambiente.

**Tabla II: Criterios de inclusión y exclusión empleados en el estudio.**

Inclusión	Exclusión
<ul style="list-style-type: none"><li>• &gt;36 semanas de gestación.</li><li>• 19-35 años.</li><li>• Feto vivo.</li><li>• Que acepten participar y firmen la carta de consentimiento de colaboración.</li><li>• Que hayan permanecido en la zona de residencia en los últimos 3 meses.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pacientes con tabaquismo activo.</li><li>• Pacientes con exposición ocupacional a metales o hidrocarburos aromáticos policíclicos.</li><li>• Recién nacidos con fenotipo compatible con cromosomopatía.</li><li>• Pacientes que presenten ruptura prematura de membranas asociada a proceso infeccioso.</li><li>• Pacientes con enfermedades crónicas como diabetes o hipertensión.</li></ul>

## **5.2 Diseño del estudio**

En esta tesis se estudiaron dos cohortes en las que se evaluaron diferentes biomarcadores de daño con la finalidad de establecer los efectos de la exposición gestacional al material particulado en distintos sitios de la ZMCM (Figura 7). En la primera cohorte del norte, con muestras de las voluntarias del Centro Médico Nacional “La Raza” se evaluaron los niveles de aductos en el DNA de sangre materna y de cordón umbilical. Se evaluaron también los niveles de daño oxidante en lípidos en plasma sanguíneo y finalmente se evaluó el efecto de varios polimorfismos de riesgo sobre los niveles de los biomarcadores previamente mencionados. Asimismo, se agruparon muestras en las que se realizaron cultivos de linfocitos que proliferaron y además que fue posible su cuantificación de las cohortes del Centro Médico Nacional “La Raza” y del Hospital CIMIGen. En estas muestras se evaluó el efecto de la exposición ambiental al PM sobre los niveles de micronúcleos en linfocitos de sangre materna y de cordón umbilical. La frecuencia de micronúcleos se utilizó como biomarcador validado de riesgo a la salud, como ya se mencionó se ha relacionado con un incrementado riesgo para desarrollar cáncer en estudios poblacionales.



**Figura 7.** Diseño experimental y distribución de las muestras biológicas. Se evaluaron los efectos de la exposición gestacional al PM en madres y recién nacidos de la ZMCM, para ello se realizó la investigación dos fases. En la primera parte, en la cohorte del Centro Médico Nacional “La Raza”, se evaluaron los niveles de aductos en el DNA y los niveles de daño oxidante en lípidos en sangre materna y de cordón umbilical y su relación con variantes alélicas de riesgo. En la segunda parte, se evaluó la frecuencia de micronúcleos en linfocitos maternos y de cordón umbilical en una cohorte mixta compuesta por muestras del Centro Médico Nacional “La Raza” y del hospital “CIMIGen”.

### ***5.3 Monitoreo ambiental de los contaminantes en el aire de la ZMCM***

Se obtuvieron los registros de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) de las zonas en las cuales residieron las voluntarias reclutadas en este estudio. La estimación de los niveles de exposición se realizó de manera similar a lo reportado por García-Suastegui et al., 2011. Se establecieron diferentes zonas en la ZMCM (norte, sur, oriente, poniente y centro) en las que se llevaron a cabo los cálculos de concentración de PM con las estaciones de monitoreo dentro de cada una de las zonas definidas anteriormente, por lo que se obtuvieron valores de exposición para cada una de las zonas establecidas. Los datos de concentración de PM se estimaron con los promedios diarios de las concentraciones ambientales de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y O<sub>3</sub>. Para poder estimar la exposición de las voluntarias que acudían al Centro Médico

Nacional “La Raza”, se estimaron los niveles de PM y O<sub>3</sub> de las estaciones ubicadas en la zona centro-norte de la Ciudad de México, zona en la cual predominantemente las voluntarias residían. Del mismo modo, se hizo la estimación de los niveles de exposición a PM de las voluntarias reclutadas en el Hospital CIMIGen ubicado en la alcaldía de Iztapalapa, la mayoría de las mujeres vivían en esa zona de la ciudad y para las que vivían en otras zonas, el cálculo de la exposición a PM se hizo de acuerdo con las estaciones de monitoreo de la zona en la que vivían.

Se realizaron estimaciones del nivel de exposición en diferentes estadios de la gestación, estos cálculos se llevaron a cabo de acuerdo con la fecha de nacimiento y a las semanas de gestación reportadas en el cuestionario. Se hicieron las estimaciones de exposición para el 1º, 2º y 3º trimestre, así como para todo el embarazo para ambos diámetros aerodinámicos de PM.

#### ***5.4 Determinación de cotinina en orina***

Se realizó la determinación de cotinina (1-metil-3-(2-piridinil)-2-pirrolidinona) en orina, debido a que esta sustancia es un metabolito de la nicotina, la cual está presente en el tabaco. La determinación de la concentración en orina de este metabolito se realizó mediante un kit de detección rápida, One Step Cotinine Test Device, de Certum Diagnostics. Esta prueba determina como positivo para tabaquismo activo a aquellas muestras que presenten concentraciones superiores a 200 ng/mL de cotinina en orina. Todas las muestras que resultaron positivas fueron descartadas.

#### ***5.5 Purificación del DNA***

Se purificó el DNA de linfocitos utilizando el método estándar de extracción de Fenol-Cloroformo [Sambrook et al., 1989], en combinación de tratamientos con RNasa A y Proteínasa K. Las muestras aisladas de DNA fueron fraccionadas en pequeños volúmenes para su manejo y congeladas a -80°C para su posterior análisis. Las concentraciones de DNA fueron determinadas espectrofotométricamente a 260 nm en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). El DNA fue disuelto en agua libre de nucleasas y la integridad

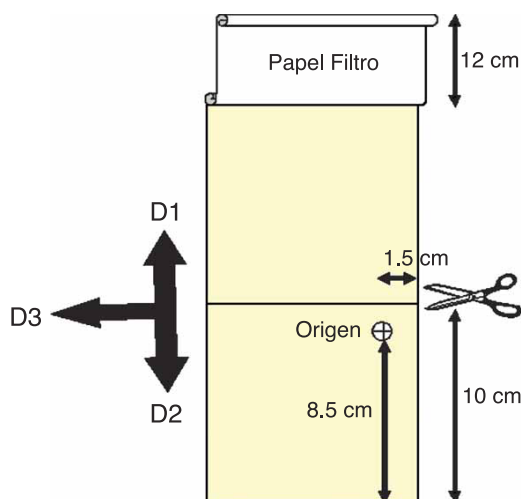
fue verificada mediante electroforesis en agarosa al 0.8%. La pureza fue determinada a través de los cocientes de absorbancia 260/280 y 230/260.

### ***5.6 Determinación de aductos en el DNA en sangre por medio <sup>32</sup>P-Postlabeling***

El proceso de detección de aductos mediante la técnica de post-marcaje con <sup>32</sup>P (<sup>32</sup>P-Postlabeling) puede ser aplicable de manera muy amplia en aductos que tienen la característica de ser grandes (Bulky adducts), aromáticos o hidrofóbicos, como aquellos formados por los hidrocarburos policíclicos aromáticos [Phillips and Arlt, 2007]. Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Radiactividad del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Brevemente, 4 µg de DNA fueron digeridos toda la noche con una mezcla de MN y SPD (Nucleasa Micrococcal y Fosfodiesterasa de bazo de ternera tipo II, respectivamente) a 37°C, esto con la finalidad de digerir de manera total el DNA, dando como resultado mononucleótidos 3' monofosfato. Posteriormente se realizó un enriquecimiento mediante una digestión con NP1 (Nucleasa P1) para desfosforilar los nucleótidos sin aductos, dejando fosforilados en la posición 3' sólo de aquellos nucleótidos que poseen aductos, esta diferencia es debido a que la enzima NP1 es sensible a los cambios estructurales de los nucleótidos, siendo imposible su actividad fosfatasa sobre aquellos nucleótidos con aductos y dando como resultados nucleósidos en aquellos nucleótidos que no tienen daño.

Inmediatamente después, los nucleótidos 3' monofosfato con aductos se marcaron con 37 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP en presencia de T4-PNK (Polinucleótido cinasa T4) durante una hora, la enzima T4-PNK fosforila en la posición 5' sólo en presencia de un grupo fosfato en la posición 3', por lo que debido a esta actividad se lleva a cabo el marcaje específico de los nucleótidos con aductos, dejando excluidos a los nucleósidos sin alteraciones (previamente tratados por la enzima NP1).



**Figura 8.** Diagrama de la placa de cromatografía en capa fina. En las flechas del costado izquierdo se muestran las orientaciones de la cromatografía multidireccional en capa fina en placas de polietilenoimina-celulosa (marcadas como D1, D2 y D3). Se muestra el sitio de aplicación de la muestra (Origen) del DNA marcado radioactivamente, la colocación del papel filtro y la manera de corte de la placa (Figura tomada y modificada de Phillips and Arlt, 2007).

Posteriormente se aplicó el total de la mezcla en el punto de origen (Figura 8) en hojas de PEI polietilenoimina-celulosa para cromatografía en capa fina. Una vez aplicada la mezcla se corrió la placa cromatográfica en la dirección D1, durante toda la noche hacia el papel filtro Whatman (figura 8). Posteriormente, se corrieron las placas en las direcciones D2 y D3 (figura 8). Los buffers de cromatografía fueron los siguientes: D1: 1 M fosfato de sodio, pH 6.0; D2: 3.5 M formato de litio, 8.5 M urea, pH 3.5; y D3: 0.8 M cloruro de litio, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0; los buffers mencionados anteriormente están optimizados para la detección de aductos provocados por PAHs [Phillips and Arlt, 2007]. Finalmente, las placas cromatográficas fueron expuestas a película autoradiográfica a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante dos días. Después de revelar la película, los “spots” de interés fueron recortados, que en este caso es la región DRZ (Diagonal Radiative Zone, es donde se localizan los aductos derivados de PAHs) y la radioactividad fue medida en el contador de centelleo Multi-purpose scintillation counter LS 6500 (Beckman-Coulter, USA). Las mediciones de los niveles de aductos fueron hechas en duplicado y en caso de que la variación entre ellas superara el 20%, el ensayo se realiza por triplicado (Binková *et al.*, 1994).

### 5.7 Determinación de los niveles en plasma de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

La determinación de los niveles de isoprostanos se llevó a cabo en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo de la Dra. Raquel López Arellano. Los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en plasma fueron determinados



mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). *8-iso-PGF<sub>2α</sub>* fue extraído del plasma sanguíneo utilizando los métodos descritos [Bastani et al., 2009; Dupuy et al., 2016; Larose et al., 2013]. Brevemente, 100 µl de estándar interno fueron agregados a 500 µl de plasma sanguíneo. Posteriormente, 500 µl de solución de hidrólisis (15% p/p KOH) fueron agregados. La mezcla resultante fue agitada en el vórtex e incubada en un baño ultrasónico a 40°C durante 30 minutos. Después, las muestras fueron acidificadas con 225 µl de ácido fórmico 6 M, agitadas en el vórtex y posteriormente centrifugadas a 15,000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes (350 µl) fueron aplicados en una placa de extracción en fase sólida Oasis® MAX µElution Plate. Los pozos fueron condicionados con 500 µl de MeOH y equilibrada con 500 µl ácido fórmico 20 mM. Las muestras fueron cargadas y los pozos fueron lavados con 350 µl de NH<sub>4</sub>OH al 2%. El *8-iso-PGF<sub>2α</sub>* fue eluído con 50 µl de ACN: IPA (40:60) con 5% de FA y diluido en 150 µl de agua. Las alícuotas (30 µl) fueron inyectadas en el sistema LC-MS/MS utilizando una columna de 2.7 µm ACQUITY BEH UPLC® C18.

### ***5.8 Identificación de los polimorfismos para GSTM1\*0, CYP1B1\*3, NQO1\*2 y MGMT L84F***

Se llevó a cabo la determinación de las variantes alélicas de riesgo de acuerdo con los hallazgos de investigaciones previas del grupo de trabajo en la que se ha encontrado asociación entre los polimorfismos *GSTM1\*0*, *CYP1B1\*3*, *NQO1\*2* y *MGMT L84F* con los niveles de aductos [García-Suastegui et al., 2011; Molina et al., 2013].

El polimorfismo de *GSTM1\*0*, consiste en una PCR (Polymerase Chain Reaction) múltiple en la que con la amplificación del gen se comprueba la presencia o ausencia del gen, utilizando al mismo tiempo como control de amplificación un gen que no tenga deleciones, en nuestro caso fue *CYP1A1* [Abdel-Rahman et al., 1996]. La genotipificación de *CYP1B1\*3* se realizó mediante PCR acoplado a RFLP (PCR-RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism), la cual consiste en la amplificación de un fragmento de 650 bp que corresponden a la secuencia del gen *CYP1B1*, posteriormente el segmento amplificado fue digerido mediante la enzima de restricción Eco57I, permitiendo la discriminación de los individuos que son portadores de uno o dos alelos mutantes mediante el corte del segmento

inicialmente amplificado [Watanabe et al., 2000]. La identificación del polimorfismo de *MGMT* se llevó a cabo de igual manera por medio de PCR-RFLP, mediante PCR se genera un fragmento amplificado de 499 pares de bases, el cual es sometido a la digestión por la endonucleasa SapI [Hill et al., 2007]. Finalmente, el polimorfismo *NQO1*\*2 de manera similar, se genera un fragmento de 299 bp en cual es sometido a digestión con la enzima de restricción HinfI [Eguchi-Ishimae et al., 2005]. Los fragmentos generados son separados por electroforesis en geles de agarosa para identificar a las variantes en cada caso.

### ***5.9 Cultivo celular de linfocitos humanos, ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN) y parámetros del Citoma***

El cultivo de linfocitos y la determinación de los niveles de micronúcleos fue llevada a cabo en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas por la Dra. Patricia Ostrosky Wegman, la Dra. Ana María Salazar y la QFB. Monserrat Sordo Cedeño.

Los leucocitos fueron aislados de aproximadamente 3 mL de sangre con heparina como anticoagulante utilizando un gradiente de centrifugación de Ficoll. De las células recuperadas, aproximadamente 1 millón de células fueron sembradas en 5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamato 200 mM (1%) y aminoácidos no esenciales (1%).

Posteriormente, se adicionó a las células Fitohemaglutinina (30 µg/ml) para promover la proliferación. Las células fueron incubadas a 37°C y después de 44 horas se les agregó Citocalasina B (6 µg/ml). A las 72 horas de cultivo, las suspensiones celulares fueron fijadas y lavadas con una solución de metanol frío y ácido acético (3:1). Las células se colectaron por centrifugación y colocadas en un portaobjetos de vidrio precongelado para preservar la integridad de la membrana plasmática. Las células fueron teñidas con colorante Hemacolor para su análisis en el microscopio.

Posteriormente, se determinó la cinética de proliferación celular (citostaticidad) a través del índice de división nuclear (NDI) [Eastmond and Tucker, 1989]. Se registró el número de células mononucleadas (M), células binucleadas (BN) y células polinucleadas (P) en un

conteo total de 200 células. La actividad citostática fue determinada por medio de la siguiente ecuación:

$$(NDI) = \frac{[M + 2(BN) + 3(P)]}{N}$$

En donde, N es igual al número total de células registradas.

La evaluación de la frecuencia de micronúcleos y de los parámetros del citoma, tales como gemaciones nucleares (buds), puentes nucleoplasmáticos, número de células apoptóticas y necróticas fue determinada de acuerdo a lo propuesto por Fenech con algunas modificaciones [Fenech et al., 2003]. Los resultados fueron expresados como la frecuencia relativa en 1000 células binucleadas.

### **5.10 Análisis estadístico**

Se calcularon los promedios y la desviación estándar de la edad materna, edad gestacional, peso al nacimiento para cada una de las cohortes usadas en este estudio. En el caso de las concentraciones de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y O<sub>3</sub>, se calcularon los valores medianos mensuales para estimar las variaciones estacionales de los contaminantes en la ZMCM (Figura 9). Para comparar las diferencias entre los niveles de contaminantes en las épocas del año se realizaron pruebas de U de Mann-Whitney para realizar las comparaciones en todos los años contemplados. Además, para estimar la exposición para cada binomio madre-feto y del tal modo poder realizar los análisis de asociación, se calcularon los valores promedio de exposición a PM y O<sub>3</sub> para el último mes, el último bimestre y trimestre de la gestación. Para comparar los niveles de aductos en el DNA y los niveles de *8-iso-prostanoPGF<sub>2α</sub>* en madres y sus recién nacidos, se realizaron pruebas de muestras pareadas de Wilcoxon. La asociación entre los niveles de aductos en leucocitos maternos y de cordón umbilical con los niveles ambientales de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y O<sub>3</sub> fue explorada mediante análisis de correlación de Spearman. Para analizar la asociación entre la exposición a PM y la frecuencia de micronúcleos se realizaron correlaciones de Spearman, y la misma prueba se usó para analizar el efecto de la edad materna sobre los niveles de micronúcleos. Para evaluar la asociación entre los niveles de aductos en el DNA y los diferentes polimorfismos, comparamos el genotipo de silvestre con los genotipos heterocigotos y homocigotos

mutantes con una prueba U de Mann-Whitney. Se realizaron análisis de regresión múltiple entre los niveles de aductos en el DNA de sangre de cordón umbilical, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y variantes alélicas de riesgo tanto en madres como en recién nacidos. Se realizaron análisis de regresión múltiple para evaluar el efecto de la exposición a PM, edad materna y ocupación en las frecuencias de MN. Para examinar la interacción entre los genotipos de *CYP1B1* maternos y fetales y los niveles de aductos en sangre del cordón umbilical, se utilizó un análisis empírico de distribución acumulativa para asociar cada combinación de genotipo con los niveles de aductos en el DNA. Se usaron transformaciones logarítmicas para variables como los aductos en el DNA, los niveles de *8-iso-prostanePGF<sub>2α</sub>* y las frecuencias de micronúcleos para corregir la normalidad y homogenizar las varianzas. En todos los análisis estadísticos, el valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados usando GraphPad Prism 7 y SigmaPlot 12.5.

## **6. Resultados**

### **6.1 Resultados Parte 1: Aductos en el DNA, variantes alélicas de riesgo y daño oxidante en madres y fetos expuestos a PM en la ZMCM. Cohorte “La Raza”**

#### **6.1.1 Población de estudio**

Un total de 106 muestras de 150 cumplieron con los criterios de inclusión (Tabla II). Las características demográficas se muestran en la Tabla III. Todas las mujeres voluntarias incluidas en la primera cohorte resultaron negativas para la prueba de cotinina en orina (cotinina <200 ng/mL de orina). El promedio de edad de las voluntarias fue de  $30.92 \pm 5.6$  años y el promedio de la duración del embarazo fue de  $38.33 \pm 1.1$  semanas. En nuestra cohorte el 52% de los neonatos fueron de sexo femenino, el promedio del peso al nacimiento fue de  $3075 \pm 414.1$  gramos y el promedio de la longitud al nacimiento fue de  $49.63 \pm 5.6$  centímetros. Todos los parámetros perinatales analizados se consideran normales para nacimientos que concluyeron a término.

**Tabla III. Características demográficas y biomarcadores de la población de estudio.**

Número de voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión	106
Edad gestacional de los neonatos (semanas; media $\pm$ DE)	38.33 $\pm$ 1.1
Sexo de los neonatos (n; %)	
Masculino	49 (46.23)
Femenino	53 (50)
No reportados	4 (3.77)
Peso al nacimiento (gr; media $\pm$ DE)	3075 $\pm$ 414.1
Longitud al nacimiento (cm; media $\pm$ DE)	49.63 $\pm$ 2.2
Edad materna (años; media $\pm$ DE)	30.92 $\pm$ 5.6
Ocupación/exposición materna (n; %)	
Amas de casa	40 (37.74)
Empleadas	53 (50)
Exposición elevada a PAHs	3 (2.83)
No reportado	10 (9.43)
Fumadoras	0 (0)
PAH-DNA aductos/ $10^8$ nucleótidos	
Madres (mediana $\pm$ RI)	1.105 (0.513-1.832)
Cordón umbilical (mediana $\pm$ RI)	1.334 <sup>a</sup> (0.779-2.000)
$\delta$ -iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> (pg/mL plasma)	
Madres (mediana $\pm$ RI)	127.6 (76.64-174.1)
Cordón umbilical (mediana $\pm$ RI)	210.4 <sup>b</sup> (149.0-277.3)
Relación aductos cordón umbilical/maternos (RACUM)	
RACUM $\geq$ 1 (%)	60.37
RACUM<1 (%)	39.63

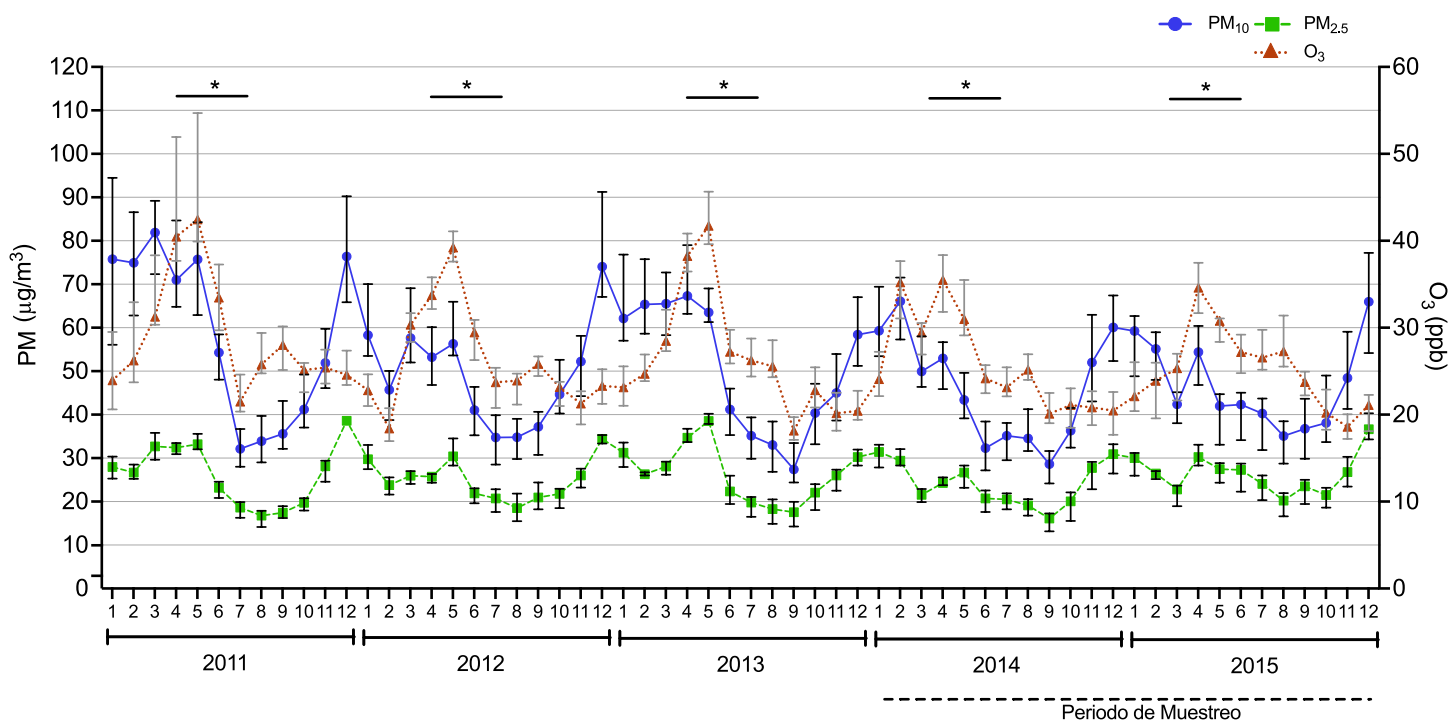
DE: Desviación Estándar; RI: Rango Intercuartil; Prueba para muestras pareadas de Wilcoxon, a: madres vs cordón umbilical, p=0.0078, b: madres vs cordón umbilical, p<0.0001.

### **6.1.2 Monitoreo de las concentraciones de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y Ozono en la ZMCM**

El monitoreo de los niveles de contaminantes en la ZMCM fue llevado a cabo de manera similar a lo que reporta García-Suastegui en el 2011. Brevemente, con los datos de las concentraciones diarias de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y O<sub>3</sub> reportadas por las estaciones de la RAMA, se estimaron los promedios mensuales de los contaminantes previamente mencionados en el periodo comprendido entre los años 2011-2015 (Figura 9). En el periodo del 2011-2015, los niveles de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> fueron significativamente más altos (p<0.0001) durante las estaciones secas (noviembre-abril) comparados con los niveles de partículas calculados para

los meses correspondientes a las estaciones lluviosas (mayo-octubre; Figura 9). Las disminuciones de las concentraciones de PM se deben a las precipitaciones en la ZMCM, la lluvia provoca un lavado atmosférico que arrastra al suelo las partículas suspendidas, lo cual se ve reflejado en una disminución de los niveles ambientales de PM [SEDEMA, 2008, 2010]. Los niveles más altos de O<sub>3</sub> en la zona norte de la ZMCM se observaron en durante el periodo de marzo-junio.

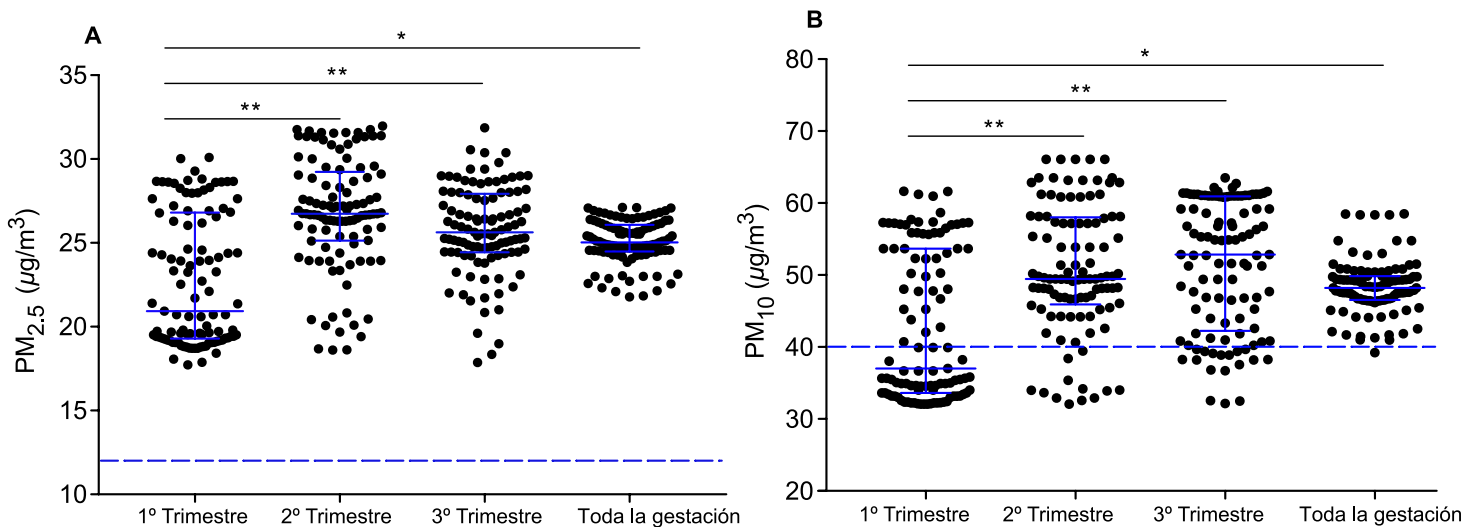
Posteriormente se calcularon los niveles de exposición a partículas PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> para cada par madre-feto tomando en consideración las semanas de gestación y la fecha de nacimiento, esto con la finalidad de establecer un nivel de exposición personalizado en el primero, segundo y tercer trimestre de la gestación, así como durante todo el embarazo (Figura 10). La mayoría de las mujeres participantes estuvieron expuestas a niveles superiores a los que la Norma Oficial Mexicana establece como seguros (12 µg/m<sup>3</sup> para PM<sub>2.5</sub> y 40 µg/m<sup>3</sup> para PM<sub>10</sub>) [NOM, 2014]. Del mismo modo, al considerar los límites seguros de la OMS, todas las mujeres incluidas en el estudio estuvieron expuestas a niveles por arriba de las normas internacionales (10 µg/m<sup>3</sup> para PM<sub>2.5</sub> y 35 µg/m<sup>3</sup> para PM<sub>10</sub>) [IARC, 2013]



**Figura 9.** Concentraciones mensuales de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y O<sub>3</sub> de las estaciones de monitoreo de la RAMA de la zona norte de la ZMCM en el periodo 2011-2015. La descripción del cálculo de los niveles de los contaminantes se detalla en la sección 5.3. Se compararon los niveles de PM y O<sub>3</sub> entre las estaciones secas y lluviosas de cada año a través de la prueba de U de Mann-Whitney, se representan en barras con asteriscos las diferencias entre los periodos de noviembre-mayo y de junio-octubre. Se puede apreciar la variación estacional de los niveles de contaminantes atmosféricos en la ZMCM, este efecto puede atribuirse a condiciones climáticas como la temperatura y la precipitación.

### 6.1.3 Aduetos en el DNA en madres y recién nacidos

Se realizó la cuantificación de los niveles de aductos en el DNA en muestras de sangre periférica materna y sangre de cordón umbilical. La mediana de los aductos en el DNA materno fue de 1.105 (RI: 0.513, 1.832) y la mediana de aductos en el DNA de cordón umbilical fue de 1.334 (RI: 0.7798, 2.0) por 10<sup>8</sup> nucleótidos. Los niveles de aductos en el DNA de cordón umbilical fueron significativamente más altos que los encontrados en el DNA materno (p=0.0022; Tabla III; Figura 11A). Estos resultados muestran que hay un 20% más aductos en las muestras de sangre de cordón umbilical comparado con los niveles en sangre materna.

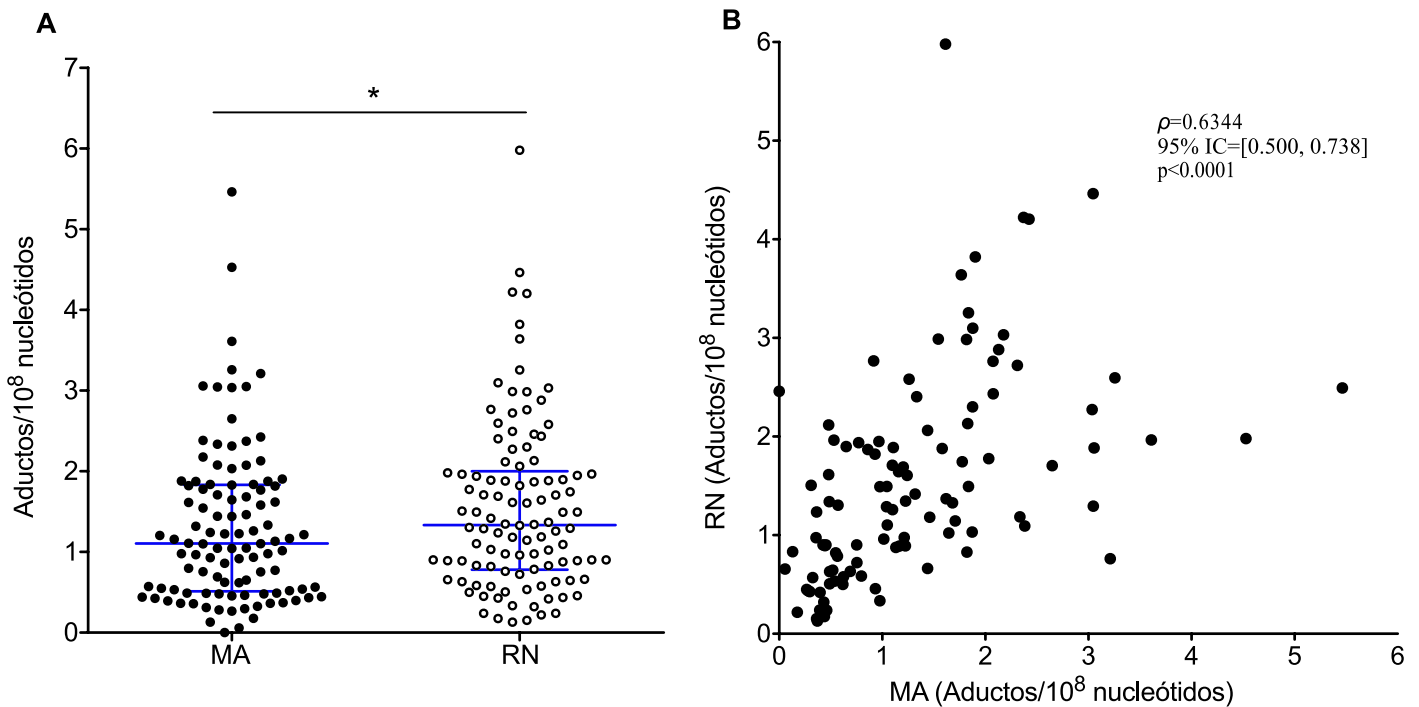


**Figura 10.** Niveles de exposición a PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> para cada una de las voluntarias en diferentes momentos de la gestación. A) Niveles de exposición a PM<sub>2.5</sub> para cada mujer durante el primero, segundo y tercer trimestre



del embarazo, también se muestran las concentraciones para toda la gestación. La exposición se estimó empleando la fecha de nacimiento, el número de semanas de gestación para cada par madre-hijo y las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> en ese periodo de tiempo. Se compararon los niveles de exposición en esos periodos de tiempo mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, \*\*p<0.0001 (1° vs 2° Trimestre), \*\*p<0.0001 (1° vs 3° Trimestre), \*p=0.0046 (1° vs Toda la gestación). B) Niveles de exposición a PM<sub>10</sub> en distintos periodos del embarazo. La exposición se estimó empleando la fecha de nacimiento, el número de semanas de gestación para cada par madre-hijo y las concentraciones de PM<sub>10</sub> en ese periodo de tiempo. Del mismo modo, se compararon los niveles de exposición en esos periodos de tiempo a través de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, \*\*p<0.0001 (1° vs 2° Trimestre), \*\*p<0.0001 (1° vs 3° Trimestre), \*p=0.0060 (1° vs Toda la gestación). La línea punteada de los gráficos muestra el límite anual para PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014. Se puede apreciar que la mayoría de las mujeres voluntarias están expuestas a niveles que están por arriba de lo que establece la Norma Oficial Mexicana.

Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre los niveles de aductos en el DNA materno y los niveles de aductos detectados en sangre de cordón umbilical, se encontró una correlación positiva ( $\rho=0.634$ , 95% IC [0.500, 0.738], p<0.0001; Figura 11B), este resultado sugiere la transferencia efectiva de los PAHs a través del tejido placentario y de la importancia de la exposición materna en los niveles del daño fetal.



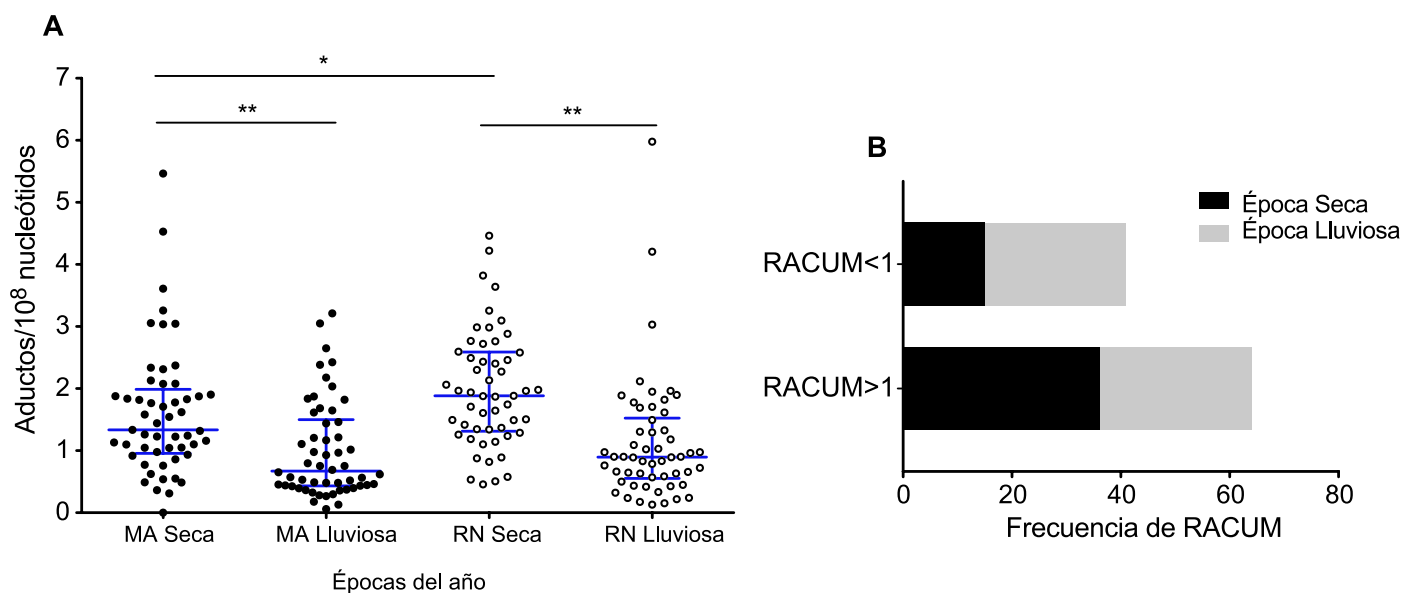
**Figura 11.** Niveles de aductos en madres e hijos expuestos a PM en la ZMCM. A) niveles de aductos en sangre materna (MA) y en sangre de cordón umbilical (RN). Se muestran con las líneas los valores de la mediana y los rangos intercuartiles, cada punto en el gráfico representa un individuo. Los datos se compararon con una prueba de muestra pareadas de Wilcoxon,  $p=0.0022$ . B) Correlación de Spearman entre los niveles de aductos en sangre materna (MA) y los aductos en sangre de cordón umbilical (RN), este resultado muestra la transferencia de los PAHs a través del tejido placentario ( $\rho=0.6344$ , 95% IC [0.500-0.738],  $p<0.0001$ ).

Los niveles de aductos en el DNA se analizaron considerando la época del año en la que ocurrieron los nacimientos. Utilizando como criterio el último mes de gestación, se separaron las muestras en dos grupos, uno para la época seca del año y otro para la época lluviosa. Con este análisis se encontró que los niveles de aductos tanto en sangre materna como en sangre de cordón umbilical fueron más altos significativamente durante la época seca del año comparados con la época lluviosa ( $p<0.0001$ ; Figura 12A), es decir, las precipitaciones disminuyen las concentraciones de PM en el ambiente y esto tiene relación con los niveles de aductos detectados. Además, cuando se comparan los niveles de aductos entre madres e hijos durante la época seca del año, encontramos que los leucocitos de cordón umbilical tienen significativamente más aductos que los leucocitos maternos ( $p=0.0009$ ) pero no se observa esto cuando las muestras se tomaron en la época lluviosa (Figura 12A). Estos datos sugieren un incremento en la susceptibilidad fetal a presentar daño en el DNA cuando los niveles de exposición se incrementan.

En nuestra cohorte, se calculó la RACUM (Relación Aductos Cordón Umbilical/Maternos), cuando la  $RACUM > 1$  se considera como un indicador de susceptibilidad fetal de daño al DNA derivado de los PAHs absorbidos por sus madres [Jedrychowski et al., 2013]. De manera general, un 60.95% de los binomios madre-recién nacido analizados tienen una  $RACUM > 1$ , lo cual implica que un alto porcentaje de los recién nacidos de la población de estudio tienen niveles de aductos en el DNA más altos que sus madres (Tabla III; Figura 12B). Además, la proporción de  $RACUM > 1$  es mayor durante la estación seca (Figura 12B).

No hay diferencias en los niveles de aductos en el DNA en relación con el sexo del recién nacido (datos no mostrados,  $p=0.3319$ ), algunos estudios sugieren que los fetos masculinos

son más sensibles a la exposición prenatal a las  $PM_{2.5}$  [Jedrychowski et al., 2009]. Sin embargo, en nuestra población no encontramos tal fenómeno.



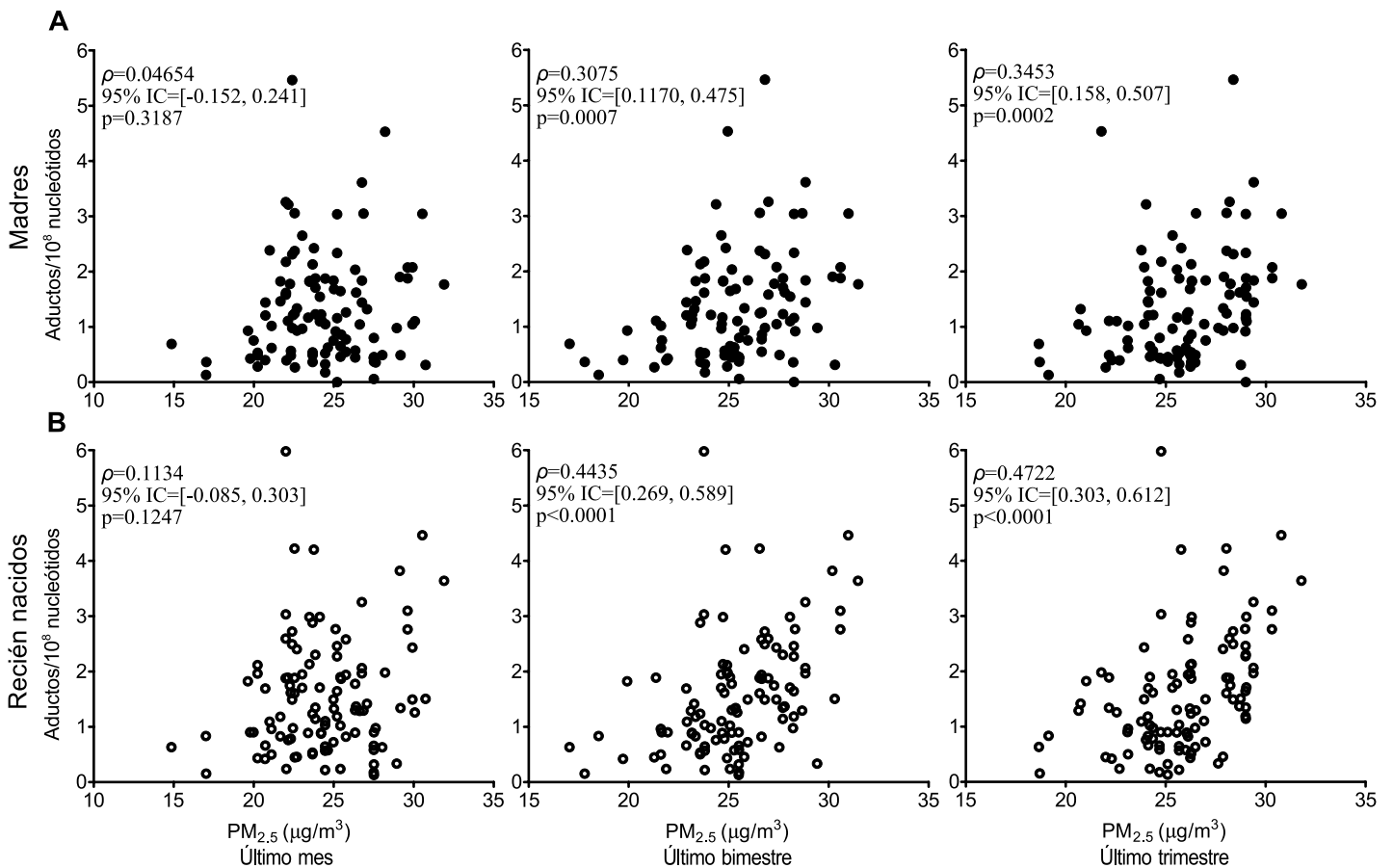
**Figura 12.** Efectos de la estación del año sobre los niveles de aductos en madres e hijos. A) Comparación estacional de los niveles de aductos sangre materna y de cordón umbilical, la separación por estación se llevó a cabo considerando el último mes de la gestación. Tamaños de muestra de los grupos: MA Seca=53, MA Lluviosa=54, RN Seca=53 y RN Lluviosa 54. Las diferencias fueron analizadas a través de la prueba de muestras pareadas de Wilcoxon. \* $p < 0.0001$ , \*\* $p = 0.0009$ . B) Relación aductos en cordón umbilical y aductos maternos (RACUM) separados de acuerdo con la estación del año. Valores de la RACUM > 1 se encuentran principalmente en las muestras colectadas durante la época seca del año. Valores de la RACUM > 1 implican mayor susceptibilidad fetal para tener daño en el DNA.

#### 6.1.4 Asociación entre los niveles de aductos y las concentraciones ambientales de PM

Exploramos el efecto de la exposición a partículas y al ozono en diferentes ventanas de tiempo dentro del último trimestre de la gestación, para ello se estimó la exposición de cada par madre-hijo durante el último mes, el último bimestre y el último trimestre del embarazo.

En el caso de las partículas  $PM_{2.5}$ , se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de aductos y las concentraciones de partículas (Figura 13). En el caso de las muestras de DNA materno no se encontró asociación considerando el último mes de la gestación

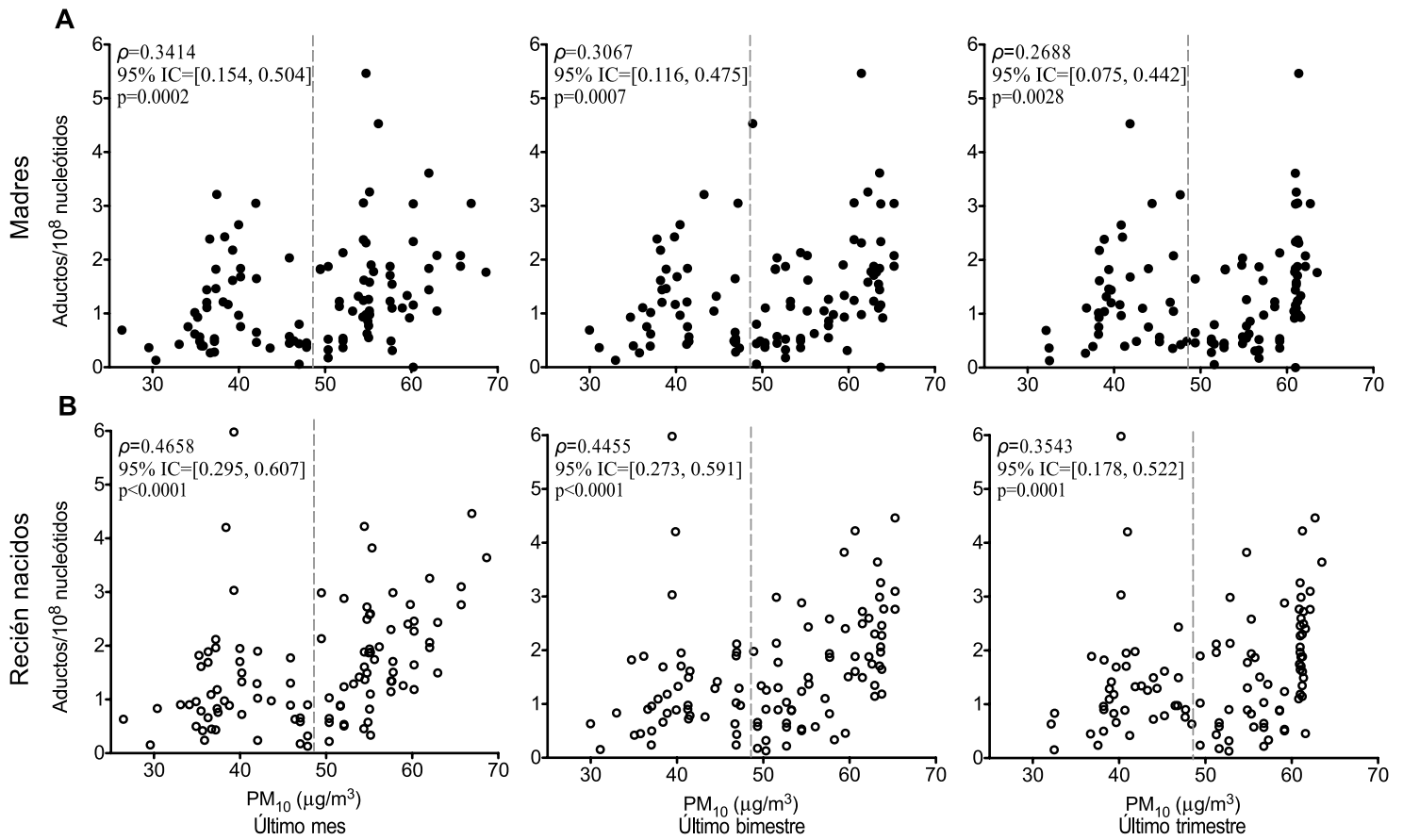
( $\rho=0.0465$ , 95% IC [-0.152, 0.241],  $p=0.3187$ ; Figura 13A). Sin embargo, se encontraron asociaciones significativas entre el nivel de aductos y la exposición a  $PM_{2.5}$  durante el último bimestre ( $\rho=0.3075$ , 95% IC [0.117, 0.475],  $p=0.0007$ ) y el último trimestre de la gestación ( $\rho=0.3453$ , 95% IC [0.158, 0.507],  $p=0.0002$ ). En el caso de las muestras de cordón umbilical, se obtuvieron resultados similares, durante el último mes de la gestación no encontramos correlación entre los niveles de aductos y la exposición a  $PM_{2.5}$  ( $\rho=0.1134$ , 95% IC [-0.085, 0.303],  $p=0.1247$ ; Figura 13B). En cambio, para el caso del último bimestre y el último trimestre se encontraron correlaciones significativas ( $\rho=0.4435$ , 95% IC [0.269, 0.589],  $p<0.0001$  y  $\rho=0.4722$ , 95% IC [0.303, 0.612],  $p<0.0001$ ; respectivamente). Es importante mencionar que la asociación encontrada entre las concentraciones de  $PM_{2.5}$  y los niveles de aductos en cordón umbilical siguen una tendencia lineal dosis-respuesta.



**Figura 13.** Correlaciones de Spearman entre las concentraciones de  $PM_{2.5}$  y los niveles de aductos tanto en sangre materna y sangre de cordón umbilical. A) Niveles de aductos en sangre materna asociados con las

concentraciones de PM<sub>2.5</sub> durante el último trimestre de la gestación. Se puede apreciar que las asociaciones más fuertes se encontraron durante el último bimestre y el último trimestre del embarazo. B) Asociación entre los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical y las concentraciones ambientales de PM<sub>2.5</sub> en varios periodos de tiempo dentro del tercer trimestre de la gestación. Las asociaciones fueron más evidentes en el último bimestre y el último trimestre.

En el caso del PM<sub>10</sub>, se encontraron resultados igualmente interesantes. En el caso de las muestras de sangre materna, el punto más fuerte para estimar la asociación entre los niveles de PM<sub>10</sub> y los aductos en el DNA fue el último mes del embarazo ( $\rho=0.341$ , 95% IC [0.154, 0.504],  $p=0.0002$ ; Figura 14A) comparado con los valores de correlación obtenidos para el último bimestre ( $\rho=0.306$ , 95% IC [0.1165, 0.475],  $p=0.0007$ ) y para el último trimestre ( $\rho=0.268$ , 95% IC [0.075, 0.442],  $p=0.0028$ ). De manera similar a los resultados previos, en las muestras de sangre de cordón umbilical el punto para estimar más fuerte la asociación fue durante el último mes de la gestación ( $\rho=0.465$ , 95% IC [0.295, 0.607],  $p<0.0001$ ; Figura 14B) comparado con el último bimestre y el último trimestre ( $\rho=0.446$ , 95% IC [0.273, 0.591],  $p<0.0001$  y  $\rho=0.362$ , 95% IC [0.178, 0.522],  $p<0.0001$ ; respectivamente).



**Figura 14.** Correlaciones de Spearman entre las concentraciones ambientales de  $PM_{10}$  y los niveles de aductos en sangre materna y sangre de cordón umbilical. A) Niveles de aductos en sangre materna y su asociación con las concentraciones de  $PM_{10}$  en tres ventanas de tiempo dentro del último trimestre de la gestación. La asociación más fuerte se encontró en el último mes de la gestación. B) Asociación de los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical y los niveles de  $PM_{10}$  en el último trimestre del embarazo. La asociación más importante fue encontrada en el último mes de la gestación. Las líneas punteadas representan el valor promedio de exposición a  $PM_{10}$  en el último trimestre ( $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). No se encontraron asociaciones significativas por debajo del valor promedio. Sin embargo, por encima de tal valor la generación de aductos sigue una tendencia lineal respecto a la concentración de  $PM_{10}$ .

Las asociaciones entre los niveles ambientales de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  con los niveles de aductos fueron siempre más fuertes en las muestras de cordón umbilical (considerando los valores de correlación Rho “ $\rho$ ”; Figuras 13 y 14), esta información podría sugerir que existe una mayor susceptibilidad en el feto para la formación de aductos en el DNA o una tasa de reparación de estas lesiones más lenta comparada lo que podría ocurrir en un organismo adulto.

La formación de los aductos en sangre fetal y su relación con las  $PM_{10}$  fue explorada de acuerdo con los valores promedio de  $PM_{10}$  en el último trimestre del embarazo ( $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Por lo cual se llevaron a cabo análisis de correlación de Spearman con los recién nacidos expuestos a niveles por debajo y por arriba de la media de exposición a  $PM_{10}$  (Figura 13, línea punteada). No se encontró ninguna asociación significativa cuando se realizaron los análisis con los fetos expuestos a niveles  $<48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Sin embargo, cuando los análisis se realizaron con  $\geq 48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , se encontraron asociaciones positivas para el último mes ( $\rho=0.464$ , 95% IC [0.224, 0.651],  $p<0.0001$ ), el último bimestre ( $\rho=0.5745$ , 95% IC [0.376, 0.722],  $p<0.0001$ ) y el último trimestre ( $\rho=0.464$ , 95% CI [0.241, 0.640],  $p<0.0001$ ).

Los análisis de correlación se enfocaron solamente en la parte final del embarazo debido a que no se encontraron asociaciones positivas entre las concentraciones de PM y los niveles de aductos en los dos primeros trimestres de la gestación. En el caso del primer trimestre de la gestación, las correlaciones para ambos diámetros aerodinámicos de partículas no resultaron ser significativas (datos no mostrados). Durante el segundo trimestre del embarazo, en el caso de las  $PM_{2.5}$  se encontraron correlaciones negativas para los aductos en el DNA materno ( $\rho=-0.3385$ , 95% IC [-0.502, -0.151],  $p=0.0002$ ) y del mismo modo para los aductos detectados en sangre de cordón umbilical ( $\rho=-0.4448$ , 95% IC [-0.590, -0.271],  $p<0.0001$ ). Resultados similares fueron encontrados analizando las concentraciones de  $PM_{10}$ , se observaron asociaciones negativas entre los niveles de aductos en el DNA y las concentraciones de  $PM_{10}$  en madres ( $\rho=-0.3129$ , 95% IC [-0.480, -0.123],  $p=0.0006$ ) y sangre de cordón umbilical ( $\rho=-0.3655$ , 95% CI [-0.524, -0.181],  $p<0.0001$ ).

#### ***6.1.5 Estimación del Riesgo Relativo en la formación de aductos en el DNA de cordón umbilical***

Con el valor promedio de  $PM_{10}$  de  $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Figura 13) se calculó el Riesgo Relativo (RR) para tener  $\geq 2$  aductos/ $10^8$  nucleótidos (aproximadamente 50% por arriba del valor mediano de aductos) cuando la exposición sobrepasa  $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Durante todo el último trimestre se observaron valores significativos para la estimación del RR (Tabla IV). Sin embargo, durante el último mes de la gestación fue el periodo en el que el RR fue más alto (RR=4.63, 95% CI [3.30, 6.50]; Tabla IV). Estos resultados sugieren que existe una mayor

susceptibilidad fetal para la generación de daño en el DNA en exposiciones que superan los 40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{10}$ , el cual es el límite anual permitido por la Norma Oficial Mexicana para la regulación de material particulado [NOM, 2014].

**Tabla IV. Riesgo Relativo (RR) para niveles  $\geq 2$  aductos/ $10^8$  nucleótidos en exposiciones de  $\text{PM}_{10} \geq$  concentración media ( $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) en cordón umbilical durante el último trimestre de la gestación**

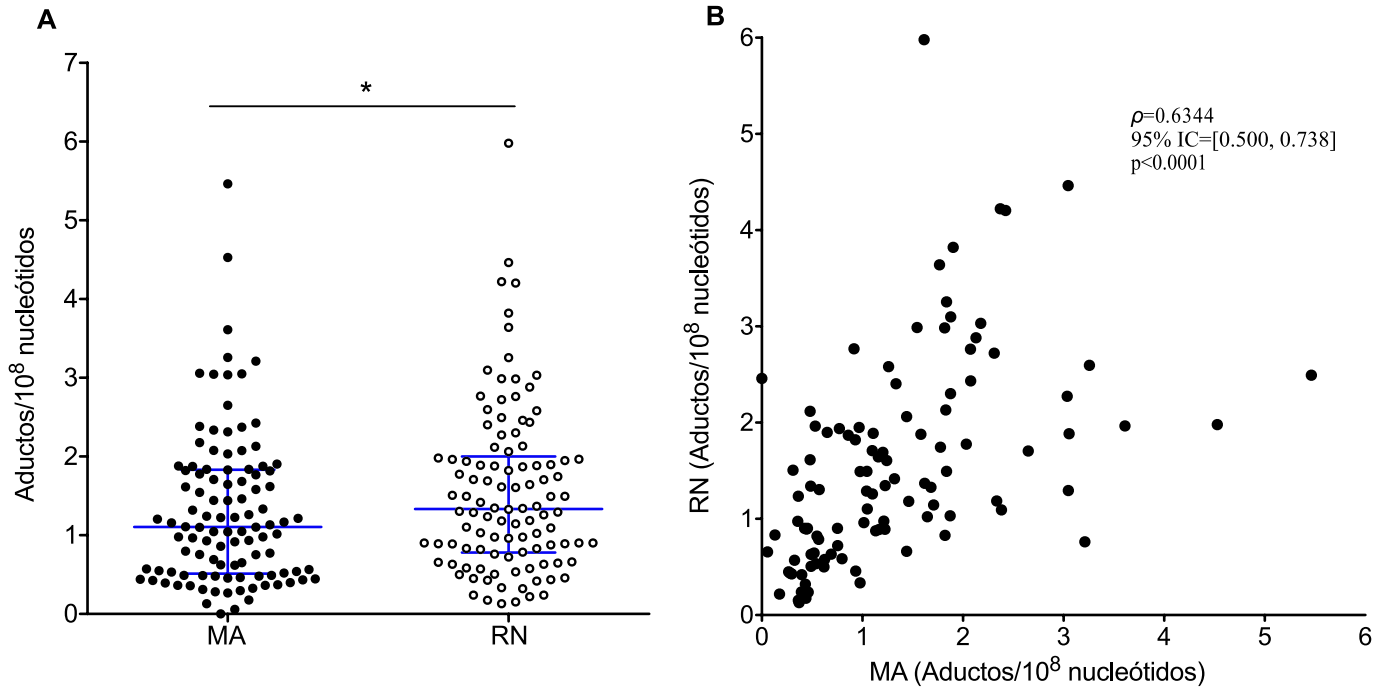
Periodo	RR	Intervalo de confianza (95%)	Significancia
Último mes	4.63	3.30 – 6.50	P<0.05
Último bimestre	3.52	2.48 – 5.01	P<0.05
Último trimestre	3.38	2.37 – 4.82	P<0.05

#### 6.1.6 Niveles de 8-Isoprostano en plasma de madres y recién nacidos

Se determinaron los niveles de 8-isoprostano (*8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>* ) como marcador de estrés oxidante. Los isoprostanos son productos oxidados del ácido araquidónico y se han reportado como marcadores útiles en procesos de estrés oxidante [Chen et al., 2007]. Los niveles de *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  fueron significativamente más altos en los recién nacidos ( $p < 0.0001$ ) comparado con el grupo de las madres (Tabla III; Figura 15A). Sin embargo, se sabe que los niveles de *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  al momento del nacimiento son más elevados en los recién nacidos, esto por el efecto de los procesos de isquemia y reperfusión al momento del parto [Chafer-Pericas et al., 2015; Rossner et al., 2009]. Además, los niveles de *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  en madres y recién nacidos correlacionaron entre ellos de manera significativa ( $\rho=0.2652$ , 95% CI [-0.039, 0.524],  $p=0.039$ ; Figura 15B), sugiriendo el probable efecto de la exposición materna a algún agente ambiental sobre los niveles de daño oxidante en los recién nacidos.

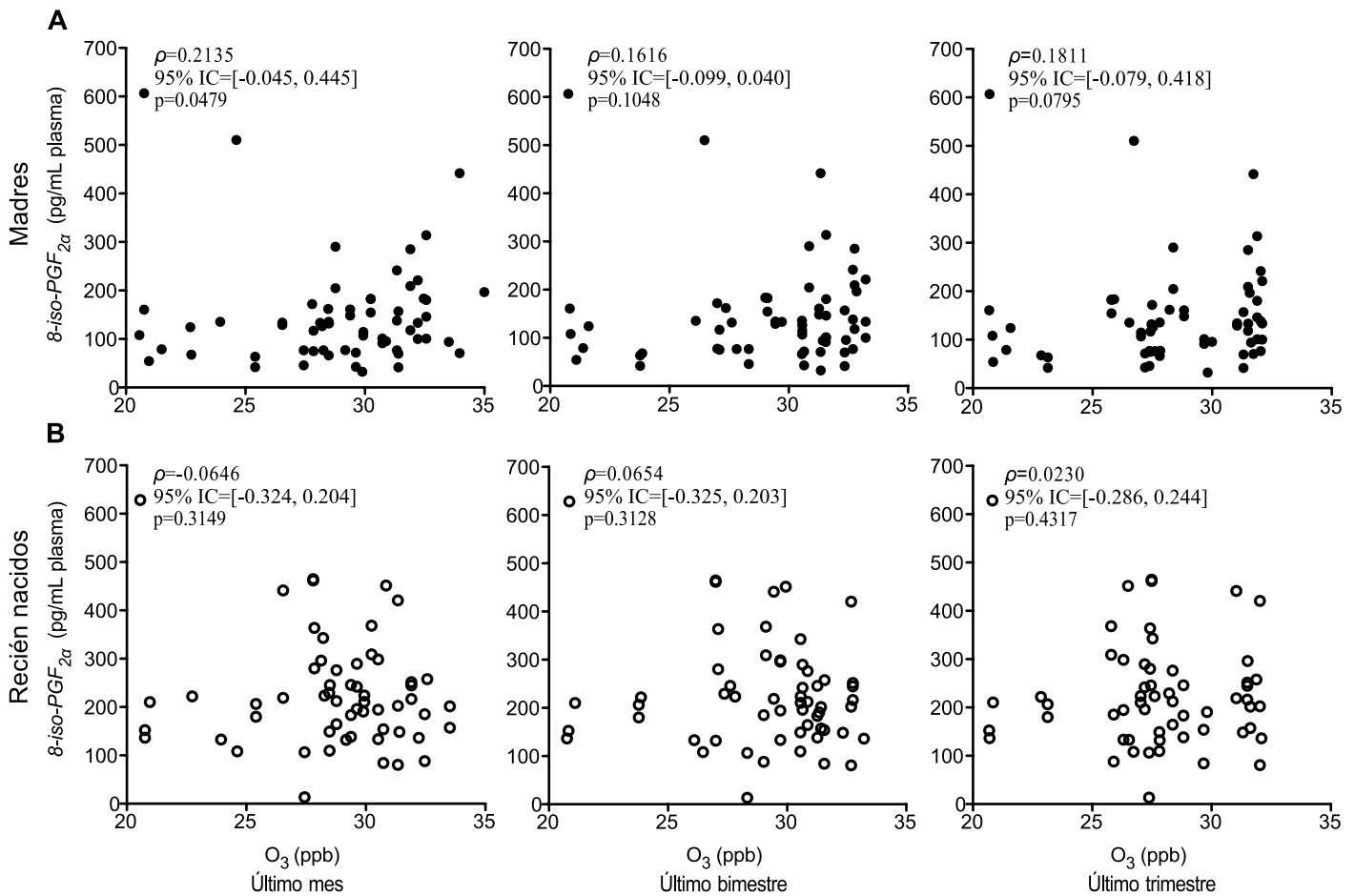
Se exploró la asociación entre los niveles de exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  y  $\text{PM}_{10}$  con los niveles de *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  detectados en plasma. Sin embargo, no se encontró ninguna asociación significativa en los niveles de *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  en plasma materno y de cordón umbilical con los niveles ambientales de PM (datos no mostrados).





**Figura 15.** Niveles de  $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$  en plasma materno y de cordón umbilical. A) Niveles de  $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$  en muestras de plasma de madres y cordón umbilical. La comparación se realizó mediante la prueba para muestra pareadas de Wilcoxon,  $*p<0.0001$ . B) Correlación entre los niveles de  $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$  en plasma materno y plasma de cordón umbilical, ( $\rho=0.265$ , 95% IC [-0.039-0.524],  $p=0.039$ ).

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación de los niveles de  $O_3$  con los niveles de  $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$ , este contaminante junto con el PM provocan frecuentemente las contingencias ambientales en la ZMCM. Se realizaron correlaciones de Spearman durante el último trimestre de la gestación considerando los niveles promedio de  $O_3$  ambiental del último mes, último bimestre y último trimestre (figura 16). En este caso, sólo se encontró una correlación estadísticamente significativa en el grupo de las madres durante el último mes de la gestación ( $\rho=0.2135$ , 95% IC [-0.045, 0.445],  $p=0.047$ ; Figura 16A), en los otros periodos de tiempo no se observaron correlaciones significativas. No se encontraron asociaciones entre los niveles ambientales de  $O_3$  y los niveles de  $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$  en plasma de cordón umbilical.



**Figura 16.** Correlación de los niveles de exposición a O<sub>3</sub> en madres y recién nacidos en diferentes ventanas de tiempo en el último periodo de gestación comparados con los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en plasma. A) Niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en muestras de plasma materno, se puede apreciar que solamente durante el último mes del embarazo se encontró una asociación significativa con los niveles de O<sub>3</sub> ambiental. B) Niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en plasma de cordón umbilical, en este caso no se encontraron asociaciones significativas entre el factor de exposición y el biomarcador.

### 6.1.7 Efecto de los polimorfismos en los niveles de aductos en el DNA e isoprostanos

Se exploraron las asociaciones entre los niveles de aductos en el DNA y los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> con las variantes alélicas de riesgo consideradas en este estudio (Tabla V y VII). Primeramente, se realizaron análisis individuales en los cuales se exploró el efecto de cada uno de los polimorfismos (maternos y del feto) en los biomarcadores de daño. Únicamente para el polimorfismo de *NQO1*\*2 se encontraron diferencias en los niveles de aductos en las

muestras de sangre materna, aquellas mujeres portadoras de el genotipo heterocigoto Pro/Ser tuvieron menos aductos comparadas con las portadoras de genotipo homocigoto silvestre Pro/Pro ( $p=0.02$ ; Tabla V), de manera interesante no encontramos diferencias con el genotipo doble mutante Ser/Ser. Ninguno de los otros polimorfismos estudiados se asoció con cambios en los biomarcadores de daño. Para los polimorfismos de *CYP1B1* y *MGMT* se analizaron los genotipos heterocigotos y homocigotos mutantes juntos asumiendo que la presencia de al menos un alelo mutante confiere riesgo. También, debido al reducido tamaño de la muestra de los individuos portadores del genotipo doble mutante los análisis genéticos se realizaron en conjunto con los individuos heterocigotos.

**Tabla V. Características descriptivas de las variantes alélicas de resigo estudiadas y su relación con los aductos en el DNA y los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.**

Polimorfismos		Madres			Neonatos		
Genes	Genotipos	N (%)	Aductos en el DNA <sup>1</sup> (Mediana [RI])	8-iso-PGF <sub>2α</sub> <sup>2</sup> (Mediana [RI])	N (%)	Aductos en el DNA <sup>1</sup> (Mediana [RI])	8-iso-PGF <sub>2α</sub> <sup>2</sup> (Mediana [RI])
<i>GSTM1</i>	Nulo	40 (37.7)	1.186 [0.483-1.836]	114.6 [69.56-172]	41 (39.8)	1.328 [0.895-2.048]	213.5 [139.3-268.7]
	Positivo	66 (62.3)	1.075 [0.528-1.826]	133.3 [77.1-180.4]	62 (60.2)	1.343 [0.750-2.080]	202.5 [149.1-289.6]
<i>CYP1B1</i>	Leu/Leu	80 (75.5)	1.104 [0.513-1.832]	126.3 [91.3-172]	80 (79.2)	1.328 [0.760-1.897]	210.5 [148.8-292.8]
	Leu/Val + Val/Val	22 (20.8) 4 (3.8)	1.191 [0.482-1.916]	105.2 [58.3-155.2]	21 (20.8) 0 (0)	1.417 [0.709-2.613]	208.3 [152.8-250]
<i>MGMT</i>	Leu/Leu	55 (51.9)	1.205 [0.538-1.876]	128.1 [78.2-163.5]	53 (51.5)	1.340 [0.848-2.182]	210 [160.9-302.5]
	Leu/Phe + Phe/Phe	43 (40.6) 8 (7.5)	0.978 [0.480-1.822]	127.6 [75.4-181.9]	41 (39.8) 9 (8.7)	1.410 [0.728-2.003]	200.5 [135.2-247.2]
<i>NQO1</i>	Pro/Pro	35 (34.0)	1.242 [0.754-1.873]	116.9 [76.5-180.4]	30 (29.1)	1.569 [0.832-1.969]	222 [164.5-342.8]
	Pro/Ser	54 (52.4)	<b>0.785</b> <b>[0.432-1.669]*</b>	131.9 [100-160.9]	57 (55.3)	1.328 [0.790-2.217]	201.7 [137.2-250]
	Ser/Ser	14 (13.6)	1.614 [0.896-1.946]	146.2 [62.8-188.7]	16 (15.5)	1.118 [0.525-1.883]	244.8 [153.2-254.6]

1: Aductos 10<sup>8</sup>/nucleótidos; 2: pg/mL de plasma; RI: Rango Intercuartil; \*Diferencia estadísticamente significativa vs el genotipo Pro/Pro, Prueba de Kruskal-Wallis, p=0.02.

Se realizaron análisis de regresión múltiple para identificar cuáles variables podrían estar influyendo en los niveles de aductos detectados en sangre de cordón umbilical, se consideraron las variantes polimórficas de los genes de *CYP1B1*, *GSTM1*, *NQO1* y *MGMT* tanto para los genotipos fetales como para los genotipos maternos (Tabla VI). Los análisis de regresión múltiple se realizaron por separado para cada diámetro aerodinámico de partícula debido a la colinearidad de las concentraciones de partículas, cada diámetro de partícula se utilizó como la covariable de cada modelo de regresión múltiple.

**Tabla VI. Análisis de regresión múltiple entre los niveles de aductos en el DNA (transformados a Log) sangre de cordón umbilical, PM y las variantes alélicas de riesgo en madres y neonatos.**

Variables	PM <sub>2.5</sub>		PM <sub>10</sub>	
	Coefficiente $\beta$	p-value	Coefficiente $\beta$	p-value
PM	0.0645	<0.001	0.0159	<0.001
Variantes alélicas de riesgo fetales				
<i>CYP1B1</i> *3 (RN)	0.257	<b>0.009</b>	0.212	<b>0.035</b>
<i>GSTMI</i> *0 (RN)	-0.0003	0.997	0.0143	0.883
<i>MGMT</i> L84F (RN)	-0.101	0.262	-0.0587	0.528
<i>NQO1</i> Pro/Ser (RN)	0.00005	0.995	0.0859	0.377
<i>NQO1</i> Ser/Ser (RN)	-0.0851	0.492	-0.0178	0.890
Variantes alélicas de riesgo maternas				
<i>CYP1B1</i> *3 (MA)	-0.189	<b>0.034</b>	-0.135	0.144
<i>GSTMI</i> *0 (MA)	0.0218	0.817	0.0402	0.679
<i>MGMT</i> L84F (MA)	0.0498	0.586	0.0487	0.607
<i>NQO1</i> Pro/Ser (MA)	-0.117	0.177	-0.134	0.139
<i>NQO1</i> Ser/Ser (MA)	0.0365	0.768	-0.00994	0.939

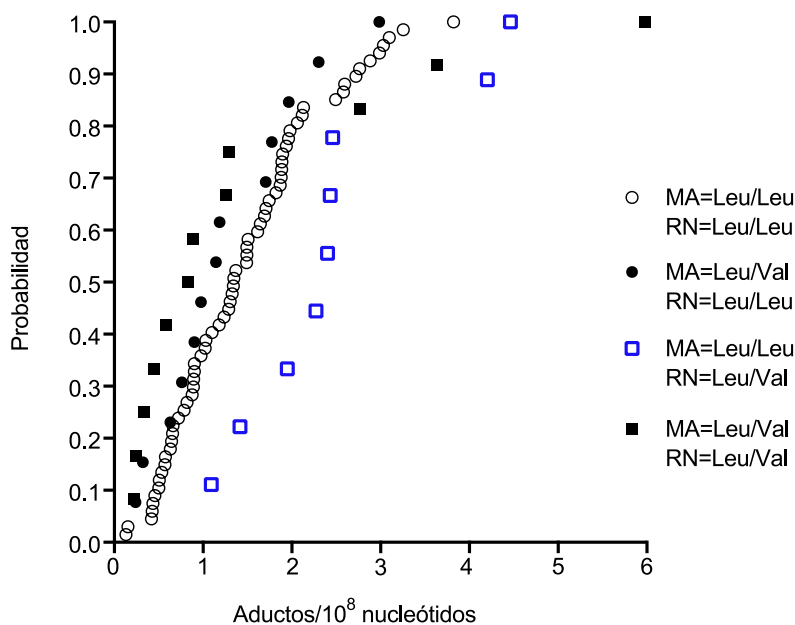
Valores significativos resaltados en negrita.

En el caso del PM<sub>2.5</sub> como covariable, el polimorfismo del *CYP1B1* influyó de manera positiva sobre los niveles de aductos en cordón umbilical asociados a los niveles ambientales de PM<sub>2.5</sub> ( $\beta=0.257$ ,  $p=0.009$ ; Tabla VI). De manera interesante, la presencia de al menos un alelo mutante de *CYP1B1*\*3 en el genoma materno fue asociada con menores niveles de aductos en el DNA de sangre de cordón umbilical ( $\beta=-0.189$ ,  $p=0.034$ ; Tabla VI).

En el caso del PM<sub>10</sub> como covariable, se observaron resultados similares, se encontraron niveles de aductos más elevados en los recién nacidos portadores de al menos un alelo mutante del *CYP1B1*\*3 ( $\beta=0.212$ ,  $p=0.035$ ; Tabla VI). De manera similar a lo observado en los análisis de correlación de Spearman (Figuras 13 y 14) la asociación entre las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> y los niveles de aductos en el DNA de cordón umbilical fue más fuerte que la observada con los niveles ambientales de PM<sub>10</sub> ( $\beta=0.0645$ ,  $p<0.001$ ; Tabla VI) vs ( $\beta=0.0159$ ,  $p<0.001$ ; Tabla VI) respectivamente.

Se realizaron regresiones múltiples para los niveles de aductos en sangre materna y las variantes alélicas de riesgo. Sin embargo, no se encontraron asociaciones a excepción de la asociación previamente establecida del efecto de *NOQ1* en los niveles de aductos maternos (Tabla V).

Finalmente, se realizó un análisis de distribución empírica acumulativa, mediante esta prueba se evaluó el efecto de las distintas combinaciones del polimorfismo de *CYP1B1* en la condición materna y fetal. Encontramos que la siguiente configuración de genotipos: Leu/Leu materno y Leu/Val fetal tiene niveles superiores de aductos en sangre de cordón umbilical (Figura 17, símbolos azules). Estos resultados de nuevo confirman la susceptibilidad fetal para generar aductos en el DNA, y que existe cierta participación del genotipo materno en la formación de aductos en el feto. En este estudio no encontramos asociaciones entre los niveles de aductos y otros polimorfismos, así como con los niveles de isoprostanos.



**Figura 17.** Análisis de distribución empírica acumulada de las combinaciones de genotipos para el polimorfismo *CYP1B1*\*3 en madres (MA) e hijos (RN) respecto a los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical. Las diferencias en las curvas indican distintas distribuciones de datos para cada una de las combinaciones de genotipos, la combinación MA=Leu/Leu y RN=Leu/Val (símbolos azules) incrementa los niveles de aductos en el hijo.

## ***6.2 Resultados Parte 2: Niveles de micronúcleos en linfocitos maternos y de cordón umbilical asociados a la exposición ambiental a PM***

### ***6.2.1 Población de estudio***

Las muestras analizadas en este caso fueron de ambas cohortes: zona norte (mujeres que acudieron al Centro Médico Nacional “La Raza”) y zona sureste (mujeres que acudieron al Hospital CIMIGen). De aproximadamente 200 muestras colectadas de ambos hospitales, se obtuvieron 84 cultivos de linfocitos satisfactorios para el análisis de micronúcleos y que cumplieron los criterios de inclusión. Las características demográficas de la población de estudio se muestran en la Tabla VII. El promedio de edad materna fue de  $27.34 \pm 5.45$  años, el promedio de edad gestacional fue de  $39.16 \pm 1.22$  semanas, la talla del recién nacido al momento del parto fue de  $50.40 \pm 1.74$  cm y su peso fue de  $3188 \pm 398.4$  g. Todos los parámetros antes mencionados se consideran normales para nacimientos a término y el 52 % de los recién nacidos fueron de sexo masculino. El 47.62% de las mujeres voluntarias fueron amas de casa y el mismo porcentaje corresponde a mujeres que trabajaron durante el embarazo. El 17% de las voluntarias reportaron haber fumado antes del embarazo y todas las mujeres con niveles superiores a 200 ng/mL de cotinina en orina fueron descartadas, eliminando de tal modo voluntarias con tabaquismo activo.

**Tabla VII. Características demográficas de la población de estudio.**

---

Número de voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión	84
Edad gestacional del neonato (semanas; media $\pm$ DE)	39.16 $\pm$ 1.22
Sexo del neonato n (%)	
Masculino	44 (52.39)
Femenino	38 (45.23)
Datos no reportados	2 (2.38)
Peso al nacimiento (gr; media $\pm$ DE)	3188 $\pm$ 398.4
Longitud al nacimiento (cm; media $\pm$ DE)	50.40 $\pm$ 1.74
Edad materna (años; media $\pm$ DE)	27.34 $\pm$ 5.45
Ocupación materna/exposición n (%)	
Ama de casa	40 (47.62)
Empleada	40 (47.62)
Exposición ocupacional a PAHs	0 (0)
No reportado	4 (4.76)
Tabaquismo previo al embarazo	
Si	15 (17.86)
No	66 (78.57)
No reportado	3 (3.57)
Exposición a Material Particulado ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; mediana $\pm$ [RI])	
PM <sub>2.5</sub>	23 [16.69, 26.55]
PM <sub>10</sub>	42.27 [31.87, 55.76]

---

DE: Desviación estándar. RI: Rango Intercuartil.

### ***6.2.2 Frecuencia de micronúcleos y parámetros del citoma en madres y recién nacidos expuestos a PM en la ZMCM***

El ensayo de cuantificación de micronúcleos (MN) permite detectar rompimientos cromosómicos lo cual usualmente resulta en daño permanente para la célula. Niveles elevados de micronúcleos se han asociado con un incremento en el riesgo a desarrollar diferentes tipos de cáncer [Bonassi et al., 2001; Fenech et al., 2003; Fenech and Morley, 1985]. En este trabajo, además de la cuantificación de los niveles de micronúcleos, otros tipos de daños celulares fueron analizados como gemaciones (buds en inglés), células apoptóticas y células necróticas.



**Tabla VIII. Niveles de los biomarcadores de la población de estudio y correlaciones de Spearman con la exposición a PM.**

<b>A. Niveles de los biomarcadores en sangre materna y de cordón umbilical (mediana <math>\pm</math> [RI]).</b>					
	Frecuencia de Micronúcleos en 1000 células binucleadas (Valores Min. - Max.)	% Células binucleadas	Gemaciones	Células apoptóticas	Células Necróticas
Sangre materna	5 $\pm$ [3-6.75] (1-14)	48 $\pm$ [34.5-56.38]	20.5 $\pm$ [14-30.5]	10 $\pm$ [4-13.75]	14.5 $\pm$ [2.25-29.75]
Sangre cordón umbilical	1.5 $\pm$ [0.25-2.75] (0-9)	37.75 $\pm$ [19.63-50]	22.5 $\pm$ [12-37.75]	11.5 $\pm$ [5.25-20.5]	9 $\pm$ [4-19]

<b>B. Influencia de la edad y la exposición materna (Coeficiente <math>\rho</math> [95% IC]; valor de p).</b>	
MN maternos vs MN linfocitos cordón umbilical	0.3767 [0.170, 0.551] <b>p=0.0002</b>
Edad materna vs Frecuencia materna de MN	0.3499 [0.137, 0.531] <b>p=0.0006</b>
Edad materna vs Frecuencia fetal de MN	-0.0258 [-0.195, 0.245] p=0.4078

<b>C. Efecto de la exposición a PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> durante el último mes de la gestación sobre los biomarcadores (Coeficiente <math>\rho</math> [95% IC]; valor de p).</b>						
Ultimo mes de exposición	Biomarcadores					
	Frecuencia de micronúcleos	% Células binucleadas	Gemaciones	Células apoptóticas	Células necróticas	
PM <sub>2.5</sub>	Sangre materna	0.2119 [-0.009, 0.413] <b>p=0.0265</b>	-0.0230 [-0.242, 0.198] p=0.4176	0.0559 [-0.166, 0.273] p=0.3067	0.0870 [-0.136, 0.301] p=0.2155	-0.0559 [-0.273, 0.166] p=0.3068
	Sangre cordón umbilical	0.1826 [-0.039, 0.387] <b>p=0.0482</b>	-0.1591 [-0.366, 0.063] p=0.0742*	-0.0210 [-0.240, 0.200] p=0.4247	0.204 [-0.017, 0.406] <b>p=0.0313</b>	-0.1266 [-0.337, 0.096] p=0.1257
PM <sub>10</sub>	Sangre materna	0.1797 [-0.042, 0.384] p=0.0510*	-0.0580 [-0.275, 0.164] p=0.2999	0.0258 [-0.195, 0.245] p=0.4078	0.0421 [-0.180, 0.260] p=0.3518	-0.0881 [-0.303, 0.134] p=0.2100
	Sangre cordón umbilical	0.1908 [-0.031, 0.394] <b>p=0.0411</b>	-0.1791 [-0.384, 0.043] p=0.0515*	-0.0118 [-0.231, 0.209] p=0.4575	0.1074 [-0.115, 0.320] p=0.1653	-0.1165 [-0.328, 0.106] p=0.1456

Resultados significativos marcados en negritas. \*Resultados marginalmente significativos. IC: Intervalo de Confianza. RI: Rango Intercuartil.

Los datos descriptivos de los niveles de MN y los parámetros del citoma se presentan en la Tabla VIII.A. El valor de la mediana  $\pm$  el rango intercuartil de los MN maternos fue de 5  $\pm$  [3, 6.75], en el caso de las frecuencias de MN fetales fue 1.5  $\pm$  [0.25, 2.75]. Los niveles de

MN fetales resultaron ser más altos de lo que se podría esperar en condiciones normales, trabajos previos han mostrado que la frecuencia de MN en sangre de cordón umbilical es menor en sitios con niveles más bajos de contaminación [Levario-Carrillo et al., 2005]. En cuanto a los “buds” y las células apoptóticas, los valores de la mediana fueron más altos para los linfocitos de sangre de cordón umbilical. En el caso de los conteos de células necróticas, los valores de la mediana más altos se registraron en las muestras maternas (Tabla VIII.A).

Se encontró una correlación significativa entre los niveles de MN en sangre materna y sangre de cordón umbilical ( $\rho=0.3767$ , 95% IC [0.170, 0.551],  $p=0.0002$ ; Tabla VIII.B). Estos datos sugieren que la exposición materna a la contaminación ambiental podría tener efectos en los niveles de daño en sangre fetal. Este resultado podría implicar la transferencia efectiva de sustancias tóxicas a través de la placenta, se ha documentado la transferencia de los PAHs a través del tejido placentario en eventos de exposición gestacional a partículas [Jedrychowski et al., 2013; Perera et al., 2005b].

Al asociar los niveles de MN en linfocitos maternos con la edad materna, encontramos una correlación significativa ( $\rho=0.3499$ , 95% IC [0.137, 0.531],  $p=0.0006$ ; Tabla VIII.B). Se tiene evidencia del efecto de la edad y el incremento paulatino de los niveles de MN en poblaciones humanas, por lo que es resultado anterior concuerda con lo que se encuentra reportado en la literatura científica [Fenech and Morley, 1985; Peace and Succop, 1999]. Del mismo modo, se exploró si existía una correlación entre los niveles de MN en sangre de cordón umbilical y la edad materna, y en este caso no se encontró ninguna asociación significativa entre ambas variables ( $\rho=0.0258$ , 95% IC [-0.195, 0.245],  $p=0.4078$ ). Los resultados anteriores sugieren que la edad materna podría no tener un efecto en los niveles de MN fetales. Sin embargo, se encontró una dependencia entre los niveles de MN maternos y fetales. Independientemente de la edad materna, la exposición ambiental materna tiene relación con los niveles de daño al DNA fetal. Por tal motivo, se realizaron análisis de correlación entre los niveles de MN y los parámetros de citoma en ambos grupos y las concentraciones de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  calculadas para el último mes de la gestación (Tabla VIII.C).

Se encontró que el incremento en la exposición a  $PM_{2.5}$  estuvo asociada con niveles más altos de MN tanto en madres como en recién nacidos ( $\rho=0.2119$ , 95% IC [-0.009, 0.413],  $p=0.0265$

y  $\rho=0.1826$ , 95% IC [-0.039, 0.387],  $p=0.0482$ ; respectivamente). De manera similar, se encontró una asociación cercana a la significancia entre los niveles de exposición a  $PM_{10}$  y la frecuencia de MN en sangre materna ( $\rho=0.1797$ , 95% IC [-0.042, 0.384],  $p=0.0510$ ), en el caso de los linfocitos de sangre de cordón umbilical, se observó que a mayores niveles de  $PM_{10}$  se observaban niveles más elevados de MN ( $\rho=0.1908$ , 95% IC [-0.031, 0.394],  $p=0.0411$ ). Estos datos sugieren que la exposición materna a PM de la ZMCM influye sobre los niveles de daño al DNA detectados en los linfocitos de sangre de cordón umbilical.

**Tabla IX. Análisis de regresión múltiple entre los niveles de la frecuencia de micronúcleos por 1000 células binucleadas (transformados a Log) sangre de cordón umbilical y sangre materna contra  $PM_{2.5}$ ,  $PM_{10}$ , edad materna y ocupación.**

<b>Análisis <math>PM_{2.5}</math></b>				
Variables	Frecuencia de micronúcleos en cordón umbilical		Frecuencia de micronúcleos maternos	
	<b>Coefficiente <math>\beta</math></b>	<b>p-value</b>	<b>Coefficiente <math>\beta</math></b>	<b>p-value</b>
Exposición a $PM_{2.5}$	0.0218	<b>0.042</b>	0.00630	<b>0.054*</b>
Edad materna	-0.00857	0.527	0.0125	<b>0.002</b>
Ocupación materna	0.0833	0.564	-0.0632	0.131

<b>Análisis <math>PM_{10}</math></b>				
Variables	Frecuencia de micronúcleos en cordón umbilical		Frecuencia de micronúcleos maternos	
	<b>Coefficiente <math>\beta</math></b>	<b>p-value</b>	<b>Coefficiente <math>\beta</math></b>	<b>p-value</b>
Exposición a $PM_{10}$	0.00871	0.103	0.00150	0.364
Edad materna	0.120	0.404	0.0128	<b>0.002</b>
Ocupación materna	-0.00916	0.507	-0.0537	0.203

Resultados significativos resaltados en negrita. \*Resultado marginalmente significativo.

En el caso de las muestras de sangre de cordón umbilical, se encontraron asociaciones negativas cercanas a la significancia entre el incremento de la exposición a  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  con la disminución del porcentaje de células binucleadas de los cultivos celulares ( $\rho=-0.1591$ , 95% IC [-0.366, 0.063],  $p=0.0742$  y  $\rho=-0.1791$ , 95% IC [-0.384, 0.043],  $p=0.0515$ , respectivamente; Tabla VIII.C). Además, en las muestras de cordón umbilical, se encontró

una asociación entre la exposición a  $PM_{2.5}$  y el incremento de células apoptóticas ( $p=0.204$ , 95% IC [-0.017, 0.406],  $p=0.0313$ ).

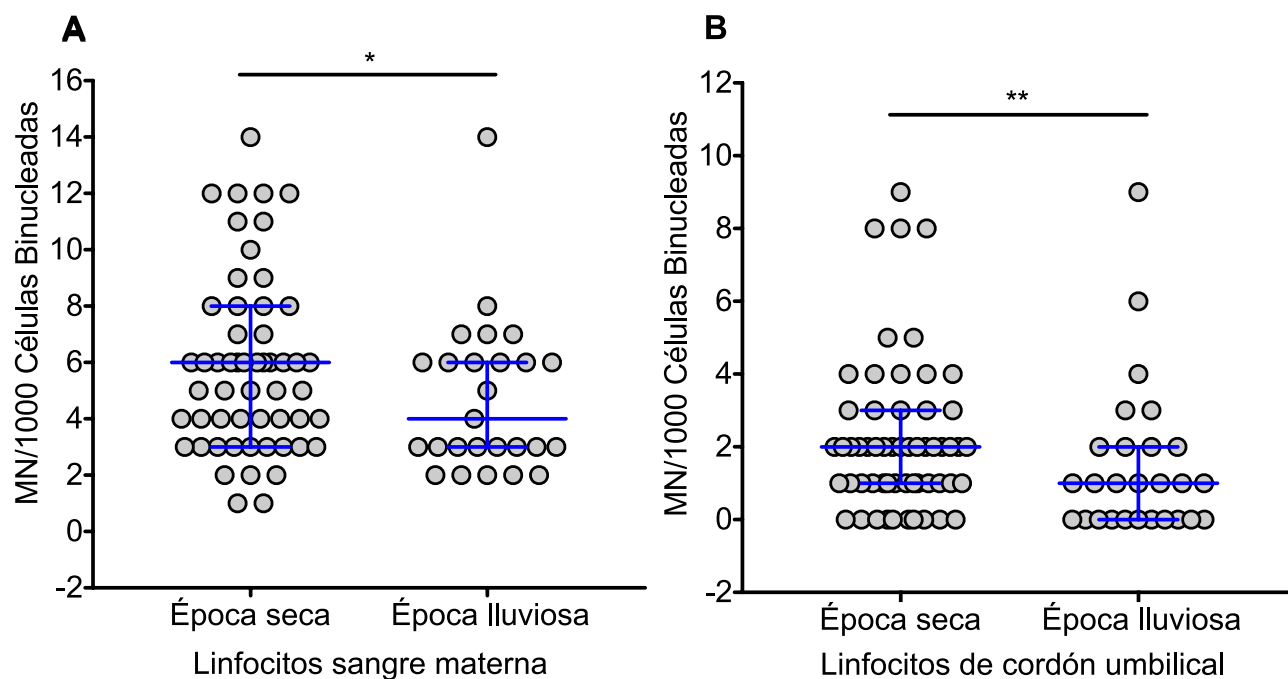
### ***6.2.3 Efecto de la exposición a PM sobre la frecuencia de MN ajustada por edad y ocupación materna***

Se realizaron análisis de regresión múltiple entre los niveles ambientales de PM y las frecuencias de MN en linfocitos maternos y de cordón umbilical ajustado por la edad y la ocupación materna (variables que podrían influir sobre la frecuencia de MN; Tabla IX). Los análisis de regresión múltiple se llevaron a cabo de manera independiente para  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  debido a la colinearidad que existe entre ambas variables.

En la Tabla IX se presentan estos resultados, la exposición a  $PM_{2.5}$  explica el incremento de la frecuencia de MN en linfocitos fetales ( $\beta=0.00937$ ,  $p=0.050$ ) de manera independiente a la edad y la ocupación materna. En el caso de la exposición a  $PM_{10}$ , no se encontró asociación con la frecuencia de MN ( $\beta=0.00370$ ,  $p=0.125$ ) en combinación con las variables maternas consideradas. En el caso de la frecuencia de MN en sangre materna, la exposición a  $PM_{2.5}$  se encontró marginalmente asociada ( $\beta=0.00708$ ,  $p=0.076$ ); sin embargo, la edad materna tiene más efecto sobre el incremento de la frecuencia de MN ( $\beta=0.0141$ ,  $p=0.005$ ). El mismo efecto se puede observar con la exposición a  $PM_{10}$ , en donde solamente la edad materna está asociada con la frecuencia de MN ( $\beta=0.0143$ ,  $p=0.005$ ).

### ***6.2.4 Efecto de la época del año en la formación/eliminación de MN en linfocitos de sangre de cordón umbilical***

Se ha documentado la variación importante estacional de las concentraciones de partículas en la Ciudad de México y cómo estos cambios pueden impactar los niveles de PAHs en el PM y a su vez afectar los niveles de biomarcadores de daño en el DNA [Garcia-Suastegui et al., 2011; Mugica et al., 2010]. Con los datos de este estudio, se encontró un incremento significativo de la frecuencia de MN tanto en linfocitos maternos como de sangre de cordón umbilical ( $p=0.043$  y  $p=0.0152$ ; respectivamente) obtenidos durante la época seca del año (noviembre-mayo) comparado con la frecuencia de MN de muestras colectadas en la época lluviosa (junio-octubre) (Figura 18).



**Figura 18.** Variaciones estacionales de los niveles de MN en linfocitos maternos y de cordón umbilical. A) Diferencias en los niveles de MN en muestras maternas de acuerdo con la época del año. B) Disminución de los niveles de MN en linfocitos de cordón umbilical considerando la época de nacimiento. Para clasificar las muestras, se utilizó como criterio el último mes de gestación. Las diferencias fueron analizadas a través de la prueba de U de Mann-Whitney. \* $p=0.043$ , \*\* $p=0.0152$ .

## 7. *Discusión*

Alrededor del mundo la exposición prenatal al aire contaminado se ha sido asociada con nacimientos adversos [Brauer et al., 2008; Choi et al., 2008; Ebisu et al., 2016; Padula et al., 2014; Vinikoor-Imler et al., 2014; Vinikoor-Imler et al., 2015], retardo en el desarrollo del sistema nervioso central [Perera et al., 2006; Peterson et al., 2015], disminución en el IQ en niños [Perera et al., 2014; Perera et al., 2009b], incremento en la incidencia de asma [Perera et al., 2009a; Tang et al., 2012], cambios en los patrones de metilación del DNA [Herbstman et al., 2012] y con niveles elevados de daño al DNA [Jedrychowski et al., 2013; Perera et al., 2005b].

Específicamente en la ZMCM se han realizado estudios en los que se ha asociado el efecto de la contaminación del aire y efectos adversos en el sistema respiratorio en niños [Calderon-Garciduenas et al., 2003; Calderon-Garciduenas et al., 2001; Rojas-Martinez et al., 2007]. Del mismo modo, se han realizado algunas investigaciones que evaluaron el efecto de la contaminación del aire sobre la mortalidad perinatal [Loomis et al., 1999].

En el caso de los aductos en el DNA, este tipo de daño químico al DNA ha sido considerado como un biomarcador útil en la estimación del riesgo para desarrollar distintos tipos de cáncer [Poirier, 2004]. Los aductos en el DNA igualmente son considerados como un biomarcador de dosis biológicamente efectiva debido a que representan la cantidad de agentes carcinógenos unidos covalentemente al DNA y que han escapado de los procesos de desintoxicación y reparación del DNA [Castano-Vinyals et al., 2004; Godschalk et al., 2003; Poirier, 1997].

La exposición al aire contaminado ha sido relacionada con rompimiento de cromosomas o pérdida de fragmentos cromosomales en linfocitos de sangre periférica usando ensayo de detección de la frecuencia de micronúcleos. Este tipo de daño refleja la inestabilidad genómica asociada con un incremento a desarrollar diversos tipos de cáncer [Pavanello et al., 2009; Pavanello et al., 2008; Pavanello and Lotti, 2012]. La detección de los niveles de MN en linfocitos puede representar lo que podría estar ocurriendo en otros tejidos. En estudios previos se ha demostrado la asociación positiva entre los niveles ambientales de PM y PAHs con el incremento de la frecuencia de MN en poblaciones europeas [Pedersen et al., 2006; Pedersen et al., 2009].

En este trabajo evaluamos el impacto del PM y ozono atmosféricos sobre los niveles de biomarcadores de daño en el DNA como los aductos y la frecuencia de micronúcleos, así como en los niveles de daño oxidante en lípidos a través de los niveles de *8-iso-PGF<sub>2α</sub>*. Se analizó también la relación de variantes alélicas de riesgo y su efecto sobre los niveles de aductos en el DNA. En este estudio, participaron mujeres embarazadas no fumadoras habitantes de dos sitios afectados por la contaminación atmosférica en la ZMCM, específicamente en la zona norte y la zona oriente, que acudieron durante el periodo de 2014 a 2018 al Centro Médico “La Raza” del IMSS y al Hospital CIMIGen respectivamente.

### *7.3 Niveles de marcadores de daño en el DNA (aductos y micronúcleos)*

Los datos generados en este trabajo muestran que los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical son más altos a los detectados en sangre materna (Figura 11A), en otros trabajos se ha estudiado la relación que existe entre los niveles de aductos en ambas matrices biológicas. En esos reportes, los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical son iguales o superiores a los detectados en sus madres, esto fue observado en ciudades con diferentes grados de contaminación atmosférica [Herbstman et al., 2012; Jedrychowski et al., 2013; Perera et al., 2005a; Perera et al., 2005b; Perera et al., 2011; Tang et al., 2006; Topinka et al., 2009], lo cual sugiere que, independientemente del grado de contaminación se pueden detectar aductos en cordón umbilical y que los neonatos son más susceptibles a la exposición a PM.

Además, para analizar lo que ocurre entre cada par madre-recién nacido, se calculó el cociente entre los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical y los niveles de aductos en sangre materna (RACUM; Figura 12B y Tabla III), es importante mencionar que valores de RACUM superiores a 1 pueden representar mayor susceptibilidad fetal a generar daño comparado con sus propias madres [Jedrychowski et al., 2013]. Los datos muestran valores del RACUM > 1 en el 60% de las muestras analizadas, esto implica que en su mayoría los hijos tuvieron niveles de daño superiores a sus propias madres. Además, nosotros encontramos una correlación significativa entre los niveles de aductos maternos y los niveles de aductos cuantificados en sangre de cordón umbilical (Figura 11B), esto sugiere la relación entre la exposición materna y los niveles de daño fetal. De manera similar, los niveles de MN maternos mostraron una asociación significativa entre los niveles de MN en linfocitos de cordón umbilical (Tabla VIII.B). Los resultados anteriores sugieren la transferencia transplacentaria de los compuestos asociados al PM de la ZMCM. En modelos animales y en poblaciones humanas, existe evidencia que indica el paso de los PAHs a través de la barrera placentaria y de la acumulación de metabolitos reactivos derivados de los PAHs en sangre de cordón umbilical [Neubert and Tapken, 1988; Sexton et al., 2011; Srivastava et al., 1986]. Además, se ha demostrado la capacidad del tejido placentario para metabolizar a los PAHs y de este modo generar aductos en el DNA [Janssen et al., 2017; Suter et al., 2010; Topinka et al., 2009]. En el caso de la frecuencia de micronúcleos, se ha demostrado que la exposición

intrauterina al aire contaminado incrementa los niveles de MN y conforme pasa el tiempo después de la exposición intrauterina, los niveles de MN tienden a ir disminuyendo, esto podría reflejar mayor susceptibilidad durante el periodo gestacional [Milosevic-Djordjevic et al., 2005]. Se ha reportado la asociación entre la exposición ambiental a PAHs y la frecuencia de MN en poblaciones ocupacionalmente expuestas [Pavanello et al., 2009; Pavanello et al., 2008; Pedersen et al., 2009] y en poblaciones de mujeres gestantes [Pedersen et al., 2012; Pedersen et al., 2015]. Los resultados previamente discutidos sugieren que en la ZMCM los PAHs y sus metabolitos reactivos tienden a acumularse en los neonatos y de ese modo incrementan el riesgo a generar niveles elevados de aductos y MN en el DNA.

En el caso de la exposición ambiental a partículas, encontramos una asociación significativa entre los niveles de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  con la cantidad de aductos tanto en sangre de cordón umbilical como en sangre materna. Las concentraciones de  $PM_{2.5}$  mostraron correlaciones significativas con los niveles de aductos durante el último bimestre y el último trimestre de la gestación (Figura 13). En el caso de  $PM_{10}$ , en todas las ventanas de tiempo encontramos asociaciones significativas sin poder diferenciar cual es el periodo de mayor vulnerabilidad al daño al DNA (Figura 14).

Adicionalmente, los aductos en el DNA mostraron una tendencia lineal con las concentraciones ambientales de  $PM_{2.5}$ , de tal modo que a niveles bajos de exposición a  $PM_{2.5}$  la generación de aductos puede ser observada (Figura 13). Las concentraciones de  $PM_{2.5}$  a las que estuvieron expuestas las voluntarias superaron los niveles seguros sugeridos por la Norma Oficial Mexicana de  $12\mu\text{g}/\text{m}^3$  y los niveles seguros establecidos por la OMS de  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  [NOM, 2014]. En el caso del  $PM_{10}$ , las asociaciones solo siguieron una tendencia lineal cuando se analizaban valores de exposición por arriba de  $48.58\mu\text{g}/\text{m}^3$ , por debajo de tal valor no hay una correlación aparente (Figura 14). Es importante resaltar que el nivel seguro sugerido por la Norma Oficial Mexicana es de  $40\mu\text{g}/\text{m}^3$  y en el caso de la OMS es de  $35\mu\text{g}/\text{m}^3$  [NOM, 2014]. Los resultados anteriores sugieren que el  $PM_{2.5}$  es el contaminante que muestra una mejor asociación con los niveles de daño.

Relacionado con la concentración de PM en el aire, observamos cambios en los niveles de los biomarcadores de daño al DNA en relación con la época del año. Las voluntarias y sus recién nacidos reclutados en la época seca del año y que, por lo tanto, el último mes de la



gestación fue en la época de alta contaminación tuvieron mayores niveles de aductos en el DNA y MN (Figura 12A y Figura 18). En los marcadores de daño genotóxico cuantificados en sangre de cordón umbilical la diferencia estacional fue más evidente que en el grupo de las madres, reforzando la idea de la susceptibilidad fetal. Se han reportado variaciones estacionales de los niveles de contaminantes en la ZMCM y del mismo modo cambios en los niveles de aductos en personas adultas [Garcia-Suastegui et al., 2011; Mugica et al., 2010]

Los resultados encontrados en la Tabla VIII.B y IX, sugieren que la edad materna no tiene efecto sobre los niveles de MN en linfocitos fetales. Sin embargo, en las madres la edad juega un papel muy importante en los niveles de este biomarcador, se ha reportado en la literatura la asociación entre los niveles de MN y la edad de los individuos [Kirsch-Volders et al., 2011; Peace and Succop, 1999]. En este estudio además de la edad, la exposición a PM<sub>2.5</sub> está también asociada con la generación de MN (Tabla IX).

En el caso de los niveles de MN, de manera interesante el PM<sub>2.5</sub> fue el diámetro aerodinámico que tuvo asociaciones significativas en las frecuencias de MN en sangre de cordón umbilical (Tabla VIII.C). Del mismo modo, mediante análisis de regresión múltiple, el PM<sub>2.5</sub> fue la variable que se asoció con los niveles de MN en cordón umbilical y con valores marginalmente significativos con los MN maternos (Tabla IX). También se encontró una asociación marginalmente significativa entre la exposición a PM<sub>10</sub> y el decremento en el porcentaje de células binucleadas en sangre de cordón umbilical (Tabla VIII.C). Este resultado es importante porque una disminución en la proliferación celular provocada por el daño al DNA podría afectar el desarrollo de otros órganos durante la gestación. Estos cambios celulares podrían incrementar el riesgo a desarrollar enfermedades en el transcurso de la vida. Se debe considerar que las células fetales pueden ser más susceptibles a los efectos de tóxicos ambientales debido a su alta tasa de proliferación celular, procesos de diferenciación más rápidos y mayor sensibilidad a las señales ambientales [Perera and Herbstman, 2011].

De manera general, en este trabajo encontramos que las concentraciones ambientales de PM<sub>2.5</sub> muestran asociaciones más altas con los marcadores de daño evaluados (aductos y micronúcleos). Algunas investigaciones y la OMS han resaltado el efecto perjudicial del PM<sub>2.5</sub> en la salud humana, especialmente por el hecho de que este tamaño aerodinámico de partículas tiene la capacidad de ingresar más profundamente en el sistema respiratorio [Churg

et al., 2003], inclusive pueden alcanzar con mayor facilidad otros órganos incluyendo la placenta [Topinka et al., 2009]. Se ha descrito que este diámetro aerodinámico de PM tiene niveles de PAHs más altos debido a que el PM<sub>2.5</sub> proviene de procesos de quema de combustibles fósiles empleados por los automóviles [Brunekreef and Holgate, 2002; Dockery and Pope, 1994; IARC, 2013, 2015; Pope et al., 2002]. Además, en partículas ultrafinas de la zona norte de la Ciudad de México se ha reportado que uno de los principales hidrocarburos en las partículas es el B[a]P, lo cual incrementa sustancialmente su capacidad para formar aductos [Morales-Rubio et al., 2019]. Aunque algunas investigaciones han mostrado que uno de los hidrocarburos más abundantes en las partículas de ambos diámetros aerodinámicos es el benzo[g,h,i]perileno (B[g,h,i]P), un hidrocarburo que no se ha reportado que genere aductos en el DNA [Amador-Munoz et al., 2011; Salcido-Neyoy et al., 2015; Zaragoza-Ojeda et al., 2016].

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que los aductos en el DNA tienen un tiempo de vida media corto (dos o tres meses) que después podrían ser reparados por el mecanismo NER. Se ha estimado en otras investigaciones que la vida media estimada para los aductos en el DNA en leucocitos es aproximadamente de 3-4 meses [Jedrychowski et al., 2013; Lee et al., 2017]. Sin embargo, algunos trabajos sugieren tiempos de eliminación más cortos y esto podría estar relacionado con los niveles de exposición. Por ejemplo, en trabajadores pavimentadores los cuales están en contacto continuo con el asfalto, la formación de aductos en el DNA incrementa significativamente a lo largo del periodo laboral, los niveles de aductos eran más bajos los lunes y los niveles más altos se observaban los viernes y la eliminación de los aductos ocurría en el transcurso del fin de semana [McClellan et al., 2007]. Otro estudio mostró la eliminación de los aductos en el DNA en aproximadamente 2 meses después de tratar casos de Psoriasis con alquitrán de hulla [Paleologo et al., 1992]. Nuestros resultados sugieren un tiempo de vida corto para los aductos en el DNA, lo cual implica que este biomarcador solamente puede asociado con exposiciones recientes.

Se realizaron análisis de correlación en periodos más tempranos de la gestación entre la exposición a PM y la generación de aductos. En el caso del primero y segundo trimestre, las correlaciones fueron negativas tanto para PM<sub>2.5</sub> como para PM<sub>10</sub>. Esto sugiere que las madres y los recién nacidos expuestos a altos niveles de PM en esos periodos no muestran niveles elevados de daño al final de la gestación (tercer trimestre). Estos resultados son interesantes

por que podrían representar procesos de reparación del DNA o el recambio celular. La reparación de los aductos en el DNA puede incrementar la tasa mutacional y así incrementar el riesgo a desarrollar diversos tipos de cáncer [Alexandrov et al., 2016].

#### ***7.4 Niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en muestras de plasma sanguíneo***

En el caso de los niveles de lipoperoxidación analizados, los isoprostanos son excelentes marcadores de daño oxidante a lípidos y se ha asociado con diversas enfermedades como aterosclerosis, infartos cardiacos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma [Cracowski et al., 2002].

En este estudio no encontramos asociación entre las concentraciones de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en plasma materno con los niveles de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub>. Sin embargo, encontramos asociación entre los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en plasma materno y las concentraciones de O<sub>3</sub> en el último mes del embarazo. En el caso de los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> en plasma de cordón umbilical, no encontramos asociación con ninguno de los contaminantes evaluados. Resultados similares han sido reportados en un estudio realizado en Praga, Republica Checa en donde el efecto de la exposición al humo del tabaco sobre los niveles de marcadores de lipoperoxidación fue evaluado. No se encontraron asociaciones entre los niveles de 15-F2t-isoprostano en plasma de cordón umbilical y la exposición al agente tóxico [Rossner et al., 2009]. En otro estudio gestacional realizado también en la Republica Checa, se encontraron asociaciones significativas entre la exposición a PM<sub>2.5</sub> y los niveles de 15-F2t-isoprostano y 8-hidroxi guanina en poblaciones de dos ciudades con diferentes grados de contaminación atmosférica. Los marcadores de estrés oxidante evaluados fueron más altos en la época invernal en la ciudad con mayor grado de contaminación [Ambroz et al., 2016].

#### ***7.5 Efecto de las variantes alélicas de riesgo y los niveles de aductos en el DNA***

Cuando analizamos la interacción de varios polimorfismos de riesgo sobre los niveles de aductos en el DNA y los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, únicamente el polimorfismo NQO1\*2

estuvo asociado con cambios en los niveles de aductos en el DNA materno (Tabla V). Esta variante alélica implica una sustitución de C a T que resulta en el cambio de aminoácido de prolina a serina. Esta sustitución afecta la actividad enzimática de la proteína, lo cual puede llevar a la reducción en los niveles de aductos en los portadores de los alelos mutantes. En estudios poblacionales, personas no fumadoras portadoras del genotipo heterocigoto del polimorfismo de *NQO1*\*2 tuvieron menos riesgo a desarrollar cáncer de pulmón [Bock et al., 2005]. Es importante destacar que solo encontramos diferencias entre el genotipo Pro/Pro y Pro/Ser, pero no con el genotipo Ser/Ser. Este resultado puede deberse al tamaño muestral de nuestra población.

En el caso de los análisis de regresión múltiple (Tabla VI), encontramos asociaciones importantes con el polimorfismo *CYP1B1*\*3 en condición fetal y los niveles de aductos en sangre de cordón umbilical. Estos resultados sugieren que los tejidos fetales podrían tener la capacidad de metabolizar los PAHs que atraviesan la placenta. Del mismo modo, los resultados muestran que la presencia de al menos un alelo mutante en el genoma materno disminuye significativamente los niveles de aductos fetales. Probablemente, la alta actividad metabólica materna conferida por la presencia del polimorfismo permite una eliminación más rápida de los PAHs, lo cual se ve reflejado en menores niveles de daño fetal. El polimorfismo *CYP1B1*\*3 ha sido asociado con un incremento significativo en el riesgo a desarrollar cáncer pulmonar en personas con antecedentes tabáquicos y en personas no fumadoras [Wenzlaff et al., 2005]. Además, la presencia del polimorfismo *CYP1B1*\*3 en combinación con otras variantes alélicas de enzimas de fase II, incrementan los niveles de aductos en muestras de tumores de cáncer de próstata [Nock et al., 2007]. Finalmente, en población mexicana se ha reportado la participación de este polimorfismo en el incremento de los niveles de aductos en el DNA en relación con los niveles de PM ambientales [Garcia-Suastegui et al., 2011].

Se ha reportado la inducción de citocromos en el tejido placentario, específicamente la inducción a nivel de mensajero del CYP1A1 en eventos de exposición gestacional al humo del tabaco [Suter et al., 2010]. Además, en otros tejidos fetales se ha reportado la expresión del CYP1A1 y del CYP1B1, como el pulmón, el hígado, las glándulas adrenales y el cerebro [Hakkola et al., 1997]. La expresión de esas enzimas involucradas en el metabolismo de PAHs en los tejidos fetales sugieren la participación del feto en la generación de aductos en el DNA.

## 7.6 Limitaciones del estudio

Los resultados presentados en este trabajo están limitados principalmente por el tamaño de la muestra. Probablemente un tamaño muestral mayor pudiera permitir establecer asociaciones entre parámetros de salud perinatal como el peso y la talla del recién nacido con los factores de exposición ambiental considerados aquí. Con el tamaño de muestra de este estudio no pudimos establecer asociaciones entre los niveles de aductos en el DNA y los otros polimorfismos de riesgo analizados como *GSTM1\*0*, *MGMT L84F* y *NQO1\*2*. En esta investigación no consideramos la presencia de los PAHs en la fase gaseosa o la exposición a partículas en interiores. Aunque, en los cuestionarios de exposición y estilo de vida se consideraron variables como la exposición al humo del tabaco, tipo de combustible para cocinar en el domicilio o la exposición ocupacional a PAHs.

El modelo de exposición a partículas que utilizamos en este estudio tiene cierto margen de error, si bien se realizaron los cálculos de concentraciones de partículas con las estaciones de monitoreo más cercanas al domicilio de las voluntarias, estas cuantificaciones podrían ser más exactas al utilizar monitores personales o combinar los datos de concentración de PM con imágenes satelitales o monitores *in situ*. Asimismo, no podemos descartar el efecto de otras variables que no fueron consideradas como la cercanía a avenidas muy transitadas, estatus socioeconómico, entorno extramuros, etc. Las voluntarias en este estudio fueron mujeres no fumadoras con exposición reducida a factores adicionales como a los PAHs. Por ejemplo, no encontramos diferencias notorias en el consumo de PAHs en la dieta entre las estaciones del año, no encontramos asociación con la ocupación materna y los niveles de aductos o MN en madres o recién nacidos. Tampoco encontramos diferencias en los biomarcadores de daño en relación con el sexo del recién nacido.

## 8. Conclusiones

- Los leucocitos de cordón umbilical son más susceptibles a los PAHs presentes en el PM debido a que tuvieron mayores niveles de aductos comparados con los leucocitos de sus respectivas madres.
- Las correlaciones fueron más fuertes entre los aductos en cordón umbilical y las concentraciones de PM comparadas con las encontradas en las muestras de sangre materna, lo cual refuerza la idea de la susceptibilidad fetal.
- La época del año (por lo tanto, la concentración de PM) afecta los niveles de los biomarcadores de daño al DNA (aductos y MN) tanto en madres y recién nacidos.
- El PM<sub>2,5</sub> afecta en mayor medida los biomarcadores de daño genotóxico (aductos y MN) maternos y fetales comparado con PM<sub>10</sub>.
- Los componentes del PM como los PAHs pueden atravesar la placenta y afectar a los tejidos fetales, ya que los marcadores de daño en el DNA (aductos y MN) en sangre de cordón umbilical estuvieron fuertemente asociados con los niveles de daño detectados en sangre materna.
- El O<sub>3</sub> podría no ser un contaminante que afecte de manera importante a los recién nacidos, las concentraciones de O<sub>3</sub> en la ZMCM solamente se encontraron asociadas a los niveles de *8-iso-PGF<sub>2α</sub>* en las muestras de plasma materno.
- Los tejidos fetales parecen participar en el metabolismo de xenobióticos, debido a que presencia de la menos un alelo mutante del polimorfismo *CYP1B1\*3* en condición fetal incrementa los niveles de aductos.
- El metabolismo materno podría afectar los niveles de daño en el feto, ya que la presencia de un alelo mutante del *CYP1B1\*3* en condición materna disminuye los niveles de aductos en cordón umbilical.
- La edad materna no afecta los niveles de MN en linfocitos de cordón umbilical, solamente la contaminación atmosférica se asoció con los niveles de este marcador.

## ***9. Perspectivas***

Los resultados de este trabajo muestran la exposición gestacional a partículas atmosféricas que ocurre en al menos dos sitios de la ZMCM con altos niveles de contaminantes. Desde el punto de vista regulatorio, es importante continuar tomando medidas que lleven a la reducción de la contaminación atmosférica para proteger la salud de las futuras generaciones. Desde el punto de vista de la investigación, sería interesante explorar el efecto a nivel epigenético de la exposición gestacional a PAHs en los recién nacidos. Las alteraciones a nivel epigenético podrían implicar efectos a largo plazo, incrementando el riesgo a desarrollar enfermedades durante la edad adulta y por generaciones. Además, es de gran importancia poder analizar otros marcadores de daño asociados a la exposición a PAHs como alteraciones mitocondriales o cambios en la expresión de enzimas del metabolismo de xenobióticos.

Se podría realizar la caracterización de los PAHs que están generando los aductos, esto acoplando la metodología de <sup>32</sup>P-postlabeling usada para la detección aductos con HPLC para identificar cuáles son los tipos de aductos que se están generando y en qué proporciones. Además, sería importante realizar la identificación y cuantificación de los PAHs presentes en sangre periférica materna y sangre de cordón umbilical mediante HPLC o espectrometría de masas.

Sería muy importante poder realizar un seguimiento longitudinal de los niños que tienen altos niveles de daño y analizar si esos niveles al momento del nacimiento se asocian con otros problemas durante la niñez, como el desarrollo de enfermedades como el asma y enfermedades que aparezcan en la edad adulta.

El incremento en los niveles de daño al DNA se asocia con un aumento en el riesgo a desarrollar diferentes tipos de cáncer. Por tal motivo, explorar la asociación entre los niveles de daño genotóxico y el desarrollo de cáncer en edades tempranas constituye un argumento de peso para proponer estrategias de prevención.

Este tipo de estudios podrían también realizarse en otras ciudades altamente contaminadas de México para conocer las diferencias entre distintos sitios urbanos del país y así poder

implementar medidas adecuadas de mitigación de los altos niveles de contaminación de cada región.

La posibilidad de tener una población testigo con bajos niveles de exposición sería de mucha utilidad ya que reforzaría los hallazgos mostrados en el presente trabajo y además nos mostraría los efectos beneficios de disminuir los niveles de contaminantes en la ZMCM.

Un tamaño de muestra mayor podría ayudar a fortalecer asociaciones que en este trabajo no pudieron ser tan evidentes, como fue el caso de las variantes alélicas. También se podría realizar un estudio incluyendo más variantes alélicas de riesgo para intentar representar el trasfondo genético de la población de estudio. Además, es necesario realizar un estudio con una población que incluya nacimientos pretérmino para llevar a cabo un estudio de casos y controles y así analizar las posibles variables que incrementan la probabilidad de nacimientos prematuros.



## 10. Referencias

Abdel-Rahman, S.Z., El-Zein, R.A., Anwar, W.A., and Au, W.W. 1996. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters* 107: 229-233.

Alexandrov, L.B., Ju, Y.S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., *et al.* 2016. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 354: 618-622.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Campbell, P.J., and Stratton, M.R. 2013. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Rep* 3: 246-259.

Alfaro-Moreno, E., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Bonner, J.C., Murray, J.C., Rosas, I., Rosales, S.P., and Osornio-Vargas, A.R. 2002. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect* 110: 715-720.

Amador-Munoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Miranda, J., and Vera-Avila, L.E. 2011. Organic compounds of PM2.5 in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Sci Total Environ* 409: 1453-1465.

Ambroz, A., Vlkova, V., Rossner, P., Jr., Rossnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Veleminsky, M., Jr., Solansky, I., *et al.* 2016. Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. *Int J Hyg Environ Health* 219: 545-556.

Arenas-Huertero, F., Apátiga-Vega, E., Miguel-Pérez, G., Villeda-Cuevas, D., and Trillo-Tinoco, J. 2011. Molecular Markers Associated with the Biological Response to Aromatic Hydrocarbons from Urban Air in Humans. In *Air Pollution - New Developments*, A.M. Moldoveanu, ed. Rijeka: InTech, p. Ch. 04.

Aztatzi-Aguilar, O., Valdés-Arzate, A., Debray-García, Y., Calderón-Aranda, E., Uribe-Ramirez, M., Acosta-Saavedra, L., Gonsebatt, M., Maciel-Ruiz, J., Petrosyan, P., Mugica-Alvarez, V., *et al.* 2018. Exposure to ambient particulate matter induces oxidative stress in lung and aorta in a size- and time-dependent manner in rats. 2: 2397847318794859.

Baird, W.M., Hooven, L.A., and Mahadevan, B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45: 106-114.

Banks, L.D., Harris, K.L., Mantey, J.A., Hood, D.B., Archibong, A.E., and Ramesh, A. 2014. Chapter 26 - Polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Biomarkers in Toxicology*, R.C. Gupta, ed. Boston: Academic Press, pp. 451-458.

Barker, D.J. 2004. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 93: 26-33.

Barker, D.J. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261: 412-417.

Bastani, N.E., Gundersen, T.E., and Blomhoff, R. 2009. Determination of 8-epi PGF(2alpha) concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23: 2885-2890.

Beedanagari, S., Vulimiri, S.V., Bhatia, S., and Mahadevan, B. 2014. Chapter 43 - Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. In *Biomarkers in Toxicology*, R.C. Gupta, ed. Boston: Academic Press, pp. 729-742.

Bell, M.L., Belanger, K., Ebisu, K., Gent, J.F., Lee, H.J., Koutrakis, P., and Leaderer, B.P. 2010. Prenatal exposure to fine particulate matter and birth weight: variations by particulate constituents and sources. *Epidemiology* 21: 884-891.

Bobustuc, G.C., Smith, J.S., Maddipatla, S., Jeudy, S., Limaye, A., Isley, B., Caparas, M.L., Constantino, S.M., Shah, N., Baker, C.H., *et al.* 2012. MGMT inhibition restores ERalpha functional sensitivity to antiestrogen therapy. *Mol Med* 18: 913-929.

Bock, C.H., Wenzlaff, A.S., Cote, M.L., Land, S.J., and Schwartz, A.G. 2005. NQO1 T allele associated with decreased risk of later age at diagnosis lung cancer among never smokers: results from a population-based study. *Carcinogenesis* 26: 381-386.

Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., *et al.* 2001. HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 37: 31-45.

Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Stromberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., *et al.* 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* 29: 1178-1183.

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., *et al.* 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28: 625-631.

Brain, J.D., W. G. Kreyling, and Godleski, J.J. 2014. Inhalation Toxicology. In *Hayes' Principles and Methods of Toxicology*, C.L.K. A. W. Hayes, ed. Philadelphia, USA: Taylor and Francis, pp. 1385-1444.

Brauer, M., Lencar, C., Tamburic, L., Koehoorn, M., Demers, P., and Karr, C. 2008. A cohort study of traffic-related air pollution impacts on birth outcomes. *Environ Health Perspect* 116: 680-686.

Brown, J.R., and Thornton, J.L. 1957. Percivall Pott (1714-1788) and chimney sweepers' cancer of the scrotum. *Br J Ind Med* 14: 68-70.

Brunekreef, B., and Holgate, S.T. 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360: 1233-1242.

Calderon-Garciduenas, L., Mora-Tiscareno, A., Fordham, L.A., Valencia-Salazar, G., Chung, C.J., Rodriguez-Alcaraz, A., Paredes, R., Variakojis, D., Villarreal-Calderon, A., Flores-Camacho, L., *et al.* 2003. Respiratory damage in children exposed to urban pollution. *Pediatr Pulmonol* 36: 148-161.

Calderon-Garciduenas, L., Rodriguez-Alcaraz, A., Valencia-Salazar, G., Mora-Tiscareno, A., Garcia, R., Osnaya, N., Villarreal-Calderon, A., Devlin, R.B., and Van Dyke, T. 2001. Nasal biopsies of children exposed to air pollutants. *Toxicol Pathol* 29: 558-564.

Castano-Vinyals, G., D'Errico, A., Malats, N., and Kogevinas, M. 2004. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med* 61: e12.

Chafer-Pericas, C., Rahkonen, L., Sanchez-Illana, A., Kuligowski, J., Torres-Cuevas, I., Cernada, M., Cubells, E., Nunez-Ramiro, A., Andersson, S., Vento, M., *et al.* 2015. Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry determination of lipid peroxidation biomarkers in newborn serum samples. *Anal Chim Acta* 886: 214-220.

Chen, C., Arjomandi, M., Balmes, J., Tager, I., and Holland, N. 2007. Effects of chronic and acute ozone exposure on lipid peroxidation and antioxidant capacity in healthy young adults. *Environ Health Perspect* 115: 1732-1737.

Choi, H., Rauh, V., Garfinkel, R., Tu, Y., and Perera, F.P. 2008. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect* 116: 658-665.

Churg, A., Brauer, M., del Carmen Avila-Casado, M., Fortoul, T.I., and Wright, J.L. 2003. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* 111: 714-718.

Costa, L.G., Cole, T.B., Coburn, J., Chang, Y.C., Dao, K., and Roque, P.J. 2017. Neurotoxicity of traffic-related air pollution. *Neurotoxicology* 59: 133-139.

Cracowski, J.L., Durand, T., and Bessard, G. 2002. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 23: 360-366.

De Vizcaya-Ruiz, A., Gutiérrez-Castillo, M.E., Uribe-Ramirez, M., Cebrián, M.E., Mugica-Alvarez, V., Sepúlveda, J., Rosas, I., Salinas, E., Garcia-Cuéllar, C., Martínez, F., *et al.* 2006. Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. *Atmospheric Environment* 40, *Supplement 2*: 583-592.

Dejmek, J., Solansky, I., Benes, I., Lenicek, J., and Sram, R.J. 2000. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect* 108: 1159-1164.

Denissenko, M.F., Pao, A., Pfeifer, G.P., and Tang, M. 1998. Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers. *Oncogene* 16: 1241-1247.

Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G.P. 1996. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274: 430-432.

Dockery, D.W., and Pope, C.A., 3rd. 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 15: 107-132.

Dockery, D.W., Pope, C.A., 3rd, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Jr., and Speizer, F.E. 1993. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329: 1753-1759.

Dooley, E.E. 2002. Fifty years later: clearing the air over the London smog. *Environ Health Perspect* 110: A748.

Duan, H., He, Z., Ma, J., Zhang, B., Sheng, Z., Bin, P., Cheng, J., Niu, Y., Dong, H., Lin, H., *et al.* 2013. Global and MGMT promoter hypomethylation independently associated with genomic instability of lymphocytes in subjects exposed to high-dose polycyclic aromatic hydrocarbon. *Arch Toxicol* 87: 2013-2022.

Dupuy, A., Le Faouder, P., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.M., Dray, C., Lee, J.C., Valet, P., Gladine, C., Durand, T., *et al.* 2016. Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Anal Chim Acta* 921: 46-58.

Dybing, E., Schwarze, P.E., Nafstad, P., Victorin, K., and Penning, T.M. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air and cancer. In *Air pollution and cancer*, K. Straif, A. Cohen, and J.M. Samet, eds. Lyon, France: IARC, pp. 75-94.

Eastmond, D.A., and Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen* 13: 34-43.

Ebisu, K., Berman, J.D., and Bell, M.L. 2016. Exposure to coarse particulate matter during gestation and birth weight in the U.S. *Environ Int* 94: 519-524.

Eguchi-Ishimae, M., Eguchi, M., Ishii, E., Knight, D., Sadakane, Y., Isoyama, K., Yabe, H., Mizutani, S., and Greaves, M. 2005. The association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 90: 1511-1515.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534: 65-75.

Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., and Bonassi, S. 2011. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis* 26: 239-245.

Fenech, M., and Morley, A.A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29-36.

Garcia-Suastegui, W.A., Huerta-Chagoya, A., Carrasco-Colin, K.L., Pratt, M.M., John, K., Petrosyan, P., Rubio, J., Poirier, M.C., and Gonsebatt, M.E. 2011. Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City. *Mutagenesis* 26: 385-391.

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., and Gehr, P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 113: 1555-1560.

Georgiadis, P., Demopoulos, N.A., Topinka, J., Stephanou, G., Stoikidou, M., Bekyrou, M., Katsouyianni, K., Sram, R., Autrup, H., and Kyrtopoulos, S.A. 2004. Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. *Toxicol Lett* 149: 269-280.

Ginsberg, G.L., and Atherholt, T.B. 1989. Transport of DNA-adducting metabolites in mouse serum following benzo[a]pyrene administration. *Carcinogenesis* 10: 673-679.

Ginsberg, G.L., and Atherholt, T.B. 1990. DNA adduct formation in mouse tissues in relation to serum levels of benzo(a)pyrene-diol-epoxide after injection of benzo(a)pyrene or the diol-epoxide. *Cancer Res* 50: 1189-1194.

Godschalk, R.W., Van Schooten, F.J., and Bartsch, H. 2003. A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. *J Biochem Mol Biol* 36: 1-11.

Gouws, C., and Pretorius, P.J. 2011. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): can function explain a suicidal mechanism? *Med Hypotheses* 77: 857-860.

Grin, I., and Ishchenko, A.A. 2016. An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 44: 3713-3727.

Gutierrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrian-Garcia, M.E., De Vizcaya-Ruiz, A., Sordo-Cedeno, M., and Ostrosky-Wegman, P. 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 47: 199-211.

Ha, S., Hu, H., Roussos-Ross, D., Haidong, K., Roth, J., and Xu, X. 2014. The effects of air pollution on adverse birth outcomes. *Environ Res* 134: 198-204.

Hakkola, J., Pasanen, M., Hukkanen, J., Pelkonen, O., Maenpaa, J., Edwards, R.J., Boobis, A.R., and Raunio, H. 1996. Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem Pharmacol* 51: 403-411.

Hakkola, J., Pasanen, M., Pelkonen, O., Hukkanen, J., Evisalmi, S., Anttila, S., Rane, A., Mantyla, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., *et al.* 1997. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18: 391-397.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn Oxford ; New York: Oxford University Press.

Harris, C.C. 1996. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3: 435-439.

Harris, M.H., Gold, D.R., Rifas-Shiman, S.L., Melly, S.J., Zanobetti, A., Coull, B.A., Schwartz, J.D., Gryparis, A., Kloog, I., Koutrakis, P., *et al.* 2016. Prenatal and childhood traffic-related air pollution exposure and childhood executive function and behavior. *Neurotoxicol Teratol* 57: 60-70.

Henkler, F., Stolpmann, K., and Luch, A. 2012. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *Exp Suppl 101*: 107-131.

Herbstman, J.B., Tang, D., Zhu, D., Qu, L., Sjodin, A., Li, Z., Camann, D., and Perera, F.P. 2012. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood. *Environ Health Perspect 120*: 733-738.

Herbstman, J.B., Wang, S., Perera, F.P., Lederman, S.A., Vishnevetsky, J., Rundle, A.G., Hoepner, L.A., Qu, L., and Tang, D. 2013. Predictors and consequences of global DNA methylation in cord blood and at three years. *PLoS One 8*: e72824.

Heusinkveld, H.J., Wahle, T., Campbell, A., Westerink, R.H., Tran, L., Johnston, H., Stone, V., Cassee, F.R., and Schins, R.P. 2016. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology 56*: 94-106.

Hill, C.E., Wickliffe, J.K., Guerin, A.T., Kinslow, C.J., Wolfe, K.J., Ammenheuser, M.M., and Abdel-Rahman, S.Z. 2007. The L84F polymorphism in the O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT) gene is associated with increased hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mutant frequency in lymphocytes of tobacco smokers. *Pharmacogenet Genomics 17*: 743-753.

Hu, W., Feng, Z., and Tang, M.S. 2003. Preferential carcinogen-DNA adduct formation at codons 12 and 14 in the human K-ras gene and their possible mechanisms. *Biochemistry 42*: 10012-10023.

IARC. 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, Vol 82: IARC.

IARC. 2013. Air pollution and cancer, Vol 161 Lyon, France: IARC, WHO.

IARC. 2015. Outdoor air pollution, Vol Volume 109 Lyon, France: IARC, WHO.

IARC. 2010. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks in humans. Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures., Vol 92 Lyon, France.: IARC.

Iyer, S., Wang, Y., Xiong, W., Tang, D., Jedrychowski, W., Chanock, S., Wang, S., Stigter, L., Mroz, E., and Perera, F. 2016. Significant interactions between maternal PAH exposure and single nucleotide polymorphisms in candidate genes on B[a]P-DNA adducts in a cohort of non-smoking Polish mothers and newborns. *Carcinogenesis*.

Janssen, B.G., Gyselaers, W., Byun, H.M., Roels, H.A., Cuypers, A., Baccarelli, A.A., and Nawrot, T.S. 2017. Placental mitochondrial DNA and CYP1A1 gene methylation as

molecular signatures for tobacco smoke exposure in pregnant women and the relevance for birth weight. *J Transl Med* 15: 5.

Jedrychowski, W., Perera, F., Mrozek-Budzyn, D., Mroz, E., Flak, E., Spengler, J.D., Edwards, S., Jacek, R., Kaim, I., and Skolicki, Z. 2009. Gender differences in fetal growth of newborns exposed prenatally to airborne fine particulate matter. *Environ Res* 109: 447-456.

Jedrychowski, W.A., Perera, F.P., Tang, D., Rauh, V., Majewska, R., Mroz, E., Flak, E., Stigter, L., Spengler, J., Camann, D., *et al.* 2013. The relationship between prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA adducts in cord blood. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 23: 371-377.

Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. 2011. Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci* 120: 1-13.

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., and Roos, W.P. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 6: 1079-1099.

Karttunen, V., Myllynen, P., Prochazka, G., Pelkonen, O., Segerback, D., and Vahakangas, K. 2010. Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. *Toxicol Lett* 197: 75-81.

Kelly, F.J., and Fussell, J.C. 2012. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment* 60: 504-526.

Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., and Brown, R.J. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int* 60: 71-80.

Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., and Decordier, I. 2011. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 85: 873-899.

Landrigan, P.J., Fuller, R., Acosta, N.J.R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N.N., Balde, A.B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J.I., *et al.* 2018. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 391: 462-512.

Landrigan, P.J., Fuller, R., Fisher, S., Suk, W.A., Sly, P., Chiles, T.C., and Bose-O'Reilly, S. 2019. Pollution and children's health. *Sci Total Environ* 650: 2389-2394.



Larose, J., Julien, P., and Bilodeau, J.F. 2013. Analysis of F2-isoprostanes in plasma of pregnant women by HPLC-MS/MS using a column packed with core-shell particles. *J Lipid Res* 54: 1505-1511.

Lee, J., Kalia, V., Perera, F., Herbstman, J., Li, T., Nie, J., Qu, L.R., Yu, J., and Tang, D. 2017. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, LINE1 methylation and child development in a Chinese cohort. *Environ Int* 99: 315-320.

Levario-Carrillo, M., Sordo, M., Rocha, F., Gonzalez-Horta, C., Amato, D., and Ostrosky-Wegman, P. 2005. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. *Mutat Res* 586: 68-75.

Logan, W.P. 1953. Mortality in the London fog incident, 1952. *Lancet* 1: 336-338.

Loomis, D., Castillejos, M., Gold, D.R., McDonnell, W., and Borja-Aburto, V.H. 1999. Air pollution and infant mortality in Mexico City. *Epidemiology* 10: 118-123.

Luch, A. 2005. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 113-125.

Luch, A. 2006. The mode of action of organic carcinogens on cellular structures. *EXS*: 65-95.

Maciel-Ruiz, J.A. (2013). Cuantificación de los niveles de aductos en el DNA de tejido pulmonar de ratas Spague-Dawley expuestas a partículas atmosféricas de la Ciudad de Mexico. In Facultad de Ciencias (Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México), pp. 74.

Manzano-Leon, N., Quintana, R., Sanchez, B., Serrano, J., Vega, E., Vazquez-Lopez, I., Rojas-Bracho, L., Lopez-Villegas, T., O'Neill, M.S., Vadillo-Ortega, F., *et al.* 2013. Variation in the composition and in vitro proinflammatory effect of urban particulate matter from different sites. *J Biochem Mol Toxicol* 27: 87-97.

McClellan, M.D., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., Varkonyi, A., Ngo, L., Eisen, E.A., and Herrick, R.F. 2007. DNA adducts among asphalt paving workers. *Ann Occup Hyg* 51: 27-34.

Milosevic-Djordjevic, O., Grujicic, D., Arsenijevic, S., and Marinkovic, D. 2005. Monitoring of lymphocyte micronuclei among newborns from Kragujevac in Central Serbia before and after environmental contamination. *Tohoku J Exp Med* 205: 1-9.

Molina, E., Perez-Morales, R., Rubio, J., Petrosyan, P., Cadena, L.H., Arlt, V.M., Phillips, D.H., and Gonshebbatt, M.E. 2013. The GSTM1null (deletion) and MGMT84 rs12917

(Phe/Phe) haplotype are associated with bulky DNA adduct levels in human leukocytes. *Mutat Res* 758: 62-68.

Moorthy, B., Chu, C., and Carlin, D.J. 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci* 145: 5-15.

Morales-Rubio, R.A., Alvarado-Cruz, I., Manzano-Leon, N., Andrade-Oliva, M.D., Uribe-Ramirez, M., Quintanilla-Vega, B., Osornio-Vargas, A., and De Vizcaya-Ruiz, A. 2019. In utero exposure to ultrafine particles promotes placental stress-induced programming of renin-angiotensin system-related elements in the offspring results in altered blood pressure in adult mice. *Part Fibre Toxicol* 16: 7.

Morales-Suarez-Varela, M., Peraita-Costa, I., and Llopis-Gonzalez, A. 2017. Systematic review of the association between particulate matter exposure and autism spectrum disorders. *Environ Res* 153: 150-160.

Mugica, V., Hernandez, S., Torres, M., and Garcia, R. 2010. Seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure levels in Mexico City. *J Air Waste Manag Assoc* 60: 548-555.

Mugica, V., Mugica, F., Torres, M., and Figueroa, J. 2008. PM<sub>2.5</sub> Emission Elemental Composition from Diverse Combustion Sources in the Metropolitan Area of Mexico City. *The Scientific World Journal* 8: 275-286.

Mugica, V., Ortiz, E., Molina, L., Vizcaya-Ruiz, A.D., Nebot, A., Quintana, R., Aguilar, J., and Alcántara, E. 2009. PM composition and source reconciliation in Mexico City. *Atmospheric Environment* 43: 5068-5074

Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* 14: 801-814.

Myllynen, P., Pasanen, M., and Pelkonen, O. 2005. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 26: 361-371.

Myren, M., Mose, T., Mathiesen, L., and Knudsen, L.E. 2007. The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro* 21: 1332-1340.

Nel, A.E., Diaz-Sanchez, D., and Li, N. 2001. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* 7: 20-26.

Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., and Nemery, B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105: 411-414.

Neubert, D., and Tapken, S. 1988. Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. *Arch Toxicol* 62: 236-239.

Nock, N.L., Tang, D., Rundle, A., Neslund-Dudas, C., Savera, A.T., Bock, C.H., Monaghan, K.G., Koprowski, A., Mitrache, N., Yang, J.J., *et al.* 2007. Associations between smoking, polymorphisms in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolism and conjugation genes and PAH-DNA adducts in prostate tumors differ by race. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1236-1245.

NOM (2014). NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación., S.d. Gobernación, ed. (Mexico: Diario Oficial de la Federación).

Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16: 437-445.

Padula, A.M., Noth, E.M., Hammond, S.K., Lurmann, F.W., Yang, W., Tager, I.B., and Shaw, G.M. 2014. Exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy and risk of preterm birth. *Environ Res* 135: 221-226.

Paleologo, M., van Schooten, F.J., Pavanello, S., Kriek, E., Zordan, M., Clonfero, E., Bezze, C., and Levis, A.G. 1992. Detection of benzo[a]pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in white blood cells of psoriatic patients treated with coal tar. *Mutat Res* 281: 11-16.

Pavanello, S., Bollati, V., Pesatori, A.C., Kapka, L., Bolognesi, C., Bertazzi, P.A., and Baccarelli, A. 2009. Global and gene-specific promoter methylation changes are related to anti-B[a]PDE-DNA adduct levels and influence micronuclei levels in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed individuals. *Int J Cancer* 125: 1692-1697.

Pavanello, S., Kapka, L., Siwinska, E., Mielzynska, D., Bolognesi, C., and Clonfero, E. 2008. Micronuclei related to anti-B[a]PDE-DNA adduct in peripheral blood lymphocytes of heavily polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed nonsmoking coke-oven workers and controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2795-2799.

Pavanello, S., and Lotti, M. 2012. Biological monitoring of carcinogens: current status and perspectives. *Arch Toxicol* 86: 535-541.

Pavanello, S., and Lotti, M. 2014. Chapter 47 - Biomonitoring exposures to carcinogens. In *Biomarkers in Toxicology*, R.C. Gupta, ed. Boston: Academic Press, pp. 785-798.

Pavanello, S., Pesatori, A.C., Dioni, L., Hoxha, M., Bollati, V., Siwinska, E., Mielzynska, D., Bolognesi, C., Bertazzi, P.A., and Baccarelli, A. 2010. Shorter telomere length in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 31: 216-221.

Peace, B.E., and Succop, P. 1999. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutat Res* 425: 225-230.

Pedersen, M., Halldorsson, T.I., Autrup, H., Brouwer, A., Besselink, H., Loft, S., and Knudsen, L.E. 2012. Maternal diet and dioxin-like activity, bulky DNA adducts and micronuclei in mother-newborns. *Mutat Res* 734: 12-19.

Pedersen, M., Mendez, M.A., Schoket, B., Godschalk, R.W., Espinosa, A., Landstrom, A., Villanueva, C.M., Merlo, D.F., Fthenou, E., Gracia-Lavedan, E., *et al.* 2015. Environmental, dietary, maternal, and fetal predictors of bulky DNA adducts in cord blood: a European mother-child study (NewGeneris). *Environ Health Perspect* 123: 374-380.

Pedersen, M., Vinzents, P., Petersen, J.H., Kleinjans, J.C., Plas, G., Kirsch-Volders, M., Dostal, M., Rossner, P., Beskid, O., Sram, R.J., *et al.* 2006. Cytogenetic effects in children and mothers exposed to air pollution assessed by the frequency of micronuclei and fluorescence in situ hybridization (FISH): a family pilot study in the Czech Republic. *Mutat Res* 608: 112-120.

Pedersen, M., Wichmann, J., Autrup, H., Dang, D.A., Decordier, I., Hvidberg, M., Bossi, R., Jakobsen, J., Loft, S., and Knudsen, L.E. 2009. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res* 109: 1012-1020.

Perera, F., and Edwards, S. 2011. Prenatal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). In, pp. 659-668.

Perera, F., and Herbstman, J. 2011. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol* 31: 363-373.

Perera, F., Phillips, D.H., Wang, Y., Roen, E., Herbstman, J., Rauh, V., Wang, S., and Tang, D. 2015. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons/aromatics, BDNF and child development. *Environ Res* 142: 602-608.

Perera, F., Tang, W.Y., Herbstman, J., Tang, D., Levin, L., Miller, R., and Ho, S.M. 2009a. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One* 4: e4488.

Perera, F., Weiland, K., Neidell, M., and Wang, S. 2014. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and IQ: estimated benefit of pollution reduction. *J Public Health Policy* 35: 327-336.

Perera, F.P., Li, Z., Whyatt, R., Hoepner, L., Wang, S., Camann, D., and Rauh, V. 2009b. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics* 124: e195-202.

Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tsai, W.Y., Tang, D., Diaz, D., Hoepner, L., Barr, D., Tu, Y.H., Camann, D., *et al.* 2006. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ Health Perspect* 114: 1287-1292.

Perera, F.P., Tang, D., Rauh, V., Lester, K., Tsai, W.Y., Tu, Y.H., Weiss, L., Hoepner, L., King, J., Del Priore, G., *et al.* 2005a. Relationships among polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, proximity to the World Trade Center, and effects on fetal growth. *Environ Health Perspect* 113: 1062-1067.

Perera, F.P., Tang, D., Whyatt, R., Lederman, S.A., and Jedrychowski, W. 2005b. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 709-714.

Perera, F.P., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Cole, K.J., Tang, D., Rauh, V., and Phillips, D.H. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons-aromatic DNA adducts in cord blood and behavior scores in New York city children. *Environ Health Perspect* 119: 1176-1181.

Peterson, B.S., Rauh, V.A., Bansal, R., Hao, X., Toth, Z., Nati, G., Walsh, K., Miller, R.L., Arias, F., Semanek, D., *et al.* 2015. Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *JAMA Psychiatry* 72: 531-540.

Phalen, R.F., and Phalen, R.N. 2013. Introduction to air pollution science : a public health perspective Burlington, Mass.: Jones & Bartlett Learning.

Phillips, D.H. 2005. The Formation of DNA Adducts. In *The Cancer Handbook*: John Wiley & Sons, Ltd.

Phillips, D.H., and Arlt, V.M. 2007. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts. *Nat Protoc* 2: 2772-2781.

Poirier, M.C. 1997. DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4: 907-912.

Poirier, M.C. 2004. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer* 4: 630-637.

Pope, C.A., 3rd, Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G.D. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287: 1132-1141.

Ramesh, A., Archibong, A.E., Hood, D.B., Guo, Z., and Loganathan, B.G. 2012. Global Environmental Distribution and Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Global Contamination Trends of Persistent Organic Chemicals*, B.G.a.K.-S. Loganathan, P, ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group.

Randerath, K., Liehr, J.G., Gladek, A., and Randerath, E. 1989. Use of the 32P-postlabelling assay to study transplacental carcinogens and transplacental carcinogenesis. *IARC Sci Publ*: 189-205.

Ristovski, Z.D., Miljevic, B., Surawski, N.C., Morawska, L., Fong, K.M., Goh, F., and Yang, I.A. 2012. Respiratory health effects of diesel particulate matter. *Respirology* 17: 201-212.

Rojas-Martinez, R., Perez-Padilla, R., Olaiz-Fernandez, G., Mendoza-Alvarado, L., Moreno-Macias, H., Fortoul, T., McDonnell, W., Loomis, D., and Romieu, I. 2007. Lung function growth in children with long-term exposure to air pollutants in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 377-384.

Rossner, P., Jr., Milcova, A., Libalova, H., Novakova, Z., Topinka, J., Balascak, I., and Sram, R.J. 2009. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part II. Oxidative damage. *Mutat Res* 669: 20-26.

Roubicek, D.A., Gutierrez-Castillo, M.E., Sordo, M., Cebrian-Garcia, M.E., and Ostrosky-Wegman, P. 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res* 631: 9-15.

Sadikovic, B., and Rodenhiser, D.I. 2006. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 458-468.

Sadikovic, B., and Rodenhiser, D.I. 2012. Epigenetic Mediation of Environmental Exposures to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Toxicology and Epigenetics*: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 111-127.

Salcido-Neyoy, M.E., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsebatt, M.E., Melendez-Zajgla, J., Morales-Barcenas, R., Petrosyan, P., Molina-Servin, E.D., Vega, E., Manzano-Leon, N., *et al.* 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM10) of

Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Pollut* 203: 175-182.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis., T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. In New York, USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press., pp. E3–E4.

Sanchez-Perez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, A.R., Herrera, L.A., Morales-Barcenas, R., Lopez-Saavedra, A., Gonzalez-Ramirez, I., Miranda, J., and Garcia-Cuellar, C.M. 2014. Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM(10)) exposure in lung cells. *Toxicol Lett* 225: 12-19.

Sanchez-Perez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, A.R., Morales-Barcenas, R., Gutierrez-Ruiz, C., Vazquez-Lopez, I., and Garcia-Cuellar, C.M. 2009. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett* 278: 192-200.

Sayer, J.M., Chadha, A., Agarwal, S.K., Yeh, H.J.C., Yagi, H., and Jerina, D.M. 1991. Covalent nucleoside adducts of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxides: structural reinvestigation and characterization of a novel adenosine adduct on the ribose moiety. *The Journal of Organic Chemistry* 56: 20-29.

Schaumann, F., Borm, P.J., Herbrich, A., Knoch, J., Pitz, M., Schins, R.P., Luettig, B., Hohlfeld, J.M., Heinrich, J., and Krug, N. 2004. Metal-rich ambient particles (particulate matter 2.5) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 898-903.

SEDEMA. 2008. Secretaría de Medio Ambiente. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM. México, Ciudad de México.: 149.

SEDEMA. 2010. Secretaría de Medio Ambiente. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM. México, Ciudad de México. 108.

SEDEMA. 2014. Inventario de Emisiones de la CDMX, Contaminantes Criterio, Tóxicos y Efecto Invernadero Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente.

Sexton, K., Salinas, J.J., McDonald, T.J., Gowen, R.M., Miller, R.P., McCormick, J.B., and Fisher-Hoch, S.P. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons in maternal and umbilical cord blood from pregnant Hispanic women living in Brownsville, Texas. *Int J Environ Res Public Health* 8: 3365-3379.

Sint, T., Donohue, J.F., and Ghio, A.J. 2008. Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol* 20: 25-29.

Sram, R.J., Binkova, B., Dejmek, J., Chvatalova, I., Solansky, I., and Topinka, J. 2006. Association of DNA adducts and genotypes with birth weight. *Mutat Res* 608: 121-128.

Srivastava, V.K., Chauhan, S.S., Srivastava, P.K., Kumar, V., and Misra, U.K. 1986. Fetal translocation and metabolism of PAH obtained from coal fly ash given intratracheally to pregnant rats. *J Toxicol Environ Health* 18: 459-469.

Stanek, L.W., Brown, J.S., Stanek, J., Gift, J., and Costa, D.L. 2011. Air pollution toxicology--a brief review of the role of the science in shaping the current understanding of air pollution health risks. *Toxicol Sci* 120 *Suppl 1*: S8-27.

Suh, Y.J., Ha, E.H., Park, H., Kim, Y.J., Kim, H., and Hong, Y.C. 2008. GSTM1 polymorphism along with PM10 exposure contributes to the risk of preterm delivery. *Mutat Res* 656: 62-67.

Suh, Y.J., Kim, B.M., Park, B.H., Park, H., Kim, Y.J., Kim, H., Hong, Y.C., and Ha, E.H. 2007. Cytochrome P450IA1 polymorphisms along with PM(10) exposure contribute to the risk of birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 24: 281-288.

Suter, M., Abramovici, A., Showalter, L., Hu, M., Shope, C.D., Varner, M., and Aagaard-Tillery, K. 2010. In utero tobacco exposure epigenetically modifies placental CYP1A1 expression. *Metabolism* 59: 1481-1490.

Swanson, J.M., Entringer, S., Buss, C., and Wadhwa, P.D. 2009. Developmental origins of health and disease: environmental exposures. *Semin Reprod Med* 27: 391-402.

Syme, M.R., Paxton, J.W., and Keelan, J.A. 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 43: 487-514.

Tang, D., Li, T.Y., Liu, J.J., Chen, Y.H., Qu, L., and Perera, F. 2006. PAH-DNA adducts in cord blood and fetal and child development in a Chinese cohort. *Environ Health Perspect* 114: 1297-1300.

Tang, W.Y., Levin, L., Talaska, G., Cheung, Y.Y., Herbstman, J., Tang, D., Miller, R.L., Perera, F., and Ho, S.M. 2012. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and 5'-CpG methylation of interferon-gamma in cord white blood cells. *Environ Health Perspect* 120: 1195-1200.

Teneng, I., Montoya-Durango, D.E., Quertermous, J.L., Lacy, M.E., and Ramos, K.S. 2011. Reactivation of L1 retrotransposon by benzo(a)pyrene involves complex genetic and epigenetic regulation. *Epigenetics* 6: 355-367.



Teo, A.K.C., Oh, H.K., Ali, R.B., and Li, B.F.L. 2001. The Modified Human DNA Repair Enzyme O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Is a Negative Regulator of Estrogen Receptor-Mediated Transcription upon Alkylation DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 21: 7105-7114.

Thompson, L.M., Yousefi, P., Penaloza, R., Balmes, J., and Holland, N. 2014. Genetic modification of the effect of maternal household air pollution exposure on birth weight in Guatemalan newborns. *Reprod Toxicol* 50: 19-26.

Topinka, J., Milcova, A., Libalova, H., Novakova, Z., Rossner, P., Jr., Balascak, I., and Sram, R.J. 2009. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: bulky DNA adducts. *Mutat Res* 669: 13-19.

Tretyakova, N., Guza, R., and Matter, B. 2008. Endogenous cytosine methylation and the formation of carcinogen carcinogen-DNA adducts. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 49-50.

Tretyakova, N., Matter, B., Jones, R., and Shallop, A. 2002. Formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within K-ras and p53 gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach. *Biochemistry* 41: 9535-9544.

Vähäkangas, K., Loikkanen, J., Sahlman, H., Karttunen, V., Repo, J., Sieppi, E., Kummu, M., Huuskonen, P., Myöhänen, K., Storvik, M., *et al.* 2014. Chapter 20 - Biomarkers of toxicity in human placenta. In *Biomarkers in Toxicology*, R.C. Gupta, ed. Boston: Academic Press, pp. 325-360.

Valentine, R., and Kennedy, G.L. 2008. Inhalation Toxicology. In *Principles and methods of Toxicology*, A.W. Haynes, ed. USA: Taylor and Francis, pp. 1407-1464.

van Berlo, D., Hullmann, M., and Schins, R.P. 2012. Toxicology of ambient particulate matter. *EXS* 101: 165-217.

van Donkelaar, A., Martin, R.V., Brauer, M., Kahn, R., Levy, R., Verduzco, C., and Villeneuve, P.J. 2010. Global estimates of ambient fine particulate matter concentrations from satellite-based aerosol optical depth: development and application. *Environ Health Perspect* 118: 847-855.

Vinikoor-Imler, L.C., Davis, J.A., Meyer, R.E., Messer, L.C., and Luben, T.J. 2014. Associations between prenatal exposure to air pollution, small for gestational age, and term low birthweight in a state-wide birth cohort. *Environ Res* 132: 132-139.

Vinikoor-Imler, L.C., Stewart, T.G., Luben, T.J., Davis, J.A., and Langlois, P.H. 2015. An exploratory analysis of the relationship between ambient ozone and particulate matter

concentrations during early pregnancy and selected birth defects in Texas. *Environ Pollut* 202: 1-6.

Wang, S., Chanock, S., Tang, D., Li, Z., Jedrychowski, W., and Perera, F.P. 2008. Assessment of interactions between PAH exposure and genetic polymorphisms on PAH-DNA adducts in African American, Dominican, and Caucasian mothers and newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 405-413.

Watanabe, J., Shimada, T., Gillam, E.M., Ikuta, T., Suemasu, K., Higashi, Y., Gotoh, O., and Kawajiri, K. 2000. Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer. *Pharmacogenetics* 10: 25-33.

Wenzlaff, A.S., Cote, M.L., Bock, C.H., Land, S.J., Santer, S.K., Schwartz, D.R., and Schwartz, A.G. 2005. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* 26: 2207-2212.

Wick, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder-Althaus, X., Diener, L., Diener, P.A., Zisch, A., Krug, H.F., and von Mandach, U. 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118: 432-436.

Wilhelm-Benartzi, C.S., Houseman, E.A., Maccani, M.A., Poage, G.M., Koestler, D.C., Langevin, S.M., Gagne, L.A., Banister, C.E., Padbury, J.F., and Marsit, C.J. 2012. In utero exposures, infant growth, and DNA methylation of repetitive elements and developmentally related genes in human placenta. *Environ Health Perspect* 120: 296-302.

Wu, S.C., and Zhang, Y. 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 607-620.

Xue, W., and Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 206: 73-93.

Zanger, U.M., and Schwab, M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138: 103-141.

Zaragoza-Ojeda, M., Eguia-Aguilar, P., Perezpena-Diazconti, M., and Arenas-Huertero, F. 2016. Benzo[ghi]perylene activates the AHR pathway to exert biological effects on the NL-20 human bronchial cell line. *Toxicol Lett* 256: 64-76.

Research Article

**Prenatal Exposure to Particulate Matter and Ozone: Bulky DNA Adducts, Plasma Isoprostanes, Allele Risk Variants, and Neonate Susceptibility in the Mexico City Metropolitan Area**

Jorge A. Maciel-Ruiz,<sup>1</sup> Cristina López-Rivera,<sup>1</sup> Rogelio Robles-Morales,<sup>2</sup> Maria G. Veloz-Martínez,<sup>2</sup> Raquel López-Arellano,<sup>3</sup> Gabriela Rodríguez-Patiño,<sup>3</sup> Pavel Petrosyan,<sup>1</sup> Tzipe Govezensky,<sup>1</sup> Ana M. Salazar,<sup>1</sup> Patricia Ostrosky-Wegman,<sup>1</sup> Regina Montero-Montoya,<sup>1</sup> and María E. Gonsebatt<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México  
<sup>2</sup>División de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco-Obstetricia 3 "Dr. Victor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez", Centro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México  
<sup>3</sup>LEDEFAR, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Mexico City's Metropolitan Area (MCMA) includes Mexico City and 60 municipalities of the neighbor states. Inhabitants are exposed to emissions from over five million vehicles and stationary sources of air pollutants such as particulate matter (PM) and ozone. MCMA PM contains elemental carbon and organic carbon (OC). OCs include polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), many of which induce mutagenic and carcinogenic DNA adducts. Gestational exposure to air pollution has been associated with increased risk of intrauterine growth restriction, preterm birth or low birth weight risk, and PAH-DNA adducts. These effects also depend on the presence of risk alleles. We investigated the presence of bulky PAH-DNA adducts, plasma 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub>) and risk allele variants in neonates cord blood and their non-smoking mothers' leucocytes from families that were

living in a highly polluted area during 2014–2015. The presence of adducts was significantly associated with both PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> levels, mainly during the last trimester of gestation in both neonates and mothers, while the last month of pregnancy was significant for the association between ozone levels and maternal plasma 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Fetal CYP1B1\*3 risk allele was associated with increased adduct levels in neonates while the presence of the maternal allele significantly reduced the levels of fetal adducts. Maternal NQO1\*2 was associated with lower maternal levels of adducts. Our findings suggest the need to reduce actual PM limits in MCMA. We did not observe a clear association between PM and/or adduct levels and neonate weight, length, body mass index, Apgar or Capurro score. Environ. Mol. Mutagen. 00:000–000, 2019. © 2019 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** PAH-DNA adducts; gestational exposure; air pollution; particulate matter; allelic variants of risk

**INTRODUCTION**

Air pollution continues to be an environmental risk to human health. It is responsible for over seven million deaths per year worldwide and thus has been identified as global health priority by the World Health Organization (WHO, 2014a). Since 2013, air pollution has been classified as a Type 1 carcinogen to humans (IARC, 2013, 2015). One of the urban areas where inhabitants experience high air pollution is the Mexico City Metropolitan Area (MCMA), which includes Mexico City and 60 municipalities of the neighbor states of Mexico and Hidalgo. More than 20 million people (according to the 2010 National Census) live in an area that is approximately 8,000 km<sup>2</sup>, with a density of more than 2,500

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Grant numbers: 219887; 293450; 330134.

Grant sponsor: Programa Salud y Ambiente.

Grant sponsor: Programa Salud y Ambiente y Red SAI CONACYT; Grant number: 293450.

Grant sponsor: CONACYT; Grant numbers: 330134; 219887.

Grant sponsor: PAPIIT; Grant number: IN208914.

\*Correspondence to: María E. Gonsebatt, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. E-mail: margen@unam.mx

Received 13 October 2018; provisionally accepted 27 November 2018; and in final form 25 January 2019

DOI: 10.1002/em.22276

Published online 00 Month 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

inhabitants/km<sup>2</sup>. Here, the main sources of air pollution emissions are the daily circulation of approximately five million vehicles and the presence of stationary sources. These stationary sources include industries that consume approximately 47 million liters of gasoline equivalents per day (SEDEMA, 2008). The MCMA is located over 2,200 m above sea level at an altitude with 23% less oxygen. This is a condition that makes fuel combustion less efficient, which leads to the emission of increased levels of pollutants. In addition, the MCMA is surrounded by mountainous elevations that impair free displacement of contaminants (SEDEMA, 2008, 2010; Garcia-Suastegui et al., 2011).

Particulate matter (PM) and ozone are the major pollutants in the MCMA. PM refers to all compounds present in the atmosphere that are not gasses and are suspended in the air as droplets, solid particles, or their mixtures (Stanek et al., 2011). PM is classified as inhalable coarse particles with a diameter  $\leq 10 \mu\text{m}$  or PM<sub>10</sub>, fine particles with a diameter  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  or PM<sub>2.5</sub> and ultrafine particles (Brunekreef and Holgate, 2002; van Berlo et al., 2012). Some of the most important components of the PM present in the MCMA are elemental carbon (EC) and organic carbon (OC) (De Vizcaya-Ruiz et al., 2006; Mugica et al., 2008; Mugica et al., 2009). OCs include polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which have an important epidemiological significance because these compounds are mutagenic and carcinogenic agents (Poirier, 2004; EPA, 2005; IARC, 2010). The *in vitro* evidence shows that the PM<sub>10</sub> from the MCMA induces DNA damage in A549 cells, (De Vizcaya-Ruiz et al., 2006; Sanchez-Perez et al., 2009), micronuclei in leucocytes (Roubicek et al., 2007), and apoptosis in human and mouse cell lines (Alfaro-Moreno et al., 2002). Additionally, it has also been shown that PAHs associated with PM<sub>10</sub> from the MCMA can generate DNA adducts in blood leucocytes and A549 cells (Salcido-Neyoy et al., 2015). DNA adducts are generated when metabolites react with cell macromolecules, such as DNA nitrogenous bases (Phillips, 2005b). These "additions" or alterations of DNA structure might lead to mutations and DNA strand breaks. *In utero* exposure to tobacco smoke and/or PAHs has been associated with an increased risk of intrauterine growth restriction (Choi et al., 2008; Choi et al., 2012), preterm birth or low birth weight risk (Bell et al., 2007). These effects could be modulated by risk allelic variants present in the genes that encode xenobiotic-metabolizing enzymes (Sram et al., 2006; Suh et al., 2008; Padula et al., 2014).

Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with PM are biotransformed in cells by the cytochrome P450 family of enzymes. Specifically, CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 transform PAHs into reactive metabolites suitable for conjugation with endogenous ligands such as glutathione (GSH) or glucuronic acid. Glutathione S-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) participate in the conjugation of PAHs and PAH-metabolites or ozone secondary oxidation products with GSH (Xue and Warshawsky, 2005; Phillips, 2005a, 2005b).

In previous studies, we have observed that *CYP1B1*\*3 (rs1056836), and *GSTM1*\*0 or null were associated with increased levels of PAH- and bulky DNA adducts in blood leucocytes (Garcia-Suastegui et al., 2011; Molina et al., 2013). Additionally, it has been shown that *GSTM1* null modifies the response of the normal lung to ozone (Corradi et al., 2002) and the response of asthmatic children (Romieu et al., 2006).

Another important pollutant in the MCMA is ozone, a photoproduct generated by the action of sunlight UV irradiation, nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>), volatile organic compounds, such as PAHs and CO. It is a highly oxidative reactive gas that is present at elevated concentrations in MCMA air, especially during the periods when sunlight irradiation is high (SEDEMA, 2008, 2010). Studies have associated ozone exposure with biomarkers of lipid peroxidation, which could lead to systemic inflammation and lung damage (Chen et al., 2007; Bromberg, 2016) and deficits in lung growth in children (Rojas-Martinez et al., 2007).

Climate conditions in the MCMA comprise a dry season when rains are rare or absent (November–May), and a rainy season (June–October) when rains are very frequent. During the dry season, ozone, PM, and PAHs levels increase significantly (Mugica et al., 2010; Garcia-Suastegui et al., 2011). We have previously documented that the presence of benzo[a]pyrene (B[a]P)-DNA adducts in young adult blood leucocytes is associated with PM levels and allelic risk variants during the dry season (Garcia-Suastegui et al., 2011). Although preventive measures have been enforced, the presence of toxic PAHs in air pollution are not monitored besides the fact that PAHs of high molecular weight such as benzo(g,h,i)perylene, dibenzo(a)anthracene, and benzo(a)pyrene have been found associated with the PM<sub>10</sub> (Salcido-Neyoy et al., 2015).

Here, we designed a monitoring study, to investigate the impact of air pollution in the MCMA in newborns, using bulky DNA adducts and allelic variants of risk as well as the levels of plasma *8-iso-PGF*<sub>2 $\alpha$</sub>  (8-iso-prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> ) as biomarkers of health risk. We obtained samples from non-smoking mothers and cord blood of their neonates. These families were living in the northern zone of the MCMA, one of the most impacted areas, from February 2014 until December 2015. The influence of PM and ozone levels as well as allelic risk variants in these biomarkers was investigated using single and multiple regression analysis in different time windows during gestation. Also, we explored the association between PM and/or adduct levels and neonate weight, length, body mass index (BMI), Apgar and Capurro scores. The Apgar score is predictive of neonatal health after birth, while the Capurro score is predictive of gestational age.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

All chemicals and DNA primers were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) unless otherwise indicated.

### Study Subjects

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City.

Pregnant women between the ages of 19–35 that had remained in the MCMA during the last 3 months before delivery were recruited at the time of admission for labor and delivery at the Unidad Médica del Hospital de Alta Especialidad en Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional “La Raza” in México City. The sampling period was from February 2014 to December 2015. This hospital from the public health program IMSS serves pregnant women of the Center-North Zone of Mexico City, which is among the most polluted areas. After volunteers signed an informed consent, they were asked to complete a questionnaire concerning their age, parity, residence area, occupation, general health condition, medications, smoking habits, and exposure to genotoxic agents, such as X-rays. Exclusion criteria included: self-report of living near gasoline stations, paint and plastic factories or solvents, active smoking during pregnancy, occupational exposure to PAHs, or premature rupture of membranes by an infectious process. At birth, neonates were assessed for congenital anomalies immediately, and all were considered healthy. The Apgar scores after 1 min ranged from 7 to 9 but increased to between 8 and 10 after 5 min for all participants. Neonatal weight, length, and Capurro scores were also obtained. Blood and urine samples from mothers were obtained at the time of hospitalization previous to labor and cord blood was obtained immediately after birth. Samples were immediately frozen and transported to the laboratory for processing. Aliquots of blood plasma were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Additionally, a follow-up of the neonates was performed during the first 28 days of life to exclude neonatal death.

### Cotinine Determination

A semiquantitative test was performed to determine cotinine levels in urine using a One Step Cotinine Test Device (Certum Diagnostics, Monterrey, N.L. México), according to the manufacturer’s protocol. Cotinine samples were deemed positive if the cotinine concentration in urine was  $\geq 200$  ng/mL. Cotinine-positive individuals were excluded from the study.

### DNA Isolation

Leucocyte DNA was isolated using a standard phenol–chloroform extraction protocol (Sambrook et al., 1989) with RNase A and proteinase K treatments. Isolated DNA samples were aliquoted and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. DNA concentrations were determined spectrophotometrically at 260 nm. DNA was dissolved in nuclease-free water and the integrity and purity were established by 0.8% agarose gel electrophoresis and both  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{230}/A_{260}$  ratios.

### DNA Adduct Determination by $^{32}\text{P}$ -Postlabeling Assay

The bulky DNA adducts were quantified using  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay (Phillips and Ait, 2007). Briefly, DNA samples (4  $\mu\text{g}$ ) were digested overnight using a mixture of micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase at  $37^{\circ}\text{C}$ . Nuclease P1 digestion was used for adduct enrichment for 1 h. The phosphorylated nucleotides were labeled with T4-phosphonucleotide kinase (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) with 37  $\mu\text{Ci}$  of [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] adenosine triphosphate (ATP) (Perkin Elmer, Waltham, MA, U.S.A.) for 1 h. The labeled DNA adducts were resolved by multi-directional thin-layer chromatography (TLC) on  $10 \times 20$  cm polyethyleneimine (PEI)-cellulose plates (Machery-Nagel, Düren, Germany). The solvent systems used for TLC were as follows: D1: 1 M sodium phosphate, pH 6.0; D2: 3.5 M lithium formate, 8.5 M urea, pH 3.5; and D3: 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris, 8.5 M

urea, pH 8.0. After chromatography, TLC sheets were analyzed using a scintillator counter LS 6500 (Beckman-Coulter, Brea, CA, U.S.A.), and the DNA adduct levels (relative adduct labeling) were calculated from the adduct counts per minute (CPM), the specific activity of [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (with 30 fmol dAMP deoxyadenosine monophosphate (dAMP) as the labeling standard) and the amount of DNA used. All samples were analyzed twice (Binkova et al., 1994). A benzo[a]pyrene diol-epoxide (BPDE)-modified DNA standard was obtained by exposing HepG2 cells to 4  $\mu\text{M}$  benzo[a]pyrene for 24 h and was used as a positive control. DNA adduct levels were measured in the diagonal radioactive zone of the TLC sheets. The results were expressed as DNA adducts/ $10^8$  nucleotides. This methodological approach provides a summary measure of a complex mixture of adducts present in the postlabeling chromatograms that are resistant to P1 digestion (Tang et al., 2001).

### Genotyping

*GSTM1* deletion polymorphisms were determined by multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Abdel-Rahman et al., 1996). PCR-RFLP Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used to identify *NQO1*\*2, *CYP1B1*\*3, and *MGMT L84F* polymorphisms (Watanabe et al., 2000; Eguchi-Ishimae et al., 2005; Hill et al., 2007; Garcia-Suastegui et al., 2011; Molina et al., 2013).

### 8-Iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> Determination

*8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  levels were determined using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  was extracted from plasma using a modified version of previously described methods (Bastani et al., 2009; Larose et al., 2013; Dupuy et al., 2016). First, 100  $\mu\text{L}$  of the internal standard was added to 500  $\mu\text{L}$  of plasma. Then, 500  $\mu\text{L}$  of hydrolysis solution (15% w/w KOH potassium hydroxide (KOH)) was added. The resulting mixture was vortexed and incubated in an ultrasonic bath at  $40^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The samples were then acidified with 225  $\mu\text{L}$  of 6 M formic acid, vortexed, and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. Sample supernatants (350  $\mu\text{L}$ ) were applied to solid-phase extraction on an Oasis<sup>®</sup> MAX  $\mu\text{Elution}$  Plate. The wells were conditioned with 500  $\mu\text{L}$  of MeOH and equilibrated with 500  $\mu\text{L}$  of 20 mM formic acid. Samples were loaded and the wells were washed with 350  $\mu\text{L}$  of 2%  $\text{NH}_4\text{OH}$ . *8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  was eluted with 50  $\mu\text{L}$  of Acetonitrile:Indole-3-Propionic Acid (ACN:IPA, [40:60]) with 5% FA and diluted with 150  $\mu\text{L}$  of water. Aliquots (30  $\mu\text{L}$ ) were injected into the LC–MS/MS system using an ACQUITY BEH UPLC<sup>®</sup> C18 2.7  $\mu\text{m}$  column.

### Environmental Monitoring

The daily records of atmospheric  $\text{PM}_{2.5}$ ,  $\text{PM}_{10}$ , and ozone ( $\text{O}_3$ ) levels were obtained from the Automatic Atmospheric Monitoring Network of Mexico City (RAMA, for its Spanish initials) monitoring stations located in the Center-North zone of Mexico City, location of the Centro Médico Nacional “La Raza” and the residential areas of the volunteers. The Acolman, Atizapán, Camarones, Cuautitlán, FES Acatlán, Hospital General de México, Iztacalco, Merced, San Agustín, San Juan de Aragón, Tlalnepan-tla, Tultitlán, Villa de la Flores, and Xalostoc monitoring stations collected  $\text{PM}_{10}$  emission levels, while Camarones, Hospital General de México, Merced, San Agustín, San Juan de Aragón, Tlalnepan-tla, and Xalostoc monitoring stations collected  $\text{PM}_{2.5}$  emission levels in that area. Acolman, Atizapán, Camarones, Cuautitlán, FES Acatlán, Gustavo A. Madero, Los Laureles, La Presa, Montecillo, San Agustín, San Juan de Aragón, Tlalnepan-tla, Tultitlán, Villa de las Flores, and Xalostoc monitoring stations were used to collect data for ozone concentration levels. Monthly medians  $\pm$  IQR of PM and ozone levels from the years 2014 to 2015 were estimated from the data obtained from the monitoring stations and used in our analyses.

### Statistical Analysis

Average age, weeks of gestation, and weight at birth, as well as PM and monthly ozone levels, were calculated. PM and ozone monthly medians were estimated for the last month, bimester and trimester of the gestation period for association analysis. To compare the differences in PM levels between the months of November–May (dry season) and June–October (rainy season) reported from 2014 to 2015, we performed a Mann–Whitney U test analysis. To compare the levels of the PAH-DNA adducts and *8-iso-prostanePGF<sub>2α</sub>* in mothers and their neonates, the Wilcoxon paired-sample test was used. The association between the levels of adducts in maternal and cord blood leucocytes and the correlation between PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub>, and PAH-DNA adduct levels were explored using Spearman's rank correlation coefficient analysis. Allele and genotype frequencies were estimated and deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was examined using  $\chi^2$  test. To evaluate the association between the levels of DNA adducts and the different polymorphisms, we compared the wild-type genotype to the heterozygous/mutant homozygous genotypes with a Mann–Whitney U test. Multiple regression analyses between the levels of DNA adducts in umbilical cord blood, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub>, and allelic risk variants in both mothers and neonates were performed. To examine the interaction between maternal and fetal *CYP1B1* genotypes and umbilical cord blood adduct levels, an empirical cumulative distribution analysis was used to associate each genotype combination with the levels of bulky DNA adducts. To explore the association of the levels of DNA adducts or *8-iso-prostanePGF<sub>2α</sub>* and different variables measured (polymorphisms, the occupation of the mother, and parity; covariables: age of the mother and PM levels or ozone levels) general linear models were used. The logarithmic transformations were used for DNA adducts and *8-iso-prostanePGF<sub>2α</sub>* levels to correct for normality, variance homogeneity was tested with Levene's test. "Post-hoc" adjustment for multiple comparisons of Tukey–Kramer was used. In all statistical tests,  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The statistical tests were performed using SAS 9.0 and GraphPad Prism 7 software.

## RESULTS

### Study Population

A total of 106 out of 150 interviewed pregnant women fulfilled our inclusion criteria. All women tested negative for urine cotinine (cotinine  $<200$  ng/mL urine; Table I). The average age of volunteers was  $30.92 \pm 5.6$  years, and the average pregnancy duration was  $38.33 \pm 1.1$  weeks. In our study population, 48% of neonates were males, the average birth weight was  $3,075 \pm 414.1$  g, and the average length was  $49.63 \pm 5.6$  cm in newborns born after 37 weeks. Neonate weight, length, and BMI were not associated with PM or ozone levels (data not shown).

### Air Pollution Data

The daily 24 h concentrations reported by the RAMA stations were recorded, and the monthly medians  $\pm$  IQR were estimated for PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, and ozone for the period between 2014 and 2015 (Fig. 1A). PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> levels increased significantly ( $P < 0.0001$ ) during the dry seasons (November–April) compared with the levels of PM observed during the rainy seasons (May–October) from 2014 to 2015. Rains cause an atmospheric wash that drags the suspended particles to the ground, which is reflected in

**TABLE I. Demographic Characteristics and Biomarkers of the Study Population**

Number of volunteers that complied with inclusion criteria	106
Neonate gestational age (weeks; mean $\pm$ SD)	$38.33 \pm 1.1$
Neonate sex (n)	
Male	49
Female	53
Missing data	4
Birth weight (g; mean $\pm$ SD)	$3075 \pm 414.1$
Birth length (cm; mean $\pm$ SD)	$49.63 \pm 5.6$
Maternal age (years; mean $\pm$ SD)	$30.92 \pm 5.6$
Maternal occupation/exposure (n)	
Housewife	40
Employed	53
Occupational exposure to PAHs	3
Non reported	10
Smokers	0
PAH-DNA adducts/ $10^8$ nucleotides	
Mothers (median $\pm$ IQR)	1.105 (0.513–1.832)
Cord Blood (median $\pm$ IQR)	1.334 <sup>a</sup> (0.779–2.000)
<i>8-iso-PGF<sub>2α</sub></i> (pg/mL plasma)	
Mothers (median $\pm$ IQR)	127.6 (76.64–174.1)
Cord Blood (median $\pm$ IQR)	210.4 <sup>b</sup> (149.0–277.3)
Cord Blood/Maternal Blood adduct ratio (CBMBR)	
CBMBR $> 1$ (%)	60.37
CBMBR $< 1$ (%)	39.63

SD = standard deviation; IQR = interquartile range; Wilcoxon paired-sample test.

<sup>a</sup> $P = 0.0078$ .

<sup>b</sup> $P < 0.0001$ .

a decrease of environmental PM (SEDEMA, 2008, 2010). The highest levels of O<sub>3</sub> were observed during the March–June period. PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> emissions were not linearly associated (Fig. 1A). Thus, the association analyses were performed separately for each PM size. Taking into consideration the weeks of gestation and date of birth in each case, we estimated the average PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> reported emissions during the first, second, third trimesters and whole pregnancy for each case (Fig. 1B,C). The majority of the pregnant women were exposed during the gestational period to higher PM levels than the Mexican Guideline values for the annual mean of PM ( $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for PM<sub>2.5</sub> and  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for PM<sub>10</sub>), the limit values are represented by dashed lines in Fig. 1B,C.

### Bulky DNA Adducts in Mothers and Newborns

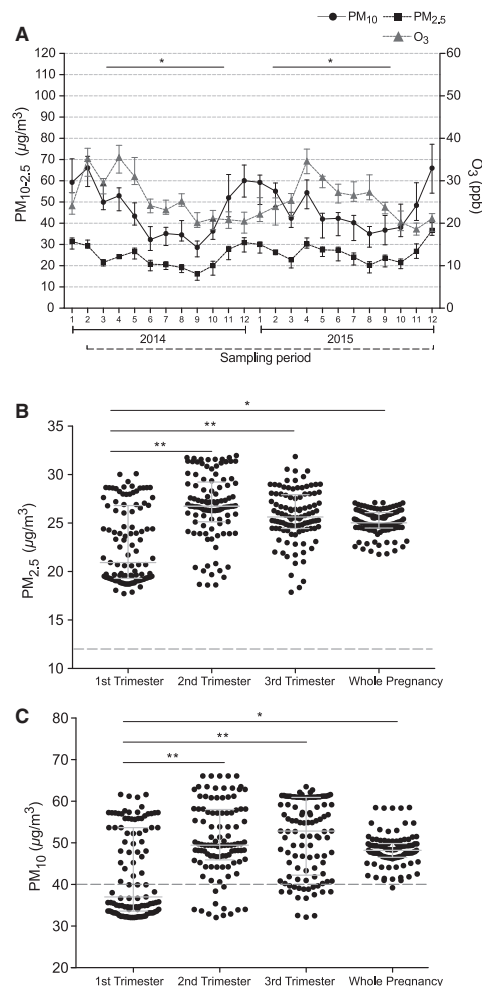
The median values for maternal and cord blood bulky DNA adducts were 1.105 (IQR: 0.513, 1.832) and 1.334 (IQR: 0.7798, 2.0) adducts per  $10^8$  nucleotides, respectively. These median values were significantly different ( $P = 0.0022$ ; Table I; Fig. 2A), indicating that the levels of adducts in cord blood were approximately 20% higher than those observed in their mothers.

However, the levels of maternal DNA adducts were positively associated with cord blood levels ( $\rho = 0.634$ , 95% CI [0.500, 0.738],  $P < 0.0001$ ; Fig. 2C), suggesting an effective transfer of PAHs across the placental tissue. To compare the adduct levels, we calculated the cord blood/maternal adducts ratio (CBMBR). CBMBR values above 1 represent higher susceptibility of fetal DNA damage due to environmental exposure to PAHs (Jedrychowski et al., 2013). The analysis showed that 60.95% of cord blood leucocytes samples were  $>1$ , with a median of 1.64 and an IQR of 1.29, 2.10. This indicates the presence of higher

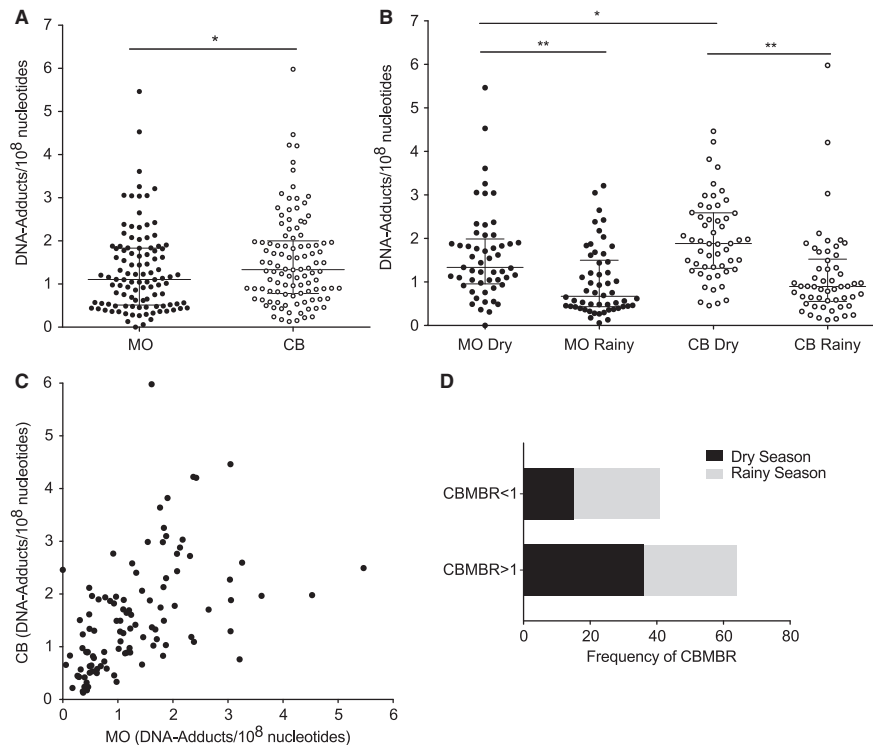
levels of adducts in 60% of cord blood samples compared with maternal DNA (Table I).

We explored the association between  $PM_{2.5}$  and  $PM_{10}$  and adduct levels in several time windows before birth. In the case of  $PM_{2.5}$ , significant associations were found between adduct levels and particle concentrations (Fig. 3). In maternal leucocytes, we did not find a significant association during the last month before delivery (Spearman's  $\rho = 0.0465$ , 95% CI [-0.152, 0.241],  $P = 0.3187$ ; Fig. 3A). Instead, in the last 2 and 3 months before delivery we observed significant correlations ( $\rho = 0.3075$ , 95% CI [0.117, 0.475],  $P = 0.0007$  and  $\rho = 0.3453$ , 95% CI [0.158, 0.507],  $P = 0.0002$ , respectively). In cord blood, we found similar results for the last month ( $\rho = 0.1134$  [-0.085, 0.303],  $P = 0.1247$ ; Fig. 3B). However, during the last 2 and 3 months before birth ( $\rho = 0.4435$ , 95% CI [0.269, 0.589],  $P < 0.0001$ ;  $\rho = 0.4722$ , 95% CI [0.303, 0.612],  $P < 0.0001$ , respectively) the correlations are significant. The strongest association was observed using the last 3 months window. The association between DNA adducts in cord blood and  $PM_{2.5}$  emission showed a linear dose-response trend.

In the case of  $PM_{10}$ , Spearman's correlation analysis in maternal leucocytes showed that the stronger point estimate of the association was during the last month of gestation ( $\rho = 0.341$ , 95% CI [0.154, 0.504],  $P = 0.0002$ ; Fig. 4A), compared to 2 months ( $\rho = 0.306$ , 95% CI [0.1165, 0.475],  $P = 0.0007$ ) or 3 months before delivery ( $\rho = 0.268$ , 95% CI [0.075, 0.442],  $P = 0.0028$ ). Similar results were observed when the analyses were performed with cord blood. The stronger point estimate of the association



**Fig. 1.** (A)  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$ , and Ozone monthly concentrations from 2014 to 2015 as reported by the Automatic Atmospheric Monitoring Network of Mexico City (RAMA). Monthly medians and interquartile ranges (median  $\pm$  IQR) were estimated as described in "Materials and Methods." Mann-Whitney U test was used to compare PM and  $O_3$  concentrations between the dry (November–May) and the rainy (June–October) seasons during the sampling period,  $*P < 0.0001$ . (B) Estimation of the average  $PM_{2.5}$  exposure concentrations for the first, second, third trimesters and whole pregnancy for each volunteer. Exposure was estimated for each volunteer, taking into consideration the weeks of gestation, date of birth, and the daily  $PM_{2.5}$  reported emissions by RAMA. Levels of  $PM_{2.5}$  exposure between these periods were analyzed using a Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparisons tests,  $***P < 0.0001$  (first vs. second trimester),  $**P < 0.0001$  (first vs. third trimester),  $*P < 0.0046$  (first vs. whole pregnancy). (C) Estimation of the average  $PM_{10}$  exposure concentrations for the first, second, third trimesters and whole pregnancy. Exposure was estimated for each volunteer, taking into consideration the weeks of gestation, date of birth, and the daily  $PM_{10}$  reported emissions by RAMA. Levels of  $PM_{10}$  exposure between these periods were analyzed using a Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparisons tests,  $***P < 0.0001$  (first vs. second trimester),  $**P < 0.0001$  (first vs. third trimester),  $*P = 0.0060$  (first vs. whole pregnancy). The majority of the volunteers were exposed during each gestational period to higher levels than the PM Mexican Guideline values for the annual mean (12  $\mu g/m^3$  for  $PM_{2.5}$  and 40  $\mu g/m^3$  for  $PM_{10}$ ), the limit values are represented by dashed lines.



**Fig. 2.** (A) Maternal (MO) and umbilical cord blood (CB) DNA adducts levels. The median and interquartile ranges (median  $\pm$  IQR) are shown. Data were analyzed using the Wilcoxon paired-sample test, \* $P = 0.0022$ . (B) Seasonal comparison between the levels of DNA adducts in mothers (MO) and cord blood (CB) during the last month of gestation was analyzed using Mann-Whitney U test while the Wilcoxon paired-sample

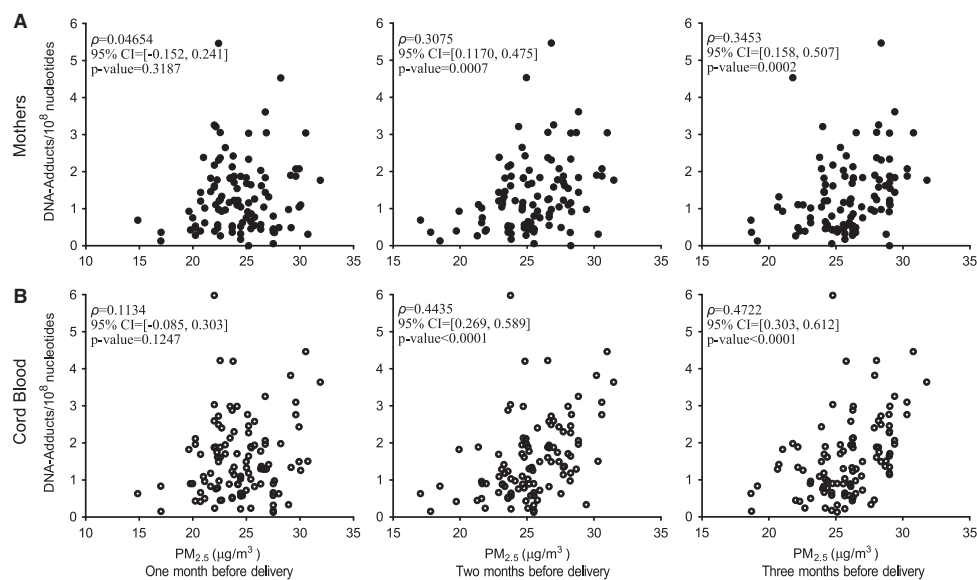
test was used for MO-CB comparisons; \* $P < 0.0001$ , \*\* $P = 0.0009$ . (C) Spearman's correlation analysis between maternal and neonate PAH-DNA adduct levels ( $\rho = 0.6344$ , 95% CI [0.500–0.738],  $P < 0.0001$ ). (D) Cord Blood/Maternal Blood adduct ratio (CBMBR) separated by season. A higher proportion of CBMBR > 1 is observed during the dry season. CBMBR > 1 indicates higher fetal susceptibility to generate DNA damage.

between PM and adduct levels was 1 month before birth ( $\rho = 0.465$ , 95% CI [0.295, 0.607],  $P < 0.0001$ ; Fig. 4B) compared to 2 months ( $\rho = 0.446$ , 95% CI [0.273, 0.591],  $P < 0.0001$ ) or 3 months before birth ( $\rho = 0.362$ , 95% CI [0.178, 0.522],  $P < 0.0001$ ). The associations between PM<sub>2.5</sub> or PM<sub>10</sub> and adduct levels were always higher in cord blood, suggesting a higher sensibility for adduct formation and/or slower repair rate.

The formation of cord blood DNA adducts during the last months of gestation was further explored using exposure ranges both below and above the last trimester PM<sub>10</sub> average of 48.58  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Fig. 4, dashed line). For the last month of gestation, we did not observe a significant association at PM levels < 48.58  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (below the average). However, above this value, the association was highly significant ( $\rho = 0.464$ ,

95% CI [0.224, 0.651],  $R^2 = 0.251$ ,  $P < 0.0001$ ). Similar results were observed with PM levels 2 months before birth, with exposures  $\geq 48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $\rho = 0.5745$ , 95% CI [0.376, 0.722],  $R^2 = 0.327$ ,  $P < 0.0001$ ), and at 3 months before birth  $\geq 48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $\rho = 0.464$ , 95% CI [0.241, 0.640],  $R^2 = 0.197$ ,  $P < 0.0001$ ). We also estimated the relative risk (RR) of having  $\geq 2$  DNA adducts (approximately 50% above the median value) when the exposure exceeded 48.58  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . The RR increased slightly for mother's samples (RR = 1.56, 95% CI [1.11, 2.21]) during the last month, and the last trimester (RR = 1.49, 95% CI [1.05, 2.13]), while for the last trimester the significance is lost. In contrast, in cord blood samples, it was possible to observe higher RR values during the last month (RR = 4.63, 95% CI [3.30, 6.50]), the last trimester (RR = 3.52, 95% CI [2.48, 5.01]) and the last





**Fig. 3.** Spearman's correlation analyses of the association between  $PM_{2.5}$  and bulky DNA adduct levels. (A) PAH-DNA adduct levels in maternal blood were positively associated with  $PM_{2.5}$  levels during the last 2 and 3 months before delivery. (B) DNA adduct levels in umbilical cord blood were positively associated with  $PM_{2.5}$  levels during the last 2 and 3 months of pregnancy.

trimester of exposure (RR = 3.38, 95% CI [2.37, 4.82]). These results suggest a higher susceptibility for PAH-DNA adducts in cord blood leucocytes when  $PM_{10}$  concentrations are higher than  $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

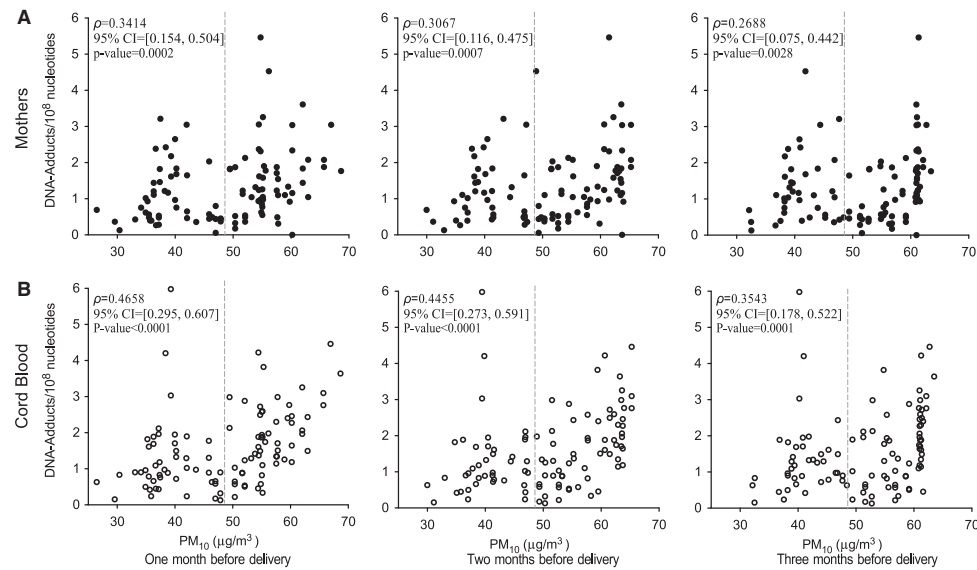
We also explored the relationship between PM emissions and DNA adduct levels in earlier time windows. In the case of the first trimester of pregnancy, the correlations were negative for both PM sizes or not significant (data not shown). During the second trimester,  $PM_{2.5}$  significant negative associations were found for maternal ( $\rho = -0.3385$ , 95% CI [-0.502, -0.151],  $P = 0.0002$ ) and umbilical cord blood ( $\rho = -0.4448$ , 95% CI [-0.590, -0.271],  $P < 0.0001$ ). Similar results were obtained when maternal ( $\rho = -0.3129$ , 95% CI [-0.480, -0.123],  $P = 0.0006$ ) and umbilical cord blood ( $\rho = -0.3655$ , 95% CI [-0.524, -0.181],  $P < 0.0001$ ) adducts were associated with  $PM_{10}$  emissions at this window time. The strongest association during the last trimester of gestation (Figs. 3 and 4) suggests a fast formation–elimination of DNA adducts.

DNA adduct levels were also analyzed taking into consideration the season of delivery, we observed significant differences between maternal and cord blood DNA in births that occurred during the dry season ( $P = 0.0009$ ) but not when births occurred during the rainy season. Maternal

DNA showed higher levels of adducts when blood samples were obtained during the dry season than during the rainy season ( $P < 0.0001$ ), and the same effect was observed when we compared the levels of adduct in cord blood DNA from births that occurred during the dry season with those delivered during the rainy season ( $P < 0.0001$ ; Fig. 2B). Additionally, CBMBR values  $>1$  were more frequently observed during the dry season (Fig. 2D).

#### Levels of 8-Isoprostane $PGF_{2\alpha}$ in Mothers and Cord Blood

Isoprostanes are oxidized products of arachidonic acid and have been reported as useful markers of oxidative stress processes, such as chronic ozone exposure (Chen et al., 2007). The levels of 8-iso- $PGF_{2\alpha}$  were determined in both maternal and cord blood plasma. Maternal and cord blood isoprostanes correlated significantly ( $\rho = 0.265$ , 95% CI [-0.039, 0.524],  $P = 0.039$ ), although cord blood levels were significantly higher ( $P < 0.0001$ ) (Table I) as previously reported (Rossner Jr. et al., 2009; Chafer-Pericas et al., 2015). In addition, we observed a significant association between maternal 8-iso- $PGF_{2\alpha}$  and ozone levels only during the last month of pregnancy ( $\rho = 0.322$ , 95% CI [0.067, 0.538],  $P = 0.0060$ ), but they were not associated



**Fig. 4.** Spearman's correlation analyses of the association between  $PM_{10}$  and bulky DNA adduct levels. (A) PAH-DNA adduct levels in maternal leucocytes were positively associated with  $PM_{10}$  levels at three-time windows during the last trimester of pregnancy. The highest association was observed during the last month. (B) DNA adduct levels in umbilical cord blood at three-time windows during the last trimester of gestation.

The highest positive association with  $PM_{10}$  levels was observed during the last month of gestation. The dashed lines represent the concentration of last trimester  $PM_{10}$  mean value ( $48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). No significant association were observed at  $PM_{10} < 48.58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , while highly significant ones were observed at  $PM_{10} > 48.58$ . Spearman's "p" and "P" values, as well as confidence intervals, are presented in the "Results."

with  $PM_{2.5}$  or  $PM_{10}$  levels. We could not find any correlation between the levels of umbilical cord serum  $\delta$ -iso- $PGF_{2\alpha}$  and ozone concentrations.

#### The Effect of Allelic Variants of Risk on the Levels of DNA Adducts and Isoprostanes

The relationship between  $\delta$ -iso- $PGF_{2\alpha}$ , bulky DNA adducts, and allelic risk variants was explored (Tables 2–4). For the  $NQO1^*2$  allele, we observed a significant difference in the levels of maternal bulky DNA adducts between the Pro/Pro and the Pro/Ser maternal variants ( $P = 0.02$ , Table II). For  $CYP1B1$  and  $MGMT$  polymorphisms, we analyzed the heterozygous and the mutant homozygous genotype together assuming that the presence of one mutant allele confers risk and also due to the small number of individuals with mutant homozygous genotypes that made genetic analysis difficult.

Multiple regression analyses were performed separately for each PM size due to the collinearity of the PM concentrations in air samples (Tables III and IV).  $CYP1B1$  polymorphism affected the levels of umbilical cord blood adducts associated with  $PM_{2.5}$  emissions ( $\beta = 0.257$ ,  $P = 0.009$ ; Table III). The

presence of at least one  $CYP1B1^*3$  mutant allele in the maternal genome was associated with lower adduct levels in umbilical cord blood ( $\beta = -0.189$ ,  $P = 0.034$ ; Table III). For  $PM_{10}$  emissions also, higher levels of adducts in umbilical cord blood were associated with the presence of at least one  $CYP1B1^*3$  risk allele in the fetus ( $\beta = 0.212$ ,  $P = 0.035$ ; Table IV). Similarly, to what was observed in the single correlation analyses (Figs. 3 and 4) the association between  $PM_{2.5}$  and adduct levels in cord leucocytes DNA was stronger than that observed with  $PM_{10}$  emissions ( $\beta = 0.0645$ ,  $P < 0.001$ ; Table III) vs. ( $\beta = 0.0159$ ,  $P < 0.001$ ; Table IV), respectively. In the case of maternal blood adducts, no significant associations were found (data not shown) with the exception of those previously reported, where lower levels of adducts were associated with  $NQO1^*2$  polymorphism. Furthermore, using an empirical cumulative distribution analysis, and considering the combinations of alleles of  $CYP1B1^*3$  in both the mother and the cord blood, we found higher levels of DNA adducts in umbilical cord blood in the following genotype configuration: maternal Leu/Leu and cord blood Leu/Val (Fig. 5). Interestingly, these observations suggest an increased fetal susceptibility to PAHs exposure independently of maternal genotype. We could not find

TABLE II. Descriptive Characteristics of Studied Allelic Variants, PAH-DNA Adducts and 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

Gene	Genotype	Mothers			Neonates		
		N (%)	DNA adducts <sup>a</sup> (median ± IQR)	8-iso-PGF <sub>2α</sub> <sup>b</sup> (median ± IQR)	N (%)	DNA Adducts <sup>a</sup> (median ± IQR)	8-iso-PGF <sub>2α</sub> <sup>b</sup> (median ± IQR)
<i>GSTM1</i>	Null	40 (37.7%)	1.186 ± (0.483–1.836)	114.6 ± (69.56–172)	41 (39.8%)	1.328 ± (0.895–2.048)	213.5 ± (139.3–268.7)
	Positive	66 (62.3%)	1.075 ± (0.528–1.826)	133.3 ± (77.1–180.4)	62 (60.2%)	1.343 ± (0.750–2.080)	202.5 ± (149.1–289.6)
<i>CYP1B1</i>	Leu/Leu	80 (75.5%)	1.104 ± (0.513–1.832)	126.3 ± (91.3–172)	80 (79.2%)	1.328 ± (0.760–1.897)	210.5 ± (148.8–292.8)
	Leu/Val + Val/Val	22 (20.8%) 4 (3.8%)	1.191 ± (0.482–1.916)	105.2 ± (58.3–155.2)	21 (20.8%) 0 (0%)	1.417 ± (0.709–2.613)	208.3 ± (152.8–250)
<i>MGMT</i>	Leu/Leu	55 (51.9%)	1.205 ± (0.538–1.876)	128.1 ± (78.2–163.5)	53 (51.5%)	1.340 ± (0.848–2.182)	210 ± (160.9–302.5)
	Leu/Phe + Phe/Phe	43 (40.6%) 8 (7.5%)	0.978 ± (0.480–1.822)	127.6 ± (75.4–181.9)	41 (39.8%) 9 (8.7%)	1.410 ± (0.728–2.003)	200.5 ± (135.2–247.2)
<i>MG01</i>	Pro/Pro	35 (34.0%)	1.242 ± (0.754–1.873)	116.9 ± (76.5–180.4)	30 (29.1%)	1.569 ± (0.832–1.969)	222 ± (164.5–342.8)
	Pro/Scr	54 (52.4%)	0.785 ± (0.432–1.669)*	131.9 ± (100–160.9)	57 (55.3%)	1.328 ± (0.790–2.217)	201.7 ± (137.2–250)
	Scr/Scr	14 (13.6%)	1.614 ± (0.896–1.946)	146.2 ± (62.8–188.7)	16 (15.5%)	1.118 ± (0.525–1.883)	244.8 ± (153.2–254.6)

<sup>a</sup>DNA adducts 10<sup>7</sup>/nucleotides.<sup>b</sup>pg/mL of plasma.\*Statistical difference vs. Pro/Pro allele, Kruskal–Wallis test, *P* = 0.02.

significant associations between the other allelic risk variants and DNA or lipid damages.

## DISCUSSION

According to the World Health Organization (WHO 2014a,b), ambient air pollution is a larger contributor to morbidity and mortality than infectious diseases, such as AIDS, tuberculosis, or malaria. This impacts public health systems costs, especially in developing countries, such as Mexico.

Prenatal exposure to air pollution has been associated with adverse birth outcomes worldwide (Brauer et al., 2008; Pedersen et al., 2013; Ha et al., 2014; Padula et al., 2014; Vinikoor-Imler et al., 2014; Vinikoor-Imler et al., 2015; Ebusu et al., 2016), developmental delay (Perera et al., 2006; Peterson et al., 2015), reduced IQ (Perera et al., 2009b, 2014), and increased incidence of asthma (Perera et al. 2009a).

Specific components of air pollution such as PAHs, PM, ozone, and NO<sub>3</sub> have been associated with epigenetic changes in cord blood leucocytes that could lead to asthma (Perera et al., 2009a; Tang et al., 2012), lung growth deficit (Rojas-Martinez et al., 2007), and reduced growth in children (Tang et al., 2006; Choi et al., 2008).

In the MCMA, epidemiological studies associate air pollution with respiratory and systemic effects in children (Calderon-Garciduenas et al., 2001; Calderon-Garciduenas et al., 2003; Rojas-Martinez et al., 2007).

Here, we evaluated the impact of PM and ozone on biomarkers such as PAH-DNA adducts and 8-isoprostanes in fetal and maternal white blood cells. The study focused on non-smoking pregnant women who lived in an area of the MCMA highly impacted by industry and vehicle emissions (SEDEMA, 2008, 2010). DNA adducts are considered as biomarkers of a biologically effective dose because they represent the amount of carcinogen bound to DNA, which escapes detoxification and repair mechanisms (Poirier, 1997; Godschalk et al., 2003). Damage to DNA is an initial event in the carcinogenesis process. Tumor mutations consistent with the presence of B[a]P-DNA adducts have been reported in lung tumors from smokers (Alexandrov et al., 2016). These and earlier evidence in animal models support PAH-DNA adducts as biomarkers for cancer risk (Poirier, 1997; Godschalk et al., 2003; Castano-Vinyals et al., 2004). Conversely, isoprostanes are excellent markers of lipid peroxidation, which occur due to the exposure or generation of free radicals and reactive oxygen species. High levels of these lipid peroxidation products have been associated with several diseases, such as atherosclerosis, myocardial infarction, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma, and others (Cracowski et al., 2002).

We observed a strong correlation between the levels of maternal adducts and the levels of umbilical cord blood adducts, showing the importance of maternal exposure for fetal levels of DNA damage (Fig. 2C). In humans and animal

**TABLE III. Multiple Regression Analysis Between the Levels of Log-Transformed DNA Adducts in Umbilical Cord Blood, PM<sub>2.5</sub>, and Allelic Risk Variants in Both Mothers and Neonates**

Variables	Coefficient $\beta$	Std. Error	<i>t</i>	<i>P</i> -value	VIF
Constant	-0.711	0.343	-2.076	0.041	
PM <sub>2.5</sub>	0.0645	0.0130	4.967	<b>&lt;0.001</b>	1.030
<i>Neonate allelic risk variants</i>					
<i>CYP1B1</i> *3 (NB)	0.257	0.0962	2.667	<b>0.009</b>	1.270
<i>GSTM1</i> *0 (NB)	-0.0003	0.0931	-0.003	0.997	1.755
<i>MGMT</i> L84F (NB)	-0.101	0.0896	-1.129	0.262	1.690
<i>NQO1</i> Pro/Ser (NB)	0.00005	0.0089	0.006	0.995	1.690
<i>NQO1</i> Ser/Ser (NB)	-0.0851	0.123	-0.691	0.492	1.665
<i>Maternal allele risk variants</i>					
<i>CYP1B1</i> *3 (MO)	-0.189	0.0876	-2.159	<b>0.034</b>	1.199
<i>GSTM1</i> *0 (MO)	0.0218	0.0935	0.233	0.817	1.735
<i>MGMT</i> L84F (MO)	0.0498	0.0910	0.547	0.586	1.750
<i>NQO1</i> Pro/Ser (MO)	-0.117	0.0861	-1.362	0.177	1.564
<i>NQO1</i> Ser/Ser (MO)	0.0365	0.124	0.296	0.768	1.579

Significant values in bold; VIF = variance inflation factor.

**TABLE IV. Multiple Regression Analysis Between the Levels of Log-Transformed DNA Adducts in Umbilical Cord Blood, PM<sub>10</sub>, and Allelic Risk Variants in Both Mothers and Neonates**

Variables	Coefficient $\beta$	Std. Error	<i>t</i>	<i>P</i> -value	VIF
Constant	0.0960	0.222	0.432	0.667	
PM <sub>10</sub>	0.0159	0.00384	4.140	<b>&lt;0.001</b>	1.140
<i>Neonate allelic risk variants</i>					
<i>CYP1B1</i> *3 (NB)	0.212	0.0992	2.140	<b>0.035</b>	1.275
<i>GSTM1</i> *0 (NB)	0.0143	0.0966	0.148	0.883	1.762
<i>MGMT</i> L84F (NB)	-0.0587	0.0927	-0.633	0.528	1.685
<i>NQO1</i> Pro/Ser (NB)	0.0859	0.0968	0.888	0.377	1.824
<i>NQO1</i> Ser/Ser (NB)	-0.0178	0.129	-0.138	0.890	1.702
<i>Maternal allele risk variants</i>					
<i>CYP1B1</i> *3 (MO)	-0.135	0.0914	-1.476	0.144	1.217
<i>GSTM1</i> *0 (MO)	0.0402	0.0969	0.415	0.679	1.738
<i>MGMT</i> L84F (MO)	0.0487	0.0943	0.517	0.607	1.750
<i>NQO1</i> Pro/Ser (MO)	-0.134	0.0897	-1.493	0.139	1.583
<i>NQO1</i> Ser/Ser (MO)	-0.00994	0.130	-0.0762	0.939	1.638

Significant values in bold; VIF = variance inflation factor.

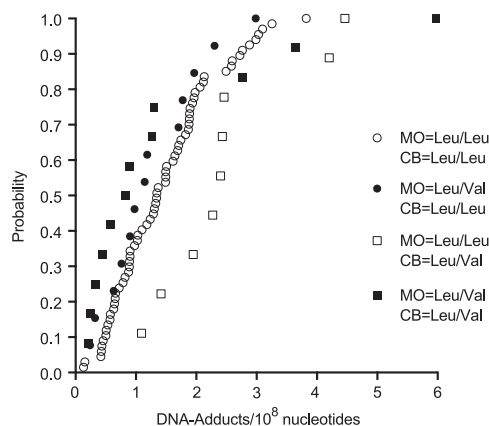
models, data support the effective transfer of PAHs across the placental tissue and the accumulation of PAH-metabolites in cord blood (Srivastava et al., 1986; Neubert and Tapken, 1988; Sexton et al., 2011). Furthermore, the placental tissue has the ability to metabolize PAHs molecules which could lead to DNA adducts (Topinka et al., 2009; Karttunen et al., 2010; Suter et al., 2010; Janssen et al., 2017).

Umbilical cord blood leukocytes DNA showed higher levels of bulky adducts than maternal white blood cell DNA, demonstrating that *in utero* exposure to carcinogens such as PAHs leads to increased susceptibility to DNA damage in the fetus (Fig. 2A). The molecular and developmental effects of prenatal exposure to PM and PAHs have been evaluated by several research groups in cities with different degrees of air pollution. In these reports, the levels of umbilical adducts are equal or higher than those detected in maternal blood (Perera et al., 2005a, 2005b; Tang et al., 2006; Topinka et al., 2009; Perera et al., 2011; Herbstan et al.,

2012; Jedrychowski et al., 2013). In our study, we observed a CBMBR > 1 in 60% of cord blood samples (Table I), and the bulk of CBMBR > 1 samples were observed when the PM concentrations were higher (Fig. 1). These results suggest that in the air pollution conditions in the MCMA, PAHs and PAHs reactive metabolites accumulate in the neonate, increasing the risk for adduct formation.

We observed a significant association between the levels of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> emissions and bulky DNA adducts in both maternal and umbilical cord blood (Figs. 3 and 4). The estimated PM<sub>2.5</sub> exposure showed a significant association with DNA adduct levels in the last 2 and 3 months before birth (Fig. 3). In the case of PM<sub>10</sub>, we could not identify a specific window with higher susceptibility for adduct formation due to the correlation coefficients' overlapping.

The WHO and several investigations have highlighted the potential health effect of PM, specifically, the aerodynamic fraction PM<sub>2.5</sub> that enter more deeply into the



**Fig. 5.** Empirical cumulative distribution analysis with the allelic combinations of *CYP1B1*\*3 polymorphism in mothers (MO) and cord blood (CB) and the level of DNA adducts in umbilical cord blood. The differences in curves indicate distinct data distributions and thus higher DNA adduct levels in fetuses with the *CYP1B1*\*3 genotype.

respiratory tract and could have higher levels of PAHs (Dockery and Pope 3rd, 1994; Brunekreef and Holgate, 2002; IARC, 2013, 2015).

The formation of bulky DNA adducts showed a linear trend with  $PM_{2.5}$  exposure during the last trimester of gestation (Fig. 3). Therefore, in our study, even at low levels of  $PM_{2.5}$  emissions the generation of adducts can be observed. All volunteers were exposed to  $PM_{2.5}$  concentrations higher than the  $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Mexican Guideline limit for annual average for  $PM_{2.5}$ , during the entire pregnancy (Fig. 1B) (NOM, 2014).

When the association between  $PM_{10}$  levels and DNA adducts was explored in umbilical cord cells, adduct levels were not significantly associated with  $PM_{10}$  levels  $<48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . However, when  $PM_{10}$  monthly averages were higher than  $48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , the association showed a significant linear trend (Fig. 4). We have previously observed a similar association between the levels of PAH-DNA adducts when the levels of  $PM_{10}$  were above  $45\text{--}50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in a longitudinal study in young adults (Garcia-Suastegui et al., 2011). This observation is important because the actual Guideline limit for annual average  $PM_{10}$  concentrations in the MCMA is  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Fig. 1B) (NOM, 2014).

Thus, enforced reductions of the emission limits are needed to lower the risk for PAH-DNA adducts in neonates. Volunteers in this study were non-smoking women with reduced contact to potential confounding factors. For example, we did not find changes in dietary intake of sources of PAHs between the seasons of the year and neither maternal occupational exposure to PM or PAHs.

Therefore, the effect of PAHs exposure is not expected to be due to active or passive smoking or indoor cooking using biomass fuels. These not uncommon conditions in MCMA represent an additional risk at PM levels above  $48 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for  $PM_{10}$  and above  $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for  $PM_{2.5}$ .

The amount of this type of adducts in cells is modulated not only by the levels of exposure but also by the amount absorption, metabolic bioactivation, and DNA repair capacity. It has been estimated that the half-life of PAH-DNA adducts in white blood cells is approximately 3–4 months (Jedrychowski et al., 2013; Lee et al., 2017). However, some reports suggest that the repair rate of bulky DNA adducts depends on the levels of exposure. For example, in asphalt paving workers, the formation of DNA adducts increased significantly across the labor period and was lower on Mondays and higher on Fridays. Furthermore, adduct elimination occurred over the weekend (McClellan et al., 2007). Another study showed a significant elimination of bulky DNA adducts 2 months after a psoriasis treatment with coal tar (Paleologo et al., 1992). Similarly, in our study, bulky DNA adduct levels both in umbilical cord blood and maternal leucocytes showed the strongest association with the PM levels registered during the last months of gestation (Figs. 2B, 3, and 4), which suggests either a shorter half-life and/or fast repair of DNA adducts. Therefore, in our cohort, the levels of PAH-DNA adducts reflect recent exposure to PAHs. In these residential areas of the MCMA, neonates will be most impacted by PM when the last months of gestation occur during the dry season.

When we analyzed the relationship between PM exposure and adduct levels during the second or first trimester of gestation, we found significant negative correlations for both aerodynamic particle diameters. This suggests that mothers and fetus are exposed to high levels of PM during these periods do not show high levels of adducts at the end of pregnancy. This information could help to understand the dynamics of formation and repair of adducts. It is very interesting that the correlations are positive during the third trimester of gestation (formation of adducts) and are negative in previous stages which could be due to DNA repair of damage and/or cell turn over.

In this study, we did not observe correlations between the levels of environmental PM or ozone and umbilical *8-iso-PGF*<sub>2 $\alpha$</sub>  concentrations. Similar results were obtained in a gestational study conducted in Prague, where the effect of exposure to tobacco smoke on the levels of isoprostanes was evaluated. However, no association was found between the toxic agent and biomarker levels. Only association between 15-F2t-isoprostane levels was observed between samples of maternal and umbilical plasma (Rossner Jr. et al., 2009). However, the maternal levels of *8-iso-PGF*<sub>2 $\alpha$</sub>  were associated with the concentrations of ozone during the last month of exposure. In a gestational study in the Czech Republic performed in two cities with different levels of pollution, significant associations were found

between the levels of 8-OHdG and 15-F2t-isoprostane and the levels of PM<sub>2.5</sub> in umbilical cord blood samples. Furthermore, the levels of biomarkers of oxidative stress were higher during the winter season when the air pollution is higher only in the most polluted city (Ambroz et al., 2016).

With respect to allelic risk variants, the presence of the Pro/Ser genotype for the *NQO1*\*2 polymorphism in mothers was associated with lower maternal DNA adducts compared with the wild-type genotype (Table II). This allelic variant carries a C to T substitution that results in a proline to serine amino acid change. This substitution greatly reduced enzymatic activity which could lead to decreased PAH-DNA adduct formation. Interestingly in a population-based study, people who never smoked and were heterozygous for the *NQO1*\*2 polymorphism have a decreased risk for developing lung cancer (Bock et al., 2005). We only observe differences in heterozygous for the *NQO1*\*2 genotype, the lack of significance in homozygous Ser/Ser condition it could be due to the small sample size. Thus, our results could be affected by the limited number of individuals carrying the mutant allelic variant.

The induction in the placenta of xenobiotic metabolism enzymes like CYP1A1 has been reported in gestational tobacco smoke exposures (Suter et al., 2010). In the same way, other fetal tissues such as lung, liver, adrenal gland, and brain, express CYP1A1 and CYP1B1 (Hakkola et al., 1997). The presence of those metabolizing enzymes in fetal tissues could suggest the participation of the neonate metabolism in adduct formation. In this study, the presence of at least one mutant allele of *CYP1B1* in the fetus genotype was associated with higher levels of cord blood DNA adducts (Tables III and IV). A multiple correlation analysis showed a significant association between PM<sub>2.5</sub> emissions and *CYP1B1*\*3 polymorphism and adduct levels in umbilical cord blood cells, suggesting that PAHs were metabolized in fetal tissues, such as the placenta. At the same time, this analysis showed that the presence of at least one mutant allele in the maternal genome was significantly and negatively associated with the levels of fetal adducts. Probably, the increased activity of maternal *CYP1B1* allows a more rapid elimination of circulating PAHs which is reflected in lower levels of adducts in the fetus (Table III). On the contrary, maternal *CYP1B1* variants were not associated with adduct levels in maternal DNA. However, the maternal genotype *CYP1B1*\*3 Leu/Leu and the neonatal Leu/Val were associated with higher levels of adducts in umbilical cord blood when maternal and fetal *CYP1B1* genotype combinations were explored using a cumulative empirical distribution of neonate cord blood DNA adduct levels (Fig. 5). These results suggest an active fetal participation in xenobiotic metabolism.

In conclusion, 60% of neonates cord blood DNA samples showed significantly higher levels of adducts than their mothers. Maternal *NQO1*\*2 polymorphism was associated with lower maternal DNA adducts and *CYP1B1*\*3 Leu/Leu

maternal genotype and Leu/Val neonatal variants were associated with higher levels of adducts in fetal cord blood. The formation of adducts was significantly associated with exposures during the last trimester of pregnancy. Exposure during the last trimester, to fine particles above the current annual average limit of 12 µg/m<sup>3</sup> (Figs. 1 and 3) (NOM, 2014) showed a linear dose-response trend with the formation of bulky DNA adducts in both maternal and cord blood leucocytes. In the same gestational period, the presence of adducts in neonate cord blood followed a linear trend when PM<sub>10</sub> monthly average levels were above 48.58 µg/m<sup>3</sup> which are clearly above the current annual average limit of 40 µg/m<sup>3</sup> (Fig. 4) (NOM, 2014). As shown in Figure 1 the levels of PM<sub>10</sub> concentrations observed during the dry season months throughout our sampling period were higher than 48.58 µg/m<sup>3</sup>. These observations should enforce tighter regulations in the MCMA, to protect neonates from exposure to these toxic compounds, especially during the dry season where climate conditions delay the removal of air pollutants.

There is strong epidemiological evidence that PM, PAHs, and ozone exposure during gestation increase the risk to develop respiratory diseases, lung growth deficits, brain structural alterations and neurodevelopment disorders during childhood as well as heart disease, stroke, and cancer in adulthood (Landrigan and Fuller, 2016; Guxens et al., 2018). These conditions not only reduce the quality of life of the susceptible individuals but also increase health care utilization and costs. Preventive measures should include restriction of vehicle circulation in residential areas, especially during the dry season, and relocation of industries with the most PM and PAHs concentrations in the MCMA.

The results of the study were limited by the sample size. A larger sample size could have uncovered significant impact on neonate size and weight or the participation of *GSTM1*\*0 and *NQO1*\*2 polymorphisms in the formation of DNA bulky adducts. Here, we did not consider the presence of PAHs in atmospheric gas phase or indoor exposure, although through the questionnaires we asked for tobacco smoke exposure, indoor gas use, and occupational exposure to PAHs. Also, we cannot exclude any residual confounding effects from other environmental variables, such as living close to highways. It would be significant to be able to explore other biomarkers that show effects in early stages of pregnancy or biomarkers that indicate long-term effects with impact on the childhood of the individuals exposed *in utero* in MCMA, such as those involved in neonatal epigenetic reprogramming (Perera et al., 2009a; Tang et al., 2012; Herbstman et al., 2013; Lee et al., 2017). Additionally, neonates born in other sites of MCMA could show different molecular effects due to the differential composition and distribution of PM and ozone (Gutierrez-Castillo et al., 2006; Roubicek et al., 2007; SEDEMA, 2008, 2010).

## ACKNOWLEDGMENTS

For this work, Jorge Alfonso Maciel-Ruiz, a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), received fellowship 330134 from CONACYT. The authors would like to thank Renato León Rodríguez, Ph.D., and Luz María Chiu Velázquez, Biol., for their technical assistance. This work was funded by the following grants: PAPIIT IN208914, CONACYT 219887, Programa Salud y Ambiente y Red SAI CONACYT 293450.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MGVM and MEG designed the study and applied for Research Ethics Board approval, RRM recruited the patients and collected the data. CLR, JAMR, and PP performed the DNA adduct assays, genotyping and collected the air pollution data, analyzed the data, and prepared draft figures and tables. RLA and GRP determined plasma isoprostanes. TG helped with the statistical analysis. JAMR prepared the manuscript draft with important intellectual input from POW, RM, AS, and MEG. All authors approved the final manuscript.

## DECLARATIONS OF INTEREST

None.

## REFERENCES

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. 1996. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 107:229–233.
- Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, Totoki Y, Fujimoto A, Nakagawa H, Shibata T, et al. 2016. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 354:618–622.
- Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, Rosas I, Rosales SP, Osornio-Vargas AR. 2002. Biologic effects induced in vitro by PM<sub>10</sub> from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect* 110:715–720.
- Ambroz A, Vlkova V, Rossner P Jr, Rossnerova A, Svecova V, Milcova A, Pulkrabova J, Hajslova J, Veleminsky M Jr, Solansky I, Sram RJ. 2016. Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. *Int J Hyg Environ Health* 219:545–556.
- Bastani NE, Gundersen TE, Blomhoff R. 2009. Determination of 8-epi PGF(2alpha) concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23:2885–2890.
- Bell ML, Ebusu K, Belanger K. 2007. Ambient air pollution and low birth weight in Connecticut and Massachusetts. *Environ Health Perspect* 115:1118–1124.
- Binkova B, Dobias L, Wolff T, Sram RJ. 1994. 32P-postlabeling analysis of DNA adducts in tissues of rats exposed to coke-oven emissions. *Mutat Res* 307:355–363.
- Bock CH, Wenzlaff AS, Cote ML, Land SJ, Schwartz AG. 2005. NQO1 T allele associated with decreased risk of later age at diagnosis lung cancer among never smokers: Results from a population-based study. *Carcinogenesis* 26:381–386.
- Brauer M, Lencar C, Tamburic L, Koehoorn M, Demers P, Karr C. 2008. A cohort study of traffic-related air pollution impacts on birth outcomes. *Environ Health Perspect* 116:680–686.
- Bromberg PA. 2016. Mechanisms of the acute effects of inhaled ozone in humans. *Biochim Biophys Acta* 1860:2771–2781.
- Brunekreef B, Holgate ST. 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360:1233–1242.
- Calderon-Garciduenas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Valencia-Salazar G, Chung CJ, Rodriguez-Alcaraz A, Paredes R, Variakojis D, Villarreal-Calderon A, Flores-Camacho L, et al. 2003. Respiratory damage in children exposed to urban pollution. *Pediatr Pulmonol* 36:148–161.
- Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Valencia-Salazar G, Mora-Tiscareno A, Garcia R, Osnaya N, Villarreal-Calderon A, Devlin RB, Van Dyke T. 2001. Nasal biopsies of children exposed to air pollutants. *Toxicol Pathol* 29:558–564.
- Castano-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. 2004. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med* 61:e12–e112.
- Chafer-Pericas C, Rahkonen L, Sanchez-Illana A, Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Cernada M, Cubells E, Nunez-Ramiro A, Andersson S, Vento M, et al. 2015. Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry determination of lipid peroxidation biomarkers in newborn serum samples. *Anal Chim Acta* 886:214–220.
- Chen C, Arjomandi M, Balmes J, Tager I, Holland N. 2007. Effects of chronic and acute ozone exposure on lipid peroxidation and antioxidant capacity in healthy young adults. *Environ Health Perspect* 115:1732–1737.
- Choi H, Rauh V, Garfinkel R, Tu Y, Perera FP. 2008. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect* 116:658–665.
- Choi H, Wang L, Lin X, Spengler JD, Perera FP. 2012. Fetal window of vulnerability to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on proportional intrauterine growth restriction. *PLoS One* 7:e35464.
- Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori M, Folesani G, Mozzoni P, Cavazzini S, Bergamaschi E, Rossi L, Mutti A. 2002. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 134:219–225.
- Cracowski JL, Durand T, Bessard G. 2002. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: Physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 23:360–366.
- De Vizcaya-Ruiz A, Gutiérrez-Castillo ME, Uribe-Ramirez M, Cebrián ME, Mugica-Alvarez V, Sepúlveda J, Rosas I, Salinas E, García-Cuellar C, Martínez F, et al. 2006. Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. *Atmospheric Environment* 40(Suppl 2):583–592.
- Dockery DW, Pope CA 3rd. 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 15:107–132.
- Dupuy A, Le Faouder P, Vigor C, Oger C, Galano JM, Dray C, Lee JC, Valet P, Gladine C, Durand T, et al. 2016. Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Anal Chim Acta* 921:46–58.
- Ebusu K, Berman JD, Bell ML. 2016. Exposure to coarse particulate matter during gestation and birth weight in the U.S. *Environ Int* 94:519–524.
- Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Ioyama K, Yabe H, Mizutani S, Greaves M. 2005. The association of a

- distinctive allele of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 90:1511–1515.
- U.S. EPA. 2005. Supplemental guidance for assessing cancer susceptibility from early-life exposure to carcinogens. Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/risk/supplemental-guidance-assessing-susceptibility-early-life-exposure-carcinogens>
- García-Suastegui WA, Huerta-Chagoya A, Carrasco-Colin KL, Pratt MM, John K, Petrosyan P, Rubio J, Poirier MC, Gonsebatt ME. 2011. Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City. *Mutagenesis* 26:385–391.
- Godschalk RW, Van Schooten FJ, Bartsch H. 2003. A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. *J Biochem Mol Biol* 36:1–11.
- Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrian-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeno M, Ostrosky-Wegman P. 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 47:199–211.
- Guxens M, Lubczynska MJ, Muetzel RL, Dalmau-Bueno A, Jaddoe VWW, Hoek G, van der Lugt A, Verhulst FC, White T, Brunekreef B, et al. 2018. Air pollution exposure during fetal life, brain morphology, and cognitive function in school-age children. *Biol Psychiatry* 84(4), 295–303.
- Ha S, Hu H, Roussos-Ross D, Haidong K, Roth J, Xu X. 2014. The effects of air pollution on adverse birth outcomes. *Environ Res* 134:198–204.
- Hakkola J, Pasanen M, Pelkonen O, Hukkanen J, Evisalmi S, Anttila S, Rane A, Mantyla M, Purkunen R, Saarikoski S, et al. 1997. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18:391–397.
- Herbstman JB, Tang D, Zhu D, Qu L, Sjodin A, Li Z, Camann D, Perera FP. 2012. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood. *Environ Health Perspect* 120:733–738.
- Herbstman JB, Wang S, Perera FP, Lederman SA, Vishnevetsky J, Rundle AG, Hoepner LA, Qu L, Tang D. 2013. Predictors and consequences of global DNA methylation in cord blood and at three years. *PLoS One* 8:e72824.
- Hill CE, Wickliffe JK, Guerin AT, Kinslow CJ, Wolfe KJ, Ammenheuser MM, Abdel-Rahman SZ. 2007. The L84F polymorphism in the O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT) gene is associated with increased hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mutant frequency in lymphocytes of tobacco smokers. *Pharmacogenet Genomics* 17:743–753.
- IARC. 2013. *Air Pollution and Cancer*, Vol. 161. Lyon, France: IARC, WHO.
- IARC. 2015. *Outdoor Air Pollution*, Vol. 109. Lyon, France: IARC, WHO.
- IARC. 2010. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks in Humans. Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and some Related Exposures*, Vol. 92. Lyon, France: IARC.
- Janssen BG, Gyselaers W, Byun HM, Roels HA, Cuypers A, Baccarelli AA, Nawrot TS. 2017. Placental mitochondrial DNA and CYP1A1 gene methylation as molecular signatures for tobacco smoke exposure in pregnant women and the relevance for birth weight. *J Transl Med* 15:5.
- Jedrychowski WA, Perera FP, Tang D, Rauh V, Majewska R, Mroz E, Flak E, Stigter L, Spengler J, Camann D, Jacek R. 2013. The relationship between prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA adducts in cord blood. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 23:371–377.
- Karttunen V, Myllynen P, Prochazka G, Pelkonen O, Segerback D, Vahakangas K. 2010. Placental transfer and DNA binding of benzo[a]pyrene in human placental perfusion. *Toxicol Lett* 197: 75–81.
- Landrigan PJ, Fuller R. 2016. Pollution, health and development: The need for a new paradigm. *Rev Environ Health* 31:121–124.
- Larose J, Julien P, Bilodeau JF. 2013. Analysis of F2-isoprostanes in plasma of pregnant women by HPLC-MS/MS using a column packed with core-shell particles. *J Lipid Res* 54:1505–1511.
- Lee J, Kalia V, Perera F, Herbstman J, Li T, Nie J, Qu LR, Yu J, Tang D. 2017. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, LINE1 methylation and child development in a Chinese cohort. *Environ Int* 99:315–320.
- McClellan MD, Wiencke JK, Kelsey KT, Varkonyi A, Ngo L, Eisen EA, Herrick RF. 2007. DNA adducts among asphalt paving workers. *Ann Occup Hyg* 51:27–34.
- Molina E, Perez-Morales R, Rubio J, Petrosyan P, Cadena LH, Arlt VM, Phillips DH, Gonsebatt ME. 2013. The GSTM1null (deletion) and MGMT84 rs12917 (Phe/Phe) haplotype are associated with bulky DNA adduct levels in human leukocytes. *Mutat Res* 758:62–68.
- Mugica V, Hernandez S, Torres M, Garcia R. 2010. Seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure levels in Mexico City. *J Air Waste Manag Assoc* 60:548–555.
- Mugica V, Mugica F, Torres M, Figueroa J. 2008. PM<sub>2.5</sub> emission elemental composition from diverse combustion sources in the metropolitan area of Mexico City. *Sci World J* 8:275–286.
- Mugica V, Ortiz E, Molina L, Vizcaya-Ruiz AD, Nebot A, Quintana R, Aguilar J, Alcántara E. 2009. PM composition and source reconciliation in Mexico City. *Atmos Environ* 43:5068–5074.
- Neubert D, Tapken S. 1988. Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. *Arch Toxicol* 62:236–239.
- NOM. 2014. In: Gobernación SD, editor. NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente y criterios para su evaluación. Mexico: Diario Oficial de la Federación.
- Padula AM, Noth EM, Hammond SK, Lurmann FW, Yang W, Tager IB, Shaw GM. 2014. Exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy and risk of preterm birth. *Environ Res* 135:221–226.
- Paleologo M, van Schooten FJ, Pavanello S, Kriek E, Zordan M, Clonfero E, Bezze C, Levis AG. 1992. Detection of benzo[a]pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in white blood cells of psoriatic patients treated with coal tar. *Mutat Res* 281:11–16.
- Pedersen M, Giorgis-Allemand L, Bernard C, Aguilera I, Andersen AM, Ballester F, Beelen RM, Chatzi L, Cirach M, Danileviciute A, et al. 2013. Ambient air pollution and low birthweight: A European cohort study (ESCAPE). *Lancet Respir Med* 1:695–704.
- Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, Ho SM. 2009a. Relation of DNA methylation of 5'-CpG Island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One* 4:e4488.
- Perera F, Weiland K, Neidell M, Wang S. 2014. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and IQ: Estimated benefit of pollution reduction. *J Public Health Policy* 35:327–336.
- Perera FP, Li Z, Whyatt R, Hoepner L, Wang S, Camann D, Rauh V. 2009b. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics* 124:e195–e202.
- Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tsai WY, Tang D, Diaz D, Hoepner L, Barr D, Tu YH, Camann D, Kinney P. 2006. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ Health Perspect* 114:1287–1292.
- Perera FP, Tang D, Rauh V, Lester K, Tsai WY, Tu YH, Weiss L, Hoepner L, King J, Del Priore G, et al. 2005a. Relationships among polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, proximity





- to the world trade center, and effects on fetal growth. *Environ Health Perspect* 113:1062–1067.
- Perera FP, Tang D, Whyatt R, Lederer SA, Jedrychowski W. 2005b. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from northern Manhattan, the world trade center area, Poland, and China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:709–714.
- Perera FP, Wang S, Vishnevetsky J, Zhang B, Cole KJ, Tang D, Rauh V, Phillips DH. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons-aromatic DNA adducts in cord blood and behavior scores in New York city children. *Environ Health Perspect* 119:1176–1181.
- Peterson BS, Rauh VA, Bansal R, Hao X, Toth Z, Nati G, Walsh K, Miller RL, Arias F, Semanek D, Perera F. 2015. Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *JAMA Psychiatry* 72:531–540.
- Phillips DH. 2005a. DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutat Res* 577:284–292.
- Phillips DH. 2005b. The formation of DNA adducts. Edited by Malcolm R. Alson, Chapter 21, In: *The Cancer Handbook*, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
- Phillips DH, Arlt VM. 2007. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts. *Nat Protoc* 2:2772–2781.
- Poirier MC. 1997. DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. *Environ Health Perspect* 105(Suppl 4):907–912.
- Poirier MC. 2004. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer* 4:630–637.
- Rojas-Martinez R, Perez-Padilla R, Olaiz-Fernandez G, Mendoza-Alvarado L, Moreno-Macias H, Fortoul T, McDonnell W, Loomis D, Romieu I. 2007. Lung function growth in children with long-term exposure to air pollutants in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med* 176:377–384.
- Romieu I, Ramirez-Aguilar M, Sienna-Monge JJ, Moreno-Macias H, del Rio-Navarro BE, David G, Marzec J, Hernandez-Avila M, London S. 2006. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. *Eur Respir J* 28:953–959.
- Rossner P Jr, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Topinka J, Balascek I, Sram RJ. 2009. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part II. Oxidative damage. *Mutat Res* 669:20–26.
- Roubicek DA, Gutierrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrian-Garcia ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res* 631:9–15.
- Salcido-Neyoy ME, Sanchez-Perez Y, Osornio-Vargas AR, Gonsebatt ME, Melendez-Zajgla J, Morales-Barcenas R, Petrosyan P, Molina-Servin ED, Vega E, Manzano-Leon N, et al. 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM<sub>10</sub>) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Pollut* 203:175–182.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. E3–E4.
- Sanchez-Perez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Morales-Barcenas R, Gutierrez-Ruiz C, Vazquez-Lopez I, Garcia-Cuellar CM. 2009. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM<sub>10</sub>) of urban air pollutants. *Cancer Lett* 278:192–200.
- SEDEMA. 2008. Secretaría de Medio Ambiente. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente de la Ciudad de México. p. 149.
- SEDEMA. 2010. Secretaría de Medio Ambiente. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente de la Ciudad de México. p. 108.
- Sexton K, Salinas JJ, McDonald TJ, Gowen RM, Miller RP, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons in maternal and umbilical cord blood from pregnant Hispanic women living in Brownsville, Texas. *Int J Environ Res Public Health* 8:3365–3379.
- Sram RJ, Binkova B, Dejmek J, Chvatalova I, Solansky I, Topinka J. 2006. Association of DNA adducts and genotypes with birth weight. *Mutat Res* 608:121–128.
- Srivastava VK, Chauhan SS, Srivastava PK, Kumar V, Misra UK. 1986. Fetal translocation and metabolism of PAH obtained from coal fly ash given intratracheally to pregnant rats. *J Toxicol Environ Health* 18:459–469.
- Stanek LW, Brown JS, Stanek J, Gift J, Costa DL. 2011. Air pollution toxicology—A brief review of the role of the science in shaping the current understanding of air pollution health risks. *Toxicol Sci* 120(Suppl 1):S8–S27.
- Suh YJ, Ha EH, Park H, Kim YJ, Kim H, Hong YC. 2008. GSTM1 polymorphism along with PM<sub>10</sub> exposure contributes to the risk of pre-term delivery. *Mutat Res* 656:62–67.
- Suter M, Abramovici A, Showalter L, Hu M, Shope CD, Varner M, Aagaard-Tillery K. 2010. In utero tobacco exposure epigenetically modifies placental CYP1A1 expression. *Metabolism* 59:1481–1490.
- Tang D, Li TY, Liu JJ, Chen YH, Qu L, Perera F. 2006. PAH-DNA adducts in cord blood and fetal and child development in a Chinese cohort. *Environ Health Perspect* 114:1297–1300.
- Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, Tsai WY, Ma J, Cole KJ, She MN, et al. 2001. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 61:6708–6712.
- Tang WY, Levin L, Talaska G, Cheung YY, Herbstman J, Tang D, Miller RL, Perera F, Ho SM. 2012. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and 5'-CpG methylation of interferon-gamma in cord white blood cells. *Environ Health Perspect* 120:1195–1200.
- Topinka J, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Rossner P Jr, Balascek I, Sram RJ. 2009. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: Bulky DNA adducts. *Mutat Res* 669:13–19.
- van Berlo D, Hullmann M, Schins RP. 2012. Toxicology of ambient particulate matter. *EXS* 101:165–217.
- Vinikoor-Imler LC, Davis JA, Meyer RE, Messer LC, Luben TJ. 2014. Associations between prenatal exposure to air pollution, small for gestational age, and term low birthweight in a state-wide birth cohort. *Environ Res* 132:132–139.
- Vinikoor-Imler LC, Stewart TG, Luben TJ, Davis JA, Langlois PH. 2015. An exploratory analysis of the relationship between ambient ozone and particulate matter concentrations during early pregnancy and selected birth defects in Texas. *Environ Pollut* 202:1–6.
- Watanabe J, Shimada T, Gillam EM, Ikuta T, Suemasu K, Higashi Y, Gotoh O, Kawajiri K. 2000. Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer. *Pharmacogenetics* 10:25–33.
- WHO. 2014a. 7 Million Premature Deaths Annually Linked to Air Pollution. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2014b. Preventing Diarrhoea Through Better Water, Sanitation and Hygiene: Exposures and Impacts in Low- and Middle-Income Countries. Geneva: World Health Organization.
- Xue W, Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharmacol* 206:73–93.

Accepted by—  
N. Holland

## Research Article

## Particulate Matter–Associated Micronuclei Frequencies in Maternal and Cord Blood Lymphocytes

Montserrat Sordo,<sup>1</sup> Jorge Alfonso Maciel-Ruiz,<sup>1</sup> Ana María Salazar,<sup>1</sup> Rogelio Robles-Morales,<sup>2</sup> María Guadalupe Velaz-Martínez,<sup>2</sup> Jorge H. Pacheco-Limón,<sup>1</sup> Andrés E. Nepomuceno-Hernández,<sup>3</sup> Rodrigo Ayala-Yáñez,<sup>3</sup> María E. Gonsebatt ,<sup>1</sup> and Patricia Ostrosky-Wegman \*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>2</sup>División de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco-Obstetricia 3 “Dr. Victor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez”, Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup>Centro de Investigación Materno Infantil del Grupo de Estudios al Nacimiento, Asociación Hispano Mexicana, Ciudad de México, Mexico

Studies associate particulate matter (PM) exposure with pulmonary, cardiovascular, and neurologic diseases. Elevated levels of coarse (PM10) and fine (PM2.5) PM have been reported in the Mexico City metropolitan area during the last two decades. There is limited information if these conditions affect newborns. We associated maternal exposure to PM reported by the monitoring stations considering the place of residence of each participant with the presence of genotoxic damage (cytome analysis) in maternal and umbilical cord blood (UCB) lymphocytes. Eighty-four healthy women in their last quarter of pregnancy met the inclusion criteria. Each volunteer exposure was estimated according to the average PM2.5 and PM10 levels during the last month of gestation. The micronuclei (MN) frequencies in UCB lymphocyte cultures ranged between 0 and 9. They also showed

lower cell proliferation indexes than their mothers. There was a strong correlation between the maternal and the UCB MN frequency ( $\rho = 0.3767$ ,  $P = 0.0002$ ). Multiple regression analysis including PM10 and PM2.5 levels, maternal age, and occupation, showed a significant and positive association between UCB MN frequency and PM2.5. A statistically significant increase in the MN frequency in both maternal and UCB lymphocytes was observed in samples obtained during the dry season (higher PM levels) as compared with the MN frequency in blood samples obtained during the rainy season (lower PM levels). These results suggest that PM, mainly PM2.5, can cross the placenta causing DNA damage in fetal cells which may increase the potential for diseases during childhood or adult life. *Environ. Mol. Mutagen.* 00:000–000, 2019. © 2019 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** micronuclei; human lymphocytes; cord blood; fine particulate matter; transplacental

### INTRODUCTION

Air pollution is a major environmental health risk. According to the World Health Organization (WHO), 9 of every 10 people in the world breathe polluted air, which causes seven million deaths annually from causes directly related to pollution (WHO, 2016). In addition, the WHO

(2016) estimates that air pollution in cities and rural areas around the world causes 4.2 million premature deaths each year. Ninety-one percent of these premature deaths occur in low- and middle-income countries. Approximately 58% of premature deaths related to air pollution were due to ischemic heart disease and stroke, while 18% of deaths were

Grant sponsor: Fundación Miguel Alemán, A.C.

Grant sponsor: PAPIIT-UNAM; Grant number: IN208914.

Grant sponsor: Red de Salud Ambiental Infantil, CONACYT; Grant number: 293450.

Grant sponsor: CONACYT; Grant numbers: 219887; 330134.

Grant sponsor: Programa Institucional Salud y Ambiente del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

Montserrat Sordo and Jorge Alfonso Maciel-Ruiz contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Patricia Ostrosky-Wegman, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. E-mail: ostrosky@unam.mx

Received 5 November 2018; provisionally accepted 9 January 2019; and in final form 25 January 2019

DOI: 10.1002/em.22275

Published online 00 Month 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

due to lung disease or obstructive chronic and acute respiratory infections, and 6% of deaths were due to lung cancer (WHO, 2018). An assessment carried out by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2016) determined that outdoor air pollution is carcinogenic to humans and that the contaminated air particles are closely linked to the increased incidence of cancer, especially lung cancer. A relationship between outdoor air pollution and an increase in urinary tract and bladder cancer has also been observed (WHO, 2018). The Mexico City metropolitan area (MCMA) is a complex urban area with approximately 22 million inhabitants, located within a valley of more than 3,500 km<sup>2</sup> at an altitude of 2,200 m above sea level, and it is surrounded by higher mountains. Due to the elevated levels of air pollution observed during the 1990s, a series of regulatory measures to reduce emissions have been implemented. However, according to the annual inventory reports of the MCMA Department of the Environment, in 2016 (SEDEMA, 2016), there were more than 5.5 million registered vehicles in the MCMA: 93% used gasoline, 4.5% used diesel, and 0.5% used gas derivatives. Pollution is aggravated because combustion processes are less efficient at higher altitudes and because the region receives intense solar radiation, which could facilitate photochemical reactions in the atmosphere (SMA-GDF, 2012). One of the agents present in air pollution that has received more attention in recent years is particulate matter (PM), which is considered by IARC as a human carcinogen (IARC, 2016). PM refers to all compounds present in the atmosphere that are not gases and are suspended in the air as droplets, solid particles, or their mixtures (Stanek et al., 2011). Airborne PM is a complex mixture of particles that vary not only in size and morphology but also in their chemical, physical, and biological composition. With respect to the size of PM, an important fraction of PM is referred to as PM<sub>10</sub>, composed of particles <10 μm. PM<sub>10</sub> is generally subdivided into fine particles (<2.5 μm; PM<sub>2.5</sub>) and ultrafine particles (<0.1 μm) that are both included in PM<sub>10</sub> (US EPA, 2004). Forty-three monitoring stations monitor PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO, and ozone emissions in the MCMA in real time, generating an hourly air quality index ([www.aire.cdmx.gob.mx/www.sedema.cdmx.gob.mx](http://www.aire.cdmx.gob.mx/www.sedema.cdmx.gob.mx)).

Although the hazards of air pollution may be less severe than other harmful factors, its permanent and ubiquitous presence make it an important factor to induce DNA damage not only in adult and children but also in pregnant women and the fetuses. Exposure to air pollution during specific periods during pregnancy may affect the development and maturation of a fetus since germ and fetal cells have faster rates of replication, differentiation, and higher sensitivity to surrounding signals. External factors that interfere with this progress may result in impaired organ function or increased susceptibility to disease in later life (Kajekar, 2007; Proietti et al., 2013).

Previously published data described the *in vitro* and *in vivo* effects of air pollution. However, there is limited information about air pollution and its genotoxic effects on newborns. Milosevic-Djordjevic et al. (2005) studied the effects of the extensive environmental pollution caused by air strikes on the “Zastava” complex, Serbia. They observed high levels of micronuclei (MN) in newborns born 12 months after the bombing, but they found no noticeable effects in those born 18 months after the event. Pedersen et al. (2009) determined the genotoxic effects of air pollution using bulky DNA adducts and MN, finding an increase in both parameters in cord blood after maternal exposure to traffic-related air pollution in Copenhagen.

In this study, we investigated the association between the presence of MN in lymphocyte cultures from maternal and umbilical cord blood (UCB) samples and the levels of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> exposure, considering the place of residence of each participant within the MCMA.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Histopaque 1077, RPMI-1640 medium, phytohemagglutinin-M (PHA), cytochalasin B (Cyt B), L-glutamine, and nonessential amino acid solution were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Methanol and glacial acetic acid were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). The Hemacolor staining kit was acquired from Merck (Kenilworth, NJ).

### Study Population

Two hundred forty women in their last quarter of pregnancy were invited to participate in this study. The objectives of the study were explained to the volunteers who signed an informed consent form and completed a questionnaire with information regarding their age, parity, residence area, occupation, general health condition, medications, smoking habits, and exposure to genotoxic agents, such as X-rays. Only 110 women met the inclusion criteria. Exclusion criteria included living near gasoline stations, paint and plastic factories or solvents, active smoking during pregnancy, occupational exposure to PAHs, women with premature rupture of membranes by an infectious process, and any illness during the last 3 months of pregnancy. This study considered the blood samples from 84 binomials mother–newborn whose lymphocytes cultures were successful. The clinical and reproductive history, pesticide exposure, and smoking status were evaluated with a structured questionnaire. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. After birth, blood samples were collected immediately from each newborn umbilical cord, and from each mother arm vein into tubes containing heparin.

### Cotinine Determination

To discard active tabaquism in our cohorts, we perform a semiquantitative test to determine the cotinine levels in urine using a One Step Cotinine Test Device (Certum Diagnostics, USA), according to the manufacturer's protocol. Cotinine samples were deemed positive if the cotinine concentration in the urine was >200 ng/mL. Cotinine-positive individuals were excluded from the study.

### Environmental Monitoring

The exposure for each volunteer was calculated from the Automatic Atmospheric Monitoring Network (RAMA, for its Spanish initials). According to the date of delivery, the average exposure levels of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> of the last month of gestation were estimated. This information was obtained from the 24-h real-time data from the monitoring stations closest to the home of the volunteers.

### Human Lymphocyte Cell Culture

White cells were isolated from approximately 3 mL of heparinized blood using Ficoll gradient centrifugation. Approximately one million cells were seeded into 5 mL of RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10%), L-glutamine 200 mM (1%), and nonessential amino acids (1%). Phytohemagglutinin B (PHA; 30 µg/mL) was added to induce proliferation. The cells were incubated at 37°C. Cytochalasin B (6 µg/mL) was added to the culture 44 h after the beginning of the incubation. At 72 h, the cell suspensions were fixed with cold methanol-acetic acid solution (3:1), and then the cells were centrifuged at 1,200 rpm for 10 min. This process was repeated until a clean button was obtained. The cells were carefully dropped onto precooled glass slides to avoid membrane destruction. Dry slides were stained with Hemacolor dye for microscopic evaluation. All slides were coded.

### Cytostaticity

The lymphocyte proliferation kinetics was analyzed by the nuclear division index (NDI) according to the method described by Eastmond and Tucker (1989). The cells were scored ( $n = 200$ ) to determine the frequency of mononucleated (M), binucleated (BN), and polynucleated (P) cells, corresponding to 0, 1, and 2 or more *in vitro* cell divisions, respectively. Cytostatic activity was determined by the following equation:  $NDI = [M + 2(BN) + 3(P)]/N$ , where  $N$  is the total number of cells scored.

### Cytokinesis-Blocked Micronuclei Assay and Cytome Parameters

The cytokinesis-blocked micronuclei (CBMN) assay, a worldwide validated method, was used to analyze the cytostatic and genotoxic effects. Cytome evaluation was conducted according to the criteria established by Fenech et al. (2003) in human lymphocytes, including the parameters of MN, nuclear budding (Bud), nucleoplasmic bridges (NPBs), and apoptotic and necrotic cells. The slides were read at 100× magnification using an optical microscope Olympus BH2. The MN, Bud, NPB, apoptotic and necrotic cells were expressed as the relative frequency in 1,000 BN counted cells.

### Statistical Analysis

The mean, standard deviation, and percentages of subjects were used for the description of the demographic characteristics of the studied population. The median and interquartile range were estimated for biomarker analysis. To investigate the associations between the levels of MN, maternal age, and other cytome parameters and PM<sub>2.5</sub> or PM<sub>10</sub> concentrations, we used Spearman's correlation analyses. Finally, to investigate the influence of factors such as maternal age and occupation in MN frequency, multiple regression analysis was performed. Logarithmic transformations were used for maternal and fetal MN frequencies to correct for normality. To explore the effect of seasons on MN frequency, we performed a Mann-Whitney test. In all statistical tests,  $P < 0.05$  was considered significant. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 7.0 and SigmaPlot 12.5.

## RESULTS

### General Demographics of the Study Population

This study was focused on determining the genotoxic effects of air pollution in newborns. Table I shows the demographic characteristics of the study population. From 240 pregnant women invited to participate, 110 met the requirements and were enrolled in the study. Maternal and UCB samples were obtained at the time of birth and were transported to a laboratory for processing. Eighty-four maternal-UCB sample pairs were completed, which were used for the development of this study. The average age of the mothers was of  $27.34 \pm 5.45$  years. The average gestational age was  $39.16 \pm 1.22$  weeks, indicating the fetus was at term. The neonate sex was similar for males and females ( $n = 44$  and  $n = 38$ , respectively), with normal birth weight ( $3,188 \pm 398.4$  g) and birth length ( $50.40 \pm 1.74$  cm). Forty-seven percent reported having worked during pregnancy, and a similar percentage stayed at home. Approximately 17% of the volunteers reported smoking before the beginning of pregnancy. Mothers whose cotinine urine values were higher than 200 ng/mL were excluded.

### Micronuclei Frequency and Cytome Parameters

The CBMN assay was used because it allows the detection of chromosomal breaks or whole chromosomes, which usually result in permanent damage to the cell. Additionally, other types of DNA damage were analyzed (Buds, NPB) and apoptosis and necrosis. Descriptive data of the MN frequency and cytome parameters evaluated in this

**TABLE I. Demographic Characteristics of the Study Population**

Number of volunteers that complied with inclusion criteria	
Binomials completed	84
Neonate gestational age (weeks; mean $\pm$ SD)	39.16 $\pm$ 1.22
Neonate sex n (%)	
Male	44 (52.39)
Female	38 (45.23)
Missing data	2 (2.38)
Birth weight (g; mean $\pm$ SD)	3188 $\pm$ 398.4
Birth length (cm; mean $\pm$ SD)	50.40 $\pm$ 1.74
Maternal age (years; mean $\pm$ SD)	27.34 $\pm$ 5.45
Maternal occupation/exposure n (%)	
Housewife	40 (47.62)
Employed	40 (47.62)
Occupational exposure to PAHs	0 (0)
Non reported	4 (4.76)
Smoking prior to pregnancy n (%)	
Yes	15 (17.86)
No	66 (78.57)
Non reported	3 (3.57)
Particulate matter exposure (µg/m <sup>3</sup> ; median $\pm$ IQR)	
PM <sub>2.5</sub>	23 (16.69, 26.55)
PM <sub>10</sub>	42.27 (31.87, 55.76)

SD = standard deviation; IQR = interquartile range.

study showed differences between mothers and newborns (Table II). The levels of MN found in fetal lymphocytes were higher (range 0–9; Table IIA) than those observed in a previous study in newborns (range 0–2) (Levario-Carrillo et al., 2005). Regarding to the cytochrome parameters evaluated in this study, particularly, no NPBs were observed. Interestingly, the cord blood cultures had lower percentages of binucleated cells than their mothers. A significant correlation between the levels of MN in maternal and UCB samples were found ( $\rho = 0.3767$ ,  $P = 0.0002$ ; Table IIB). A statistically significant increase in the MN frequency of the mothers was observed as the maternal age was increased ( $\rho = 0.3353$ ,  $P = 0.0004$ ). Evidence has demonstrated the association of age on the accumulation of MN in human lymphocytes (Fenech and Morley, 1985; Peace and Succop, 1999). However, no statistically significant correlation was found between the maternal age and MN frequency in cord blood (Table IIB). An association analyses between MN frequencies and cytochrome parameters were tested against the corresponding average particle levels during the last month of gestation, both in mothers and newborns (Table IIC). Higher levels of exposure to PM<sub>2.5</sub> were associated with higher levels of MN in both mothers and newborns ( $\rho = 0.2119$ ,

$P = 0.0265$  and  $\rho = 0.1826$ ,  $P = 0.0482$ , respectively). A similar positive association was observed between the MN frequencies in UCB with PM<sub>10</sub> exposure during the last month ( $\rho = 0.1908$ ,  $P = 0.0411$ ) and marginal association in mothers ( $\rho = 0.1797$ ,  $P = 0.0510$ ). These results suggest that maternal exposure to PM induces genotoxic damage in newborns. Exposure to PM was not associated to significant changes in maternal or fetal cell proliferation as measured with the presence of binucleated cells. However, in UCB marginal negative correlations were observed between the percentage of binucleated cells and PM levels ( $\rho = -0.1591$ ,  $P = 0.0742$ ;  $\rho = -0.1791$ ,  $P = 0.0515$ ; Table IIC) for PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>, respectively. This tendency could indicate that the cell proliferation of newborns is affected by maternal exposure to PM. Additionally, a significant increase in the number of apoptotic cells in cord blood was observed to be associated with PM<sub>2.5</sub> ( $\rho = 0.204$ ,  $P = 0.0313$ ; Table IIC).

#### Effect of PM on the MN Frequency Adjusted by Maternal Age and Occupation

Multiple regression analyses were conducted separately for each PM size because of the collinearity of the PM

**TABLE II. Biomarkers Levels of the Study Population and Spearman's Correlations Between PM Exposure**

A. Biomarker levels between maternal blood and UCB (median $\pm$ IQR)						
		Micronuclei frequency (Min.–Max. values)	% Binucleated cells	Buds	Apoptotic cells	Necrotic cells
Maternal blood		5 $\pm$ (3–6.75) (1–14)	48 $\pm$ (34.5–56.38)	20.5 $\pm$ (14–30.5)	10 $\pm$ (4–13.75)	14.5 $\pm$ (2.25–29.75)
UCB		1.5 $\pm$ (0.25–2.75) (0–9)	37.75 $\pm$ (19.63–50)	22.5 $\pm$ (12–37.75)	11.5 $\pm$ (5.25–20.5)	9 $\pm$ (4–19)
B. Maternal age influence ( $\rho$ coefficient [95% CI]; $P$ -value)						
Maternal micronuclei vs. UCB micronuclei frequency					0.3767 [0.170, 0.551] <b><math>P = 0.0002</math></b>	
Maternal age vs. maternal micronuclei frequency					0.3499 [0.137, 0.531] <b><math>P = 0.0006</math></b>	
Maternal age vs. UCB micronuclei frequency					-0.0258 [-0.195, 0.245] $P = 0.4078$	
C. PM <sub>2.5</sub> and PM <sub>10</sub> concentration during the last month of pregnancy ( $\rho$ coefficient [95% CI]; $P$ -value)						
		Biomarkers				
Last month exposure		Micronuclei frequency	% Binucleated cells	Buds	Apoptotic cells	Necrotic cells
PM <sub>2.5</sub>	Maternal	0.2119	-0.0230	0.0559	0.0870	-0.0559
	Blood	[-0.009, 0.413] <b><math>P = 0.0265</math></b>	[-0.242, 0.198] $P = 0.4176$	[-0.166, 0.273] $P = 0.3067$	[-0.136, 0.301] $P = 0.2155$	[-0.273, 0.166] $P = 0.3068$
	UCB	0.1826 [-0.039, 0.387] <b><math>P = 0.0482</math></b>	-0.1591 [-0.366, 0.063] $P = 0.0742$	-0.0210 [-0.240, 0.200] $P = 0.4247$	0.204 [-0.017, 0.406] <b><math>P = 0.0313</math></b>	-0.1266 [-0.337, 0.096] $P = 0.1257$
PM <sub>10</sub>	Maternal	0.1797	-0.0580	0.0258	0.0421	-0.0881
	Blood	[-0.042, 0.384] $P = 0.0510^a$	[-0.275, 0.164] $P = 0.2999$	[-0.195, 0.245] $P = 0.4078$	[-0.180, 0.260] $P = 0.3518$	[-0.303, 0.134] $P = 0.2100$
	UCB	0.1908 [-0.031, 0.394] <b><math>P = 0.0411</math></b>	-0.1791 [-0.384, 0.043] $P = 0.0515^a$	-0.0118 [-0.231, 0.209] $P = 0.4575$	0.1074 [-0.115, 0.320] $P = 0.1653$	-0.1165 [-0.328, 0.106] $P = 0.1456$

Significant results in bold.

<sup>a</sup>Marginal significant results.

**TABLE III. Multiple Regression Analysis Between the Levels of Log-Transformed Micronuclei Frequency in Umbilical Cord and Maternal Blood vs. PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> Emissions, Maternal Age, and Occupation**

Variables	PM <sub>2.5</sub> analysis			
	UCB micronuclei frequency		Maternal micronuclei frequency	
	Coefficient $\beta$	<i>P</i> -value	Coefficient $\beta$	<i>P</i> -value
PM <sub>2.5</sub> exposure	0.00937	<b>0.050</b>	0.00708	0.076
Maternal age	-0.00370	0.523	0.0141	<b>0.005</b>
Maternal occupation	0.0510	0.421	-0.0443	0.402
	PM <sub>10</sub> analysis			
PM <sub>10</sub> exposure	0.00370	0.125	0.00195	0.334
Maternal age	-0.00389	0.510	0.0143	<b>0.005</b>
Maternal occupation	0.0672	0.287	-0.0307	0.562

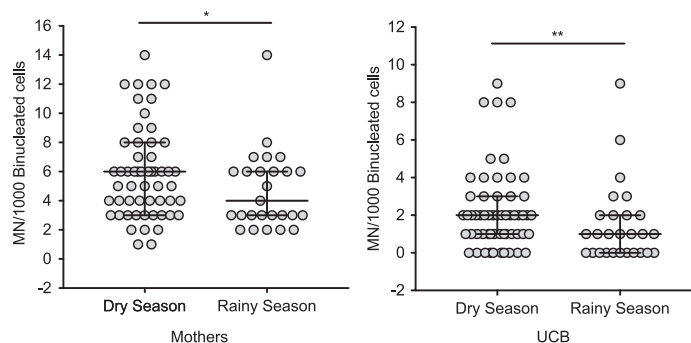
Significant values in bold.

concentrations. Parameters considered in these analyses included the frequency of maternal and cord blood MN, exposure to PM<sub>10</sub> or PM<sub>2.5</sub>, maternal age, and maternal occupation. Only PM<sub>2.5</sub> exposure explained the increase in the UCB MN frequencies ( $\beta = 0.00937$ ,  $P = 0.050$ ; Table III). For PM<sub>10</sub>, neither variable was associated with the levels of UCB MN (Table III). According to the results, the increase in MN in mothers was associated with the maternal age considering both PM sizes, but the exposure to PM<sub>2.5</sub> was marginally associated with higher levels of MN in mothers ( $\beta = 0.0141$ ,  $P = 0.005$ ; Table III). Similarly, there was no association between PM<sub>10</sub> and the MN frequency in UCB, but the PM<sub>2.5</sub> exposure during the last month of gestation is the variable that explains the increase in the MN frequency in UCB, without being affected by the maternal age or occupational activity of the mother. It was documented that, during the rainy season (Garcia-Suastegui et al., 2011),

environmental contaminants are reduced. Here, we observed a statistically significant increase in the MN frequency in both maternal blood and UCB in samples obtained during the dry season (November to May) compared with the MN frequency determined when samples were obtained during the rainy season (June to October; Fig. 1).

## DISCUSSION

The results from this study support the hypothesis that air pollution can cross the placenta, causing DNA damage in fetal cells. In our study, all the volunteers lived in locations where the levels of PM<sub>2.5</sub> during the whole gestation period (data not shown) and during the last month of pregnancy were higher than the annual average levels recommended by WHO (2013). This observation is important because the strongest associations between DNA damage and exposure were observed with the PM<sub>2.5</sub> levels reported by the monitoring stations during the last month of pregnancy. The WHO and other reports have highlighted the potential health effects of the fine aerodynamic fraction PM<sub>2.5</sub> that penetrates more deeply into tissues (Dockery and Pope, 1994; Brunekreef and Holgate, 2002; IARC, 2016). The CBMN assay allows the detection of clastogenic and aneugenic effects originated by exposure to xenobiotics. These may be associated with alterations in the cell cycle and DNA repair systems, as well as with deficiencies in essential nutrients, such as co-factors in DNA metabolism and the chromosome segregation apparatus, which are related to MN increase (Bonassi et al., 2007). The analysis of the MN frequency in lymphocytes allows a noninvasive way to detect human DNA damage and, in this case, in cord blood. It is a model that reflects what could be occurring in other cell types. The presence of genotoxic agents such as metals and polycyclic aromatic hydrocarbons have been determined in the PM of



**Fig. 1.** MN frequency induction according the dry season (November to May) or rainy season (June to October) in population exposed to air pollution in MCMA. Mothers (a) and umbilical cord blood, UCB (b). Data were analyzed by a Mann-Whitney U test. Statistical differences were found in mothers ( $P = 0.0423$ ) and UCB ( $P = 0.0152$ ).

MCMA (García-Suastegui et al., 2011; Salcido-Neyoy et al., 2015). Fine PM such as PM<sub>2.5</sub> can penetrate tissues and cells (WHO, 2013). In this study, we observed that PM<sub>2.5</sub> concentrations were associated with a marginal decrease in the cell proliferation of newborns. This fact is important because these newborns could be more susceptible to DNA damage by exposure to some other toxicants. A decrease in cell proliferation in newborns could cause a lack of maturation of some organs with possible later consequences. The germ and fetal cells are especially susceptible compared with mature cells: they have faster rates of replication, faster differentiation, and higher sensitivity to surrounding signals, due to the developmental processes. External factors that interfere with this progress may result in impaired organ function or increased susceptibility to disease in later life (Kajekar, 2007). A statistically significant association ( $\rho = 0.3767$ ;  $p = 0.0002$ ) was found between the MN frequency of mothers and their newborns. Also, MN frequencies in maternal and UCB lymphocytes were significantly associated with the levels of PM<sub>2.5</sub> during the last month of gestation (Table IIC) These fine particles could probably cross the placental barrier and generate DNA damage in cord blood, as confirmed by the multiple regression analysis where the strongest association was observed between PM<sub>2.5</sub> exposure and MN frequency in UCB (Table III). This observation suggests that fetal cells are more susceptible to fine particle effects than the maternal lymphocytes.

One explanation may be that the passage of ultrafine particles from the bloodstream through the placenta depends primarily on the stage of pregnancy. As pregnancy progresses, the placental barrier becomes thinner, blood perfusion improves from both sides and the exchange of nutrients and other elements increases (Enders and Blankenship, 1999). We analyzed exposure to PM during the last month of pregnancy when the passage of ultrafine particles might cross the placental barrier more easily. In that respect, Wick et al. (2010) investigated the placental passage of nanoparticles using an *ex vivo* human placental perfusion model and fluorescently labeled polystyrene (PS) beads. They showed that PS beads up to a diameter of 240 nm could cross the placental barrier with likely transport routes of passive diffusion and clathrin- or caveolin-mediated endocytosis. Milosevic-Djordjevic et al. (2005) mentioned that exposure to environmental pollutants *in utero* affects the genetic constitution of fetal body cells and that, right after birth, newborns have a low MN frequency; however, when the fetus is exposed to environmental genotoxic *in utero*, their frequency increases. Additional evidence was obtained when we compared the MN frequencies observed in cord blood lymphocytes from births that occurred during the rainy season with those obtained during the dry season, suggesting that increased air pollution is associated with the higher DNA damage observed. The impact of nonrepairable DNA damage represented by the presence of MN may include an increased

risk for immune effects (Latzin et al., 2011; Sly, 2011), such as allergies (Kim and Bernstein, 2009), asthma, or cardiac and pulmonary (Proietti et al., 2013) diseases, leukemia (Carlos-Wallace et al., 2016; Janitz et al., 2016), and cancer (Lavigne et al., 2017) in later years. Although the government is taking measures to reduce air pollution, nevertheless newborns are still at risk.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

POW, MGVM, and MEG designed the study and applied for Research Ethics Board approval, RRM, JHLP, and ANH recruited the patients and collected the data. MSC, JAMR, and AMS performed the lymphocyte cultures and MN assays, collected the air pollution data, analyzed the data, and prepared draft figures and tables. MSC and JAMR prepared the manuscript draft with important intellectual input from POW, AMS, and MEG. All authors approved the final manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the following grants: PAPIIT IN208914, CONACYT 219887, Programa Institucional Salud y Ambiente del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), Fundación Miguel Alemán y Red SAI CONACYT 293450. For this work, Jorge Alfonso Maciel Ruiz, a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), received fellowship 330134 from CONACYT.

#### DECLARATIONS OF INTEREST

None.

#### REFERENCES

- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenich M. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28:625–631.
- Brunekreef B, Holgate ST. 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360:1233–1242.
- Carlos-Wallace FM, Zhang L, Smith MT, Rader G, Steinmaus C. 2016. Parental, in utero, and early-life exposure to benzene and the risk of childhood leukemia: A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 183:1–14.
- Dockery DW, Pope CA. 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 15:107–132.
- Eastmond DA, Tucker JD. 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 13:34–43.

- Enders AC, Blankenship TN. 1999. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev* 38:3–15.
- Fenech M, Morley AA. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147:29–36.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, HUMN Micronucleus project. 2003. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534:65–75.
- García-Suastegui WA, Huerta-Chagoya A, Carrasco-Colin KL, Pratt MM, John K, Petrosyan P, Rubio J, Poirier MC, Gonsebatt ME. 2011. Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City. *Mutagenesis* 26:385–391.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2016. *Outdoor Air Pollution*, Vol. 109. Lyon, France: IARC, WHO.
- Janitz AE, Campbell JE, Magzamen S, Pate A, Stoner JA, Peck JD. 2016. Traffic-related air pollution and childhood acute leukemia in Oklahoma. *Environ Res* 148:102–111.
- Kajekar R. 2007. Environmental factors and developmental outcomes in the lung. *Pharmacol Ther* 114:129–145.
- Kim H, Bernstein JA. 2009. Air pollution and allergic disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 9:128–133.
- Latzin P, Frey U, Armann J, Kieninger E, Fuchs O, Rössli M, Schaub B. 2011. Exposure to moderate air pollution during late pregnancy and cord blood cytokine secretion in healthy neonates. *PLoS One* 6(8):e23130.
- Lavigne É, Bélaïr MA, Do MT, Stieb DM, Hystad P, van Donkelaar A, Martin RV, Crouse DL, Crighton E, Chen H, JRI B, Burnett RT, Weichenthal S, Villeneuve PJ, To T, Cakmak S, Johnson M, Yasseen AS 3rd, Johnson KC, Ofner M, Xie L, Walker M. 2017. Maternal exposure to ambient air pollution and risk of early childhood cancers: A population-based study in Ontario, Canada. *Environ Int* 100:139–147.
- Levario-Carrillo M, Sordo M, Rocha F, González-Horta C, Amato D, Ostrosky-Wegman P. 2005. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. *Mutat Res* 586:68–75.
- Milosevic-Djordjevic O, Grujicic D, Arsenijevic S, Marinkovic D. 2005. Monitoring of lymphocyte micronuclei among newborns from Kragujevac in Central Serbia before and after environmental contamination. *Tohoku J Exp Med* 205:1–9.
- Peace BE, Succop P. 1999. Spontaneous micronucleus frequency and age: What are normal values? *Mutat Res* 425:225–230.
- Pedersen M, Wichmann J, Autrup H, Dang DA, Decordier I, Hvidberg M, Bossi R, Jakobsen J, Loft S, Knudsen LE. 2009. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res* 109:1012–1020.
- Proietti E, Rössli M, Frey U, Latzin P. 2013. Air pollution during pregnancy and neonatal outcome: A review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 26:9–23.
- Sly PD. 2011. The early origins of asthma: Who is really at risk? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 11:24–28.
- Salcedo-Neyoy ME, Sanchez-Perez Y, Osorio-Vargas AR, Gonsebatt ME, Melendez-Zajgla J, Morales-Barcenas R, Petrosyan P, Molina-Servin ED, Vega E, Manzano-Leon N, García-Cuéllar CM. 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM<sub>10</sub>) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Pollut* 203:175–182.
- Secretaría del Medio Ambiente, Gobierno del Distrito Federal (SMA-GDF). 2012. <http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flipping-book/inventarioemisionesmvm2012/inventario-emisionesmvm2012.pdf>.
- Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA). 2016. *Inventario de Residuos Sólidos*. <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/storage/app/media/IRS-2016.pdf>.
- Stanek LW, Brown JS, Stanek J, Gift J, Costa DL. 2011. Air pollution toxicology: A brief review of the role of the science in shaping the current understanding of air pollution health risks. *Toxicol Sci* 120(Suppl 1):S8–S27.
- Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, Diener PA, Zisch A, Krug HF, von Mandach U. 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118:432–436.
- US EPA. 2004. *Air Quality Criteria for Particulate Matter*, Vol. I–II. Washington, DC: US Environmental Protection Agency. EPA 600/P-99/002aF-bF.
- World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. 2013. *Review of evidence on health aspects of air pollution—REVI-HAAP*. First results. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2013/review-of-evidence-on-health-aspects-of-air-pollution-revihaap-project-final-technical-report>.
- World Health Organization (WHO). 2016. <http://www.who.int/airpollution/en/>.
- World Health Organization (WHO). 2018. *Ambient (outdoor) air quality and health*. [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).

Accepted by—  
O. Olivero



## 11.1 Artículos adicionales publicados durante los estudios de posgrado



Review Article

Toxicology Research and Application

# Exposure to ambient particulate matter induces oxidative stress in lung and aorta in a size- and time-dependent manner in rats

Toxicology Research and Application  
Volume 2: 1–15  
© The Author(s) 2018  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/2397847318794859  
journals.sagepub.com/home/tor



OG Aztatzi-Aguilar<sup>1,2</sup>, A Valdés-Arzate<sup>3</sup>, Y Debray-García<sup>3</sup>,  
ES Calderón-Aranda<sup>3</sup>, M Uribe-Ramírez<sup>3</sup>, L Acosta-Saavedra<sup>3</sup>,  
ME Gonsebatt<sup>4</sup>, JA Maciel-Ruiz<sup>4</sup>, P Petrosyan<sup>4</sup>, V Mugica-Alvarez<sup>5</sup>,  
MC Gutiérrez-Ruiz<sup>6</sup>, LE Gómez-Quiroz<sup>6</sup>, A Osornio-Vargas<sup>7</sup>,  
J Froines<sup>8</sup>, MT Kleinman<sup>9</sup>, and A De Vizcaya-Ruiz<sup>3</sup>

### Abstract

Exposure to particulate matter (PM) has been implicated in oxidative stress (OxS) and inflammation as underlying mechanisms of lung damage and cardiovascular alterations. PM is a chemical mixture that can be subdivided according to their aerodynamic size into coarse (CP), fine (FP), and ultrafine (UFP) particulates. We investigated, in a rat model, the induction of OxS (protein oxidation and antioxidant response), carcinogen-DNA adduct formation, and inflammatory mediators in lung in response to different airborne particulate fractions, CP, FP, and UFP, after an acute and subchronic exposure. In addition, OxS was evaluated in the aorta to assess the effects beyond the lungs. Exposure to CP, FP, and UFP induced time- and size-dependent lung protein oxidation and DNA adduct formation. After acute and subchronic exposure, nuclear factor erythroid-2 (Nrf2) activation was observed in the lung, by electrophoretic mobility shift assay, and the induction of mRNA antioxidant enzymes in the FP and UFP groups, but not in the CP. Cytokine concentration of interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6, and macrophage inflammatory protein-2 was significantly increased in bronchoalveolar lavage fluid after acute exposure to FP and UFP. Activation of Nrf2 and expression of mRNA antioxidant enzymes were observed only after the subchronic exposure to FP and UFP in the aorta. Our results indicate that FP and UFP were mainly accountable for the oxidant toxic effects in the lung; OxS is spread from the lung to the cardiovascular system. We conclude that the biological mechanisms associated with transient OxS and inflammation are particle size and time-dependent exposure resulting in acute lung injury, which later reaches the vascular system.

<sup>1</sup> Cátedras-CONACYT

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

<sup>5</sup> Área de Química Aplicada, Universidad Autónoma Metropolitana, CDMX, México

<sup>6</sup> Departamento Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, and Unidad de Medicina Traslacional UNAM/INCICH, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CDMX, México

<sup>7</sup> Department of Pediatrics, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

<sup>8</sup> Center for Occupational and Environmental Health, School of Public Health, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

<sup>9</sup> Department of Medicine, School of Medicine, University of California-Irvine, Irvine, CA, USA

### Corresponding author:

A De Vizcaya-Ruiz, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07760, México, DF, México.

Email: avizcaya@cinvestav.mx



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

**Keywords**

Particulate matter, nuclear factor erythroid-2, inflammation, oxidative stress, lung, aorta

Date received: 29 May 2018; accepted: 25 July 2018

**Background**

Atmospheric pollution is a worldwide public health concern; continuous exposure to high levels of particulate matter (PM) in ambient air has been associated with increased respiratory and cardiovascular adverse health effects.<sup>1</sup> The consequences of PM exposure on human health are suggested to depend on the particles' aerodynamic size and chemical composition. PM is a polydisperse, dynamically mixed conglomerate of chemicals in solid or liquid form, and is made up of complex aggregates of inorganic material (e.g. oxides of transition metals), salts (e.g. ammonium nitrate and sulfates), organic material (e.g. carbonaceous material and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)), and aerobiological material (e.g. endotoxin, pollen, proteins) with a carbonaceous core. PM can be subdivided into three main aerodynamic fraction size (diameter particle, dp), coarse (CP, dp 10 to  $\geq 2.5$   $\mu\text{m}$ ), fine (FP, dp  $\leq 2.5$   $\mu\text{m}$ ), and ultrafine (UFP, dp  $\leq 0.1$   $\mu\text{m}$ ) particulates, because the sources of CP, FP, and UFP are different and possess different physicochemical properties that can influence adverse health effects following exposure.<sup>2,3</sup>

In addition, the aerodynamic size dictates where PM can deposit along the respiratory tract. CP deposits effectively in the nasopharyngeal region, while FP and UFP are able to penetrate into the gas exchange region interacting with the alveolar epithelium, and UFP can translocate to systemic circulation after depositing along all airways, particularly from the alveolar sacs and olfactory epithelium.<sup>4</sup> Coarse particles are particles that are predominantly mechanically generated from natural sources, including geological material, suspended soil, brake and tire wear, resuspended road dust, and biological material from pollen and bacteria. FP and UFP production is dominated by anthropogenic combustion-related emissions and products of gas to particle conversion in the atmosphere.

Metal and organic particulate components elicit the formation of reactive oxygen species (ROS) with subsequent potential induction of oxidative stress (OxS). Moreover, PM can stimulate secondary ROS generated as part of an inflammatory response.<sup>5-7</sup> These prooxidant factors can change the cellular redox state, and various transcription factors, such as the nuclear factor erythroid-2 (Nrf2), which are activated to remove and neutralize ROS and mitigate their harmful effects.<sup>8</sup> The essential protective role of Nrf2 in the lung is activated in circumstances against oxidative environmental pollutants, therapeutic

agents, allergens, and pathogens.<sup>9-11</sup> Nrf2 controls the transcription of cytoprotective genes by recognizing the DNA cis-regulatory element, the antioxidant response element (ARE), in specific gene promoters of antioxidant and detoxifying enzymes.<sup>6,11</sup> Among these genes, glutathione S-transferase (GST), heme oxygenase 1 (HO-1), and superoxide dismutase 2 (SOD2) are known to be involved in a survival response that counteracts OxS, thereby protecting cells from adverse biological outcomes.<sup>12,13</sup>

Nevertheless, when the protective response fails or is overwhelmed by excessive ROS production, a pro-inflammatory condition can result with various cytotoxic effects.<sup>14</sup> Nrf2 response is mediated by a redox sensitive thiol(ate), and NF- $\kappa$ B transcription factor, which is responsible for the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules that can have local and systemic effects. PM inhalation can lead to the expression of several biological mediators that may be involved in particulate-induced inflammatory processes, which can impact not only the lung, but also other organs, either directly induced by PM or as a secondary effect.<sup>15</sup>

As previously mentioned, in addition to the local pulmonary damage that is induced by PM exposure when OxS and inflammation are activated, secondary systemic effects that alter the translocation of PM or PM-induced mediators from the alveoli into circulation have been hypothesized to cause direct toxic cardiovascular effects. PM exposure augments the development and progression of atherosclerosis by exerting detrimental effects on clotting, vascular tissue, and myocardium through the same cellular and molecular mechanisms of OxS and inflammation observed in PM-related lung toxicity.<sup>16</sup>

Furthermore, the inflammatory and OxS responses have been associated with the induction of DNA damage in lung tissue.<sup>17</sup> A large number of chemicals present on the different fractions of PM, especially traffic-related particulates, have genotoxic or mutagenic activities, which can result in DNA adduct formation.<sup>18</sup> The organic compounds and metals found on PM induce DNA adducts, which is related to not only the particle's chemical composition but also to the accompanying OxS and inflammation induced by the different particulate components.

It is possible that exposure to FP and UFP can be more hazardous to human health than exposure to CP.<sup>19</sup> UFP may have a greater potential to induce OxS than do FP and CP.<sup>4,20,21</sup> More attention has been paid to UFP toxicity because they are emitted mainly by combustion sources

and contain a higher content of redox-cycling organic chemicals than do CP and FP. Ultrafine particles can be deposited deep in the lungs or even translocate to the systemic circulation, inducing cardiovascular injury and impairing endothelium or cardiac muscle.<sup>5,14,21</sup>

Although CP and FP could be less toxic than UFP and epidemiological studies have shown that these particles are significantly associated with adverse health effects such as cardiopulmonary mortality and morbidity, they represent nearly all the mass of ambient PM. While it can be shown in the laboratory that the differences among particulate fractions determine the extent of biological responses such as OxS, inflammation, and DNA damage, it has not been possible to convincingly demonstrate this in population-based health studies. Part of the problem is that PM is extremely variable with respect to its spatial and temporal distribution. Consequently, there are few, if any, exposure metrics that can be used to carry out population-based health outcomes studies of UFP exposures. Nevertheless, it is important to understand the mechanisms by which CP, FP, and UFP cause adverse effects.

Therefore, in the present study, we used a particle concentrator system to simultaneously expose rodents to purified air, and different chemically sized aerosols: CP, FP, and UFP.<sup>22</sup> We investigated the effects of acute (3 days) and subchronic (8 weeks) exposures on OxS potential, induction of inflammatory cytokines, and DNA damage as a result of the presence of DNA adducts in lung tissue. Additionally, we measured the OxS responses induced by the inhalation of the different PM fractions, in their initial target tissue, the lung, and in the aorta, to compare the oxidative effects of PM for extrapulmonary target tissues. We measured protein oxidation and DNA adduct formation in the lung as biomarkers of lung damage. We assessed the Nrf2 recognition signals of the ARE sense sequence, the expression of antioxidant *HO-1*, *SOD2*, and *GST* genes as responders to OxS, and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and MIP-2 cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) as indicators of inflammation. Additionally, to establish whether PM fraction exposure affects the vasculature, we evaluated the Nrf2 ARE activation and binding activity and the gene expression of antioxidant *HO-1*, *SOD2*, and *GST* in the aorta as a representative of a late onset systemic vasculature effect.

## Methods

### Experimental groups and exposure

Animal care and use were carried out according to the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH, USA) and Mexican guidelines (NOM-062-ZOO-1999). Animal handling and exposure was described in protocol ID 363-06, approved by the Internal Institutional Committee for the Use and Care of Laboratory Animals (Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio). Healthy 6-week-old male Sprague-Dawley rats (300–350 g at the

end of the exposure of each group),  $n = 6$  (per group), were obtained from Harlan Sprague-Dawley, Inc. (Mexico City, Mexico). During the whole of the experimental period, animals were maintained in a freestanding clean room with a changing station docking port (bioBubble<sup>®</sup>, Fort Collins, Colorado, USA). The rats were provided with ultrafiltered water and food *ad libitum* and maintained in a light: dark photoperiod of 12:12 h. Size-segregated exposure aerosols were provided using a versatile aerosol concentration system. The system was designed to support *in vivo* toxicity studies when coupled to exposure chambers.<sup>19,20</sup> These groups were simultaneously exposed in whole body chambers to enriched concentrated particulate atmospheres containing CP, FP, and UFP. Control group animals were exposed to filtered air (FA). Animals were exposed for 5 h/day for 3 days (acute exposure) and 5 h/day, 4 days/week for 8 weeks (subchronic exposure). Animals were euthanized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg). At necropsy, each animal trachea was cannulated to obtain BALF; four lavages per animal were performed with an isotonic saline solution and were later pooled and centrifuged at 1000 r/min. Supernatant and cell pellets were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses. After BALF procedure, the thorax was opened, and lung and aorta were removed, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### PM concentration measurement and chemical composition determination

CP and FP concentrations in the whole body chambers were determined gravimetrically using 37-mm Teflon filters (PTFE 2- $\mu\text{m}$  pore, Gelman Science, Ann Arbor, Michigan, USA) sampled from the PM and ambient air and chambers to estimate particle exposures. These data and the chemical composition of PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> have been previously reported.<sup>23</sup>

### Protein oxidation

Oxidative modification of proteins generates protein carbonyl groups, which can be used as an index of oxidation status of all proteins. Carbonyl groups were immunodetected using an OxiBlot<sup>™</sup> Protein Oxidative Detection Kit S7150 (Chemicon International from Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20  $\mu\text{g}$  of lung lysates were derivatized with 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) solution at room temperature (RT) for 15 min before stopping the reaction by adding a neutralizing solution. The DNPH-tagged proteins were then subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and subsequently blotted with an anti-dinitrophenyl group (DNP) antibody for detection. The protein-antibody complex signal was visualized using enhanced chemiluminescence (ECL)

Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The bands were visualized by exposure to X-ray film and photo-documented (UVP EC3 imaging system, UVP Inc., USA).

#### **DNA isolation and <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts**

Lungs were frozen in liquid nitrogen, pulverized, and resuspended in a solution of 20 mM Tris hydrochloride (HCl), pH 8.0, 250 mM sodium chloride (NaCl), 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.5% SDS (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Suspensions were RNase and proteinase K treated, and DNA was isolated by phenol-chloroform extraction. The DNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm. DNA adducts were analyzed by the nuclease P1 enrichment version of the <sup>32</sup>P-postlabeling assay according to the protocol by Phillips and Arlt (2007),<sup>24</sup> a method that is reported to be broadly applicable to a range of adducts that have general characteristics of being bulky, aromatic, or hydrophobic, similar to those formed by PAHs or aromatic amines. The labeled carcinogen-DNA adducts were separated by thin layer chromatography on PEI-cellulose plates (Macherey-Nagel, Düren, Germany) using the following solvents: D1, 1M sodium phosphate, pH 6.0; D2, 3.6M lithium formate, 8.5M urea, pH 3.5; and D3, 0.8M lithium chloride, 0.5M Tris, 8.5M urea, pH 8.0. The plates were autoradiographed and the diagonal radioactive zone was cut out for Cerenkov counting. The results were expressed as DNA adducts/10<sup>8</sup> nucleotides.

#### **Lung and aorta tissue cytoplasmic and nuclear protein extraction**

Cytoplasmic protein extracts were prepared from lungs by lysing tissues with Igepal CA-630 (0.58%) in 10 mM Hepes pH 7.9, containing 10 mM potassium chloride, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich), and centrifuging at 13,000  $\times$  g for 15 min at 4°C. The supernatants were stored at -80°C for further analysis. Pelleted nuclei were resuspended in 20 mM Hepes pH 7.9, containing 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich), after mixing continuously for 15 min at 4°C, the samples were centrifuged at 13,000  $\times$  g at 4°C for 5 min. Nuclear protein fractions were recovered and stored at -80°C for further analysis.

#### **Cytoplasmic Nrf2 analysis by Western blot**

Cytoplasmic proteins were obtained from the supernatants during the nuclear extraction procedure. Cytosolic protein (60  $\mu$ g) was denatured, fractionated by 10% SDS-

PAGE, and transferred onto PVDF membranes (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). After blocking nonspecific antibody binding, the membranes were blotted with an anti-Nrf2 antibody (sc-722; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) and anti- $\beta$  actin (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology) in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween<sup>®</sup> 20 (PBS-T). The protein-antibody complex signal was visualized with a chemiluminescent reagent (ECL plus Western blotting detection system; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New Jersey, USA), the bands were visualized by exposure to X-ray film, and then the films were documented to analyze band density. Anti- $\beta$  actin was used as a loading control.

#### **Electrophoretic mobility shift assay of Nrf2**

Activation of Nrf2 was examined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a consensus oligonucleotide 5'-TTTCTGCTGACTCAAGGTCCG-3' (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The probe was labeled by T4 polynucleotide kinase (USB, Cleveland, Ohio, USA) with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] adenosine triphosphate (ATP) (3000 Ci/mmol, MP Biomedical, Irving, California, USA) and purified using Bio-spin 30 chromatography columns (BioRad, Hercules, California, USA), the binding reaction mixture was made as described by Valdés-Arzate et al.<sup>25</sup> using 20 mg of protein from nuclear extracts, in 5 ml of incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 20% glycerol) and 1 mg of poly(dI-dC). Complexes were separated on non-denaturing 6% polyacrylamide gels and were visualized by autoradiography. In competition experiments, 100-fold molar excess of non-labeled oligonucleotide was added to the reaction mix for 5 min before addition of the labeled probe. The protein concentration of the nuclear extracts was determined by the Bradford method.<sup>26</sup>

#### **Total lung and aorta RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction**

Total RNA was isolated from lung and aorta with TRIzol reagent (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) following the reagent specifications. Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed into cDNA according to the manufacturer's instructions (SuperScript II, Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). PCR amplifications were performed with cDNA by using 10 pM of gene-specific forward and reverse primers in an Applied Biosystems 2720 thermal cycler (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, California, USA). PCR reactions products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The intensity of each gene PCR product band was quantitated and normalized to the corresponding house-keeping GADPH or  $\beta$ -actin cDNA band intensity using VisionWorks<sup>®</sup>LS Analysis Software (UVP, Upland, California, USA). Primers used were as follows:

GADPH forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and reverse: 5'-GCCAGTGAGCTTCCCGTT-3';  $\beta$ -actin forward 5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3' and reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCATAGAGGTC-3'; HO-1 forward 5'-AGGGAAGGCTTTAAGCTGGTGATG-3' and reverse 5'-CCTGCCAGTGGGCCCCATAC-3'; SOD2 forward 5'-TCCCTATCTCTGTGGTGGTGATG-3' and reverse 5'-TATCCTGGTCATAGCCGAAGTCTC-3'; GST forward 5'-GCTTCAAGGCTCGCTCAAGTC and reverse 5'-ATCATTACCATATCCACCAAGGC-3'.

#### Cytokine measurement by enzyme-linked immunosorbent assay

The analyses of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6) and chemokine MIP-2 present in BALF were carried out using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microplates (Nunc, MaxiSorb, Sigma-Aldrich). Kits for ELISA from PreproTech, Princeton Business Park, USA, were used. Capture antibodies IL-1 $\beta$  (900-K91), TNF- $\alpha$  (900-K73), IL-6 (500-p73Bt), and MIP-2 (500-P75) (50  $\mu$ l/well at 2  $\mu$ l/ml) were incubated overnight at 4°C. Microplates were washed four times with PBS buffer (PBS 0.5% Tween<sup>®</sup> 20-WB; Santa Cruz Biotechnology). Nonspecific binding sites were blocked with 300  $\mu$ l blocking solution (1% bovine serum albumin (BSA) in PBS) and the plates were incubated for 1 h at 37°C. Microplates were washed four times, standard dilutions of IL-6 and MIP-2 were prepared at the concentrations of 0, 0.25 to 10 ng/ml, and TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  standard solutions were prepared at the concentrations of 0, 0.046 to 3 ng/ml. Fifty microliters of standard solutions and BALF samples were added to the microplates, incubated for 2 h at RT, and these were removed by four washes. Biotinconjugated detection antibodies (100  $\mu$ l/well, 0.5  $\mu$ g/ml) were added and incubated for 2 h at RT. The microplates were carefully rinsed four times and incubated with avidin-peroxidase conjugate (100  $\mu$ l at a dilution of 1:2000). After incubation, the microplates were washed four times, 50  $\mu$ l TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate was added (Santa Cruz Biotechnology), and plates were incubated for 30 min at RT. The reaction was stopped adding 50  $\mu$ l of sulfuric acid (2M). Optical density was measured at 450 nm using a Spectra MAX-plus<sup>384</sup> multiplate reader (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, California, USA). Each sample was analyzed in triplicate and analyte concentrations were calculated from the linear portion of the generated standard curve.

#### Statistical analysis

Comparisons among groups were done by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc comparisons or by the nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test (when variances were not uniform). For protein oxidation, DNA adducts, and

pro-inflammatory cytokines, a mean  $\pm$  standard error of the mean was calculated. The  $p$  values <0.05 were considered statistically significant. Data analyses were performed using SigmaPlot, version 11 (Systat Software, Inc., Point Richmond, California, USA).

## Results

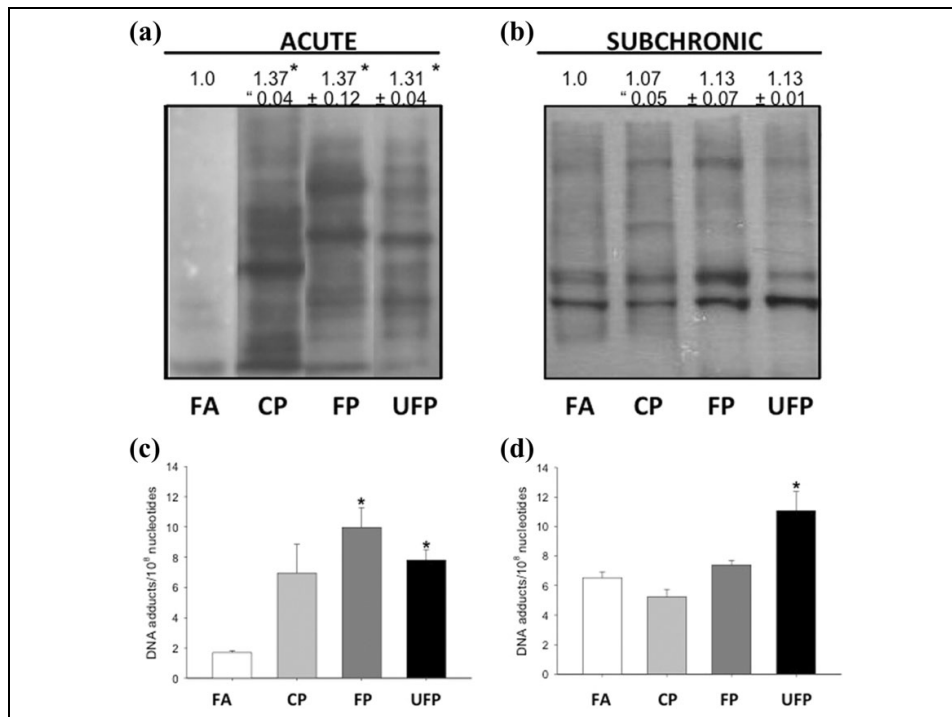
### Acute exposure to PM induces protein oxidative damage in the lung

OxS resulting from an imbalance between oxidants and antioxidants can affect macromolecules. OxS induction by exposure to the three PM fractions was evaluated by measuring lung protein oxidation. Acute exposure to concentrated CP, FP, and UFP, all induced significant ( $p \leq 0.05$ ) lung protein oxidation, compared to the FA group (Figure 1(a)). In contrast, no oxidative damage to lung proteins was induced following subchronic exposure to the three PM fractions compared with the control group (Figure 1(b)). Our data suggest that the oxidative protein damage induced by short-term exposure in the lung was resolved and did not persist after repeated exposures to PM for an extended period.

### Carcinogen-DNA adduct formation in the lung depends on the type of PM fraction

DNA adducts can originate from reactions with electrophilic species<sup>27</sup> because the rats were probably also exposed to low levels of adduct-forming compounds in their diet, caging, and other aspects of their environment. We analyzed the number of carcinogen-DNA adducts in the lung after acute and subchronic exposure to PM. Exposure to PM resulted in a significant increase in the carcinogen-DNA adducts in rat lung compared with the FA group (Figure 1(c) and (d)). As shown in Figure 1(c), after acute exposure to all PM fractions, the carcinogen-DNA adducts increased significantly (CP:  $8.96 \pm 1.43$ ; FP:  $10.83 \pm 1.23$ ; and UFP:  $8.63 \pm 0.45$ , per  $10^8$  nucleotides) compared with FA ( $1.68 \pm 0.08$  per  $10^8$  nucleotides). Similar results were observed only for the subchronic group exposed to UFP (Figure 2(d)), in which the number of carcinogen-DNA adducts in the UFP group was statistically significantly higher ( $12.80 \pm 0.96$  per  $10^8$  nucleotides) than that in the control group ( $5.56 \pm 0.35$  per  $10^8$  nucleotides).

Our results indicate that short-term exposure to CP, FP, and UFP can generate a number of carcinogen-DNA adducts. However, their presence and prevalence were greater in the subchronic exposure to UFP, possibly due to their chemical composition and because they have a greater contact surface area that could produce enough DNA adducts to be detected.<sup>7,28</sup> We observed differences in the formation of DNA adducts between control groups after acute and subchronic exposure, although they represent a stable basal level.



**Figure 1.** PM induced protein oxidation and DNA adducts in a time and particulate fraction dependent in lung tissue. Acute and subchronic exposure to FA, CP, FP, and UFP was performed. Protein oxidation in lung tissue, image representative of carbonyl detection from acute and subchronic exposure are showed in (a) and (b), respectively. PAH-DNA adducts in lung tissues from acute and subchronic exposure are showed in (c) and (d), respectively. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  rats/group). \*indicates statistical differences ( $p < 0.05$ ) respect to the FA group. PM: particulate matter; FA: filtered air; CP: coarse particulate; FP: fine particulate; UFP: ultrafine particulate; SD: standard deviation.

#### FP- and UFP-induced Nrf2-ARE binding activity in lung

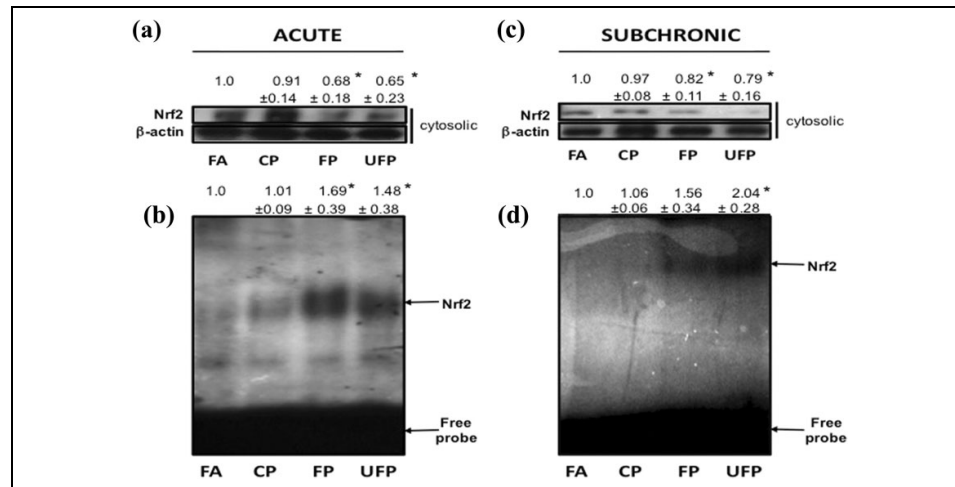
Nrf2 nuclear translocation is triggered in response to OxS, and the nuclear accumulation of Nrf2 is considered as a marker of transcription factor activation, but in its constitutive state, Nrf2 is primarily localized in the cytosol.<sup>11</sup> We determined the presence of Nrf2 in cytosolic fractions following acute and subchronic exposure to PM, and using Western blot analyses with immunodetection cytosolic Nrf2 was decreased following both acute and subchronic FP and UFP exposure (Figure 2(a) and (c)), consistent with the premise that Nrf2 is activated and mobilized to the nucleus in response to FP and UFP exposure.

We examined the Nrf2-ARE binding activity by EMSA to confirm that in lung nuclear extracts the ARE binding activity was increased in the groups exposed to FP and UFP. As shown in Figure 2(b), acute exposure to FP and UFP increased the nuclear Nrf2-ARE binding activity (0.7- and 0.5-fold, respectively) compared with FA. Similar

results were observed for subchronic exposure; Figure 2(d) shows the Nrf2-ARE activity in the lung of FP and UFP-exposed rats (0.6- and 1.0-fold, respectively). These results indicate that Nrf2 plays an important role in the cellular responses to FP and UFP exposure but not in the response to CP. In addition, the data trend suggests that there might have been a cumulative effect of the chronic exposures.

#### Expression of genes related to Nrf2 activation in the lung

We explored the effect of Nrf2 activation on the expression of the well-known Nrf2 genes, *HO-1*, *SOD2*, and *GST*. The induced expression of these genes confirmed increased Nrf2 activation in the rat lung after acute exposure to FP and UFP but not after CP exposure (Figure 3). The exposure to UFP induced a significant increase in the expression



**Figure 2.** Nrf2 activation is size-dependent but not time-dependent in the lung. Nrf2 protein levels in the cytosolic extracts were detected by Western blot ((a) and (c)). Nuclear extracts were utilized for electrophoretic mobility shift assays of Nrf2 DNA binding activity ((b) and (d)). The upper arrow in the gel shift analysis indicates an Nrf2-DNA binding complex. Images are representative experiment of six animals per group of acute ((a) and (b)) and subchronic exposure ((c) and (d)) to FA, CP, FP, and UFP. Data in the top of images express as arbitrary densitometry units, we present the mean  $\pm$  SD. \*indicates statistical differences ( $p < 0.05$ ) respect to the FA group. Nrf2: nuclear factor erythroid-2; FA: filtered air; CP: coarse particulate; FP: fine particulate; UFP: ultrafine particulate; SD: standard deviation.

of *HO-1* (0.54-fold; Figure 3(a)) and *SOD2* (1-fold; Figure 3(b)) compared with FA. UFP exposure did induce changes in the levels of GST mRNA (Figure 3(c)). FP exposure did not significantly change *HO-1* mRNA (Figure 3(a)), but it did significantly increase *SOD2* expression (1.5-fold; Figure 3(b)) and increased the expression of *GST* (0.6-fold; Figure 3(c)), compared with the FA group.

Subchronic exposure to FP and UFP, but not CP, increased the expression of Nrf2-related genes compared to the FA group (Figure 3). *HO-1* mRNA expression did not show changes in the exposure of all PM groups (Figure 3(d)). However, FP and UFP exposures significantly increased the expression of *SOD2* (0.6- and 1.5-fold, respectively; Figure 3(e)). Subchronic exposure to UFP also significantly increased the expression of *GST* (0.7-fold) with respect to the FA group (Figure 3(f)).

#### Acute exposure to FP and UFP induced the secretion of pro-inflammatory cytokines

We analyzed BALF from all experimental groups by ELISA. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and MIP-2 are mediators that initiate and propagate inflammatory responses.

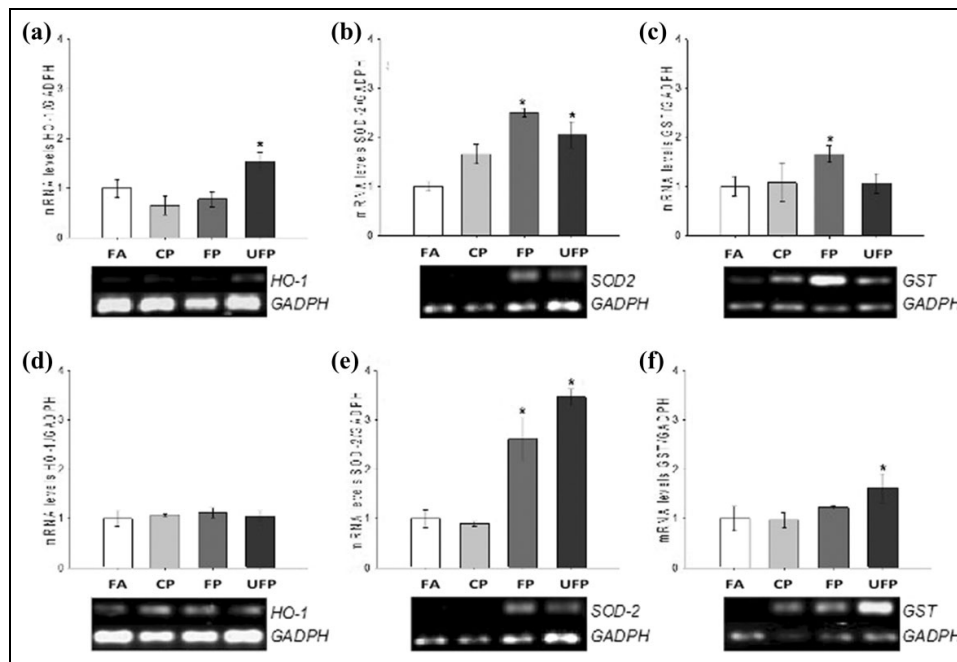
The TNF- $\alpha$  concentration was slightly, but not significantly increased in BALF after acute and subchronic exposure to UFP, but not by the other PM fractions, compared to the FA group (Figure 4(a)). A significant increase in IL-1 $\beta$

was observed after acute exposure in BALF of the UFP group. After the subchronic exposure, the IL-1 $\beta$  concentration in all the exposed PM groups showed a tendency to decrease lower than the concentration level of the FA group, but it was not significant (Figure 4(b)). Acute exposure to FP and UFP significantly increased the BALF concentration of IL-6 and MIP-2 related to the FA-exposed group. Following subchronic exposure, no differences were observed (Figure 4(c) and (d)).

#### Aorta Nrf2 activation and antioxidant enzyme gene expression is time-dependent

We determined the cytosolic Nrf2 and DNA binding activity of Nrf2 in aortas of exposed and control rats as an index of OxS. No changes were observed after acute exposure (data not shown). However, after subchronic exposure to FP or UFP, the cytosolic Nrf2 decreased (Figure 5(a)), and EMSA analysis showed that the Nrf2 nuclear protein binding to the AREs increased significantly (1.33- and 1.48-fold, respectively) after subchronic exposure to FP and UFP compared with FA (Figure 5(a)), suggesting a molecular response against OxS generated by a subchronic exposure.

Based on Nrf2 nuclear activity, we did not observe changes in *HO-1*, *SOD2*, and *GST* gene expression from the FA group after acute exposure to all PM fractions (data



**Figure 3.** Antioxidant expression levels after acute and subchronic exposure are size-dependent in the lung. mRNA levels for HO-1, SOD2, and GST in the lung tissue were determined by RT-PCR for acute ((a), (b), and (c)) and subchronic ((d), (e), and (f)) exposure. Animals were exposed to FA as control group, CP, FP, and UFP. Bottom images in graphics represent one sample of at least six animals per group. Densitometry analysis was normalized with GADPH, and relative mRNA data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  animals per group). \*indicates statistical differences ( $p < 0.05$ ) respect to the FA group. HO-1: heme oxygenase 1; SOD2: superoxide dismutase type-2; GST: glutathione S-transferase; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; FA: filtered air; CP: coarse particulate; FP: fine particulate; UFP: ultrafine particulate; SD: standard deviation; GADPH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

not shown). The changes in *HO-1*, *SOD2*, and *GST* mRNA expression after the subchronic exposure to PM fractions were consistent with the nuclear Nrf2 activity (Figure 5(b) to (d)). The densitometric analysis demonstrated a statistically significant increase in *HO-1* mRNA expression in the CP- and UFP-exposed groups (2.37- and 3.69-fold, respectively) over the FA group (Figure 5(b)). *SOD2* mRNA expression in the aorta was observed in the FP and UFP groups, which exhibited a significant increase in the expression of *SOD2* (0.74- and 0.3-fold, respectively) compared with the FA group (Figure 5(c)). FP and UFP exposure displayed statistically significant increases in *GST* mRNA expression (0.71- and 0.67-fold, respectively) with respect to the FA group (Figure 5(d)).

## Discussion

The results in this study suggest that (1) an initial local damage inducing inflammation and OxS in the lung mediates pathological effects in the aorta; and (2) this latter

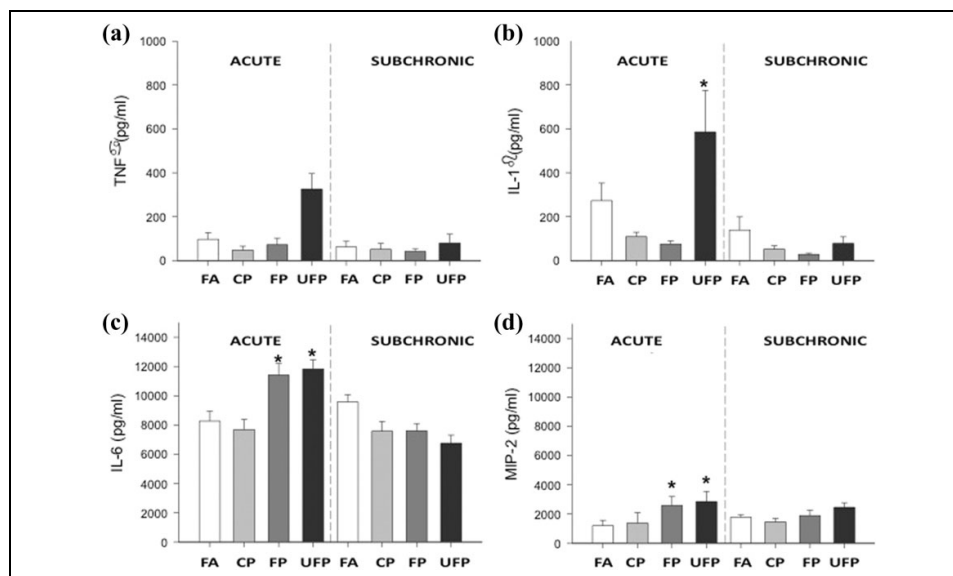
effect could be (a) due to the systemic translocation of FP and UFP to some of the chemical components or (b) secondary to mediators of OxS or inflammation.

### Lung OxS and DNA damage

Exposure to PM has been associated with an increased occurrence of adverse cardiopulmonary effects in numerous epidemiological studies.<sup>29</sup> Nevertheless, there is still debate about which PM fraction and what components are responsible for the induction of the adverse effects. Accumulating evidence suggests that the pro-oxidative organic hydrocarbons (PAHs and quinones), and transition metals (copper, vanadium, chromium, nickel, cobalt, and iron) present in PM play a substantial role in ROS production and thus initiate an OxS process.<sup>5,26,27</sup>

OxS has been implicated in the etiology of several diseases linked to exposure to environmental toxicants, including PM, due to the increment of ROS concentrations that exceed antioxidant defenses and oxidase





**Figure 4.** FP and UFP, but not CP fraction, increase acute inflammation. Cytokine protein levels in BALF from animals after acute and subchronic exposure to CP), FP, UFP, and FA as control group. Samples were analyzed by ELISA: (a) TNF- $\alpha$ , (b) IL-1 $\beta$ , (c) IL-6, and (d) MIP-2. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  animals/group). \*indicates statistical differences ( $p < 0.05$ ) respect to the FA group. FP: fine particulate; UFP: ultrafine particulate; CP: coarse particulate; BALF: bronchoalveolar lavage fluid; FA: filtered air; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ : interleukin 1 $\beta$ ; IL-6: interleukin 6; MIP-2: macrophage inflammatory protein-2; SEM: standard error of the mean.

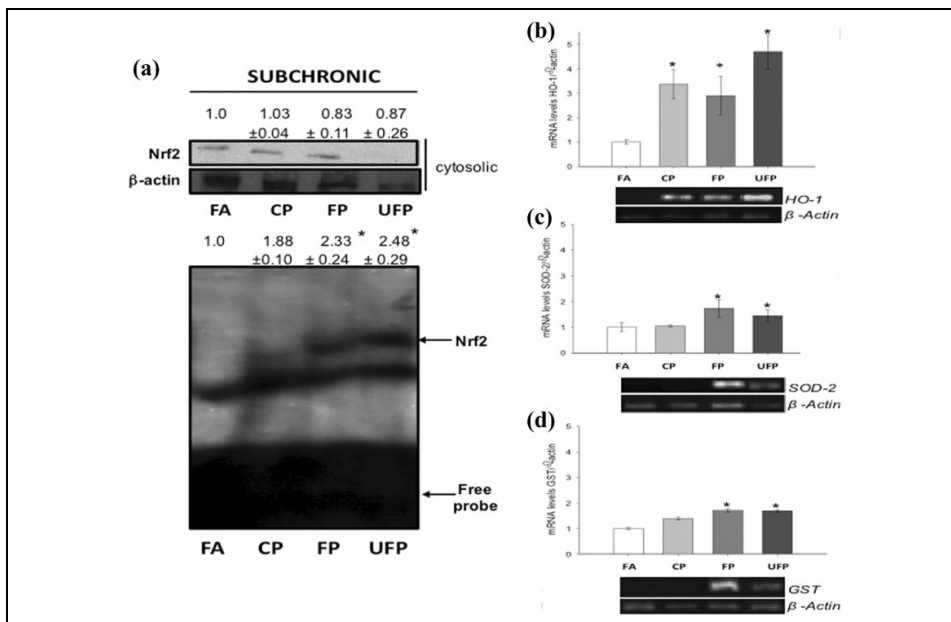
macromolecules.<sup>30–33</sup> Protein carbonylation is an irreversible, nonenzymatic process that results in the introduction of carbonyl groups into the protein molecule, leading to changes in its conformation. Protein carbonylation has been associated with the development of cardiovascular and respiratory diseases<sup>34,35</sup> and has been used as a biomarker of oxidized proteins.<sup>36</sup> A significant increase in the number of oxidized proteins in the lung was detected following acute exposure to all PM fractions in this study, but protein oxidation was not observed in any of the groups exposed subchronically. This is perhaps consistent with upregulation of antioxidant defenses and elevated Nrf2 activation in the subchronic exposure. The OxS observed following acute exposure could be caused by organic compounds in PM, primarily in the FP and UFP fractions,<sup>5</sup> which cause extensive oxidative damage via the monooxygenase activity of cytochrome P450 and metal ions by Fenton reactions, contributing to the ROS concentrations.

We did not observe any protein oxidation after subchronic exposure to the three PM fractions studied. We propose that the observation of protein oxidation by PM fractions decrease after repeated exposure could be explained by (1) oxidized proteins that underwent

proteasome degradation<sup>37</sup>; (2) the activation of an antioxidant response inducing the synthesis of nonenzymatic and enzymatic antioxidants<sup>38</sup>; and (3) the glutathionylation of proteins that protect them from oxidation.<sup>39</sup> These hypothesis need to be confirmed by further studies of subchronic and chronic exposure to PM.

OxS induced by PM exposure can contribute to carcinogen-DNA adduct formation as a result of its electrophilic chemical components. The number of carcinogen-DNA adducts increased in lung tissue after the acute exposure to all PM fractions, although, only statistically significant in the groups exposed to FP and UFP. The increase in the carcinogen-DNA adducts persisted after subchronic exposure. These data demonstrate that a short-term exposure to any PM fraction induced the formation of carcinogen-DNA adducts in exposed animals. However, after repeated exposure to CP and FP, the lung tissue was able to repair DNA adducts. Nevertheless, subchronic exposure to UFP induced similar adduct numbers with respect to the acute UFP exposure, probably reflecting differences in the reactivity and composition of UFP versus CP and FP.

It has been reported that the PAH content in PM contributes to the formation of DNA adducts.<sup>14,36</sup> In addition,



**Figure 5.** FP and UFP subchronic exposure induces Nrf2 activation and antioxidant enzymes expression in aorta. Animals were exposed to FA as control group, CP, FP, and UFP. Nrf2 protein levels in the cytosolic extracts were detected by Western blotting ((a), top) and nuclear extracts were utilized to electrophoretic mobility shift assays of Nrf2 DNA binding activity ((a), bottom). mRNA levels for antioxidant genes in aorta tissue were determined by RT-PCR for subchronic exposure ((b), (c), and (d)). Bottom images are representative from agarose gels. Densitometry analysis is expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  animals per group). \*indicates statistical differences ( $p < 0.05$ ) respect FA. HO-1: heme oxygenase-1; SOD2, superoxide dismutase type-2; GST, glutathione S-transferase; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; FA: filtered air; CP: coarse particulate; FP: fine particulate; UFP: ultrafine particulate; Nrf2: nuclear factor erythroid-2.

PM induces DNA oxidative adducts such as 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in animal models,<sup>40</sup> and even when the PAH content is low in PM<sub>2.5</sub>. After their metabolic activation by functional CYP1A1, PM can produce PAH-DNA bulky adducts, 8-oxodG, and DNA strand breaks in cell lines.<sup>18</sup> Sørensen et al. reported that PM<sub>2.5</sub> exposure was found to be a predictor of an increase in 8-oxodG in lymphocyte DNA in subjects exposed to it.<sup>41</sup> Further studies are needed to determine the type of DNA damage, the DNA repair mechanisms, and why UFP exposure induces permanent DNA adducts.

#### Lung Nrf2 response and antioxidant enzyme induction

Nrf2 activation is a key downstream regulatory factor of cell survival and sensitive markers in response to OxS.<sup>12</sup> The activation of Nrf2 in the lung of rats exposed to PM fractions shows that FP and UFP induced the activation of

Nrf2 in the lung compared with the FA control group of cytosolic Nrf2 in the FP and UFP compared with FA group.

Our data are consistent with those reported by Li et al. and Baulig et al., who observed that after exposure to diesel exhaust particle (DEP), Nrf2 is activated and induces the mRNA expression of HO-1,<sup>42</sup> and Nrf2 binds to the ARE consensus sequence in the GST or NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) promoter.<sup>43</sup> respectively.

The nuclear translocation of Nrf2 results in the gene transcription of antioxidants and phase-II defense enzymes, such as  $\gamma$ -GCS, NQO1, SOD2, GST, and HO-1, by binding to the ARE.<sup>11</sup> The mRNA levels of *HO-1*, *SOD2*, and *GST* genes were determined in this study as markers of the antioxidant defense against OxS induced by PM exposure. The induction response of these genes was observed after exposure to FP and UFP, although some differences in the response of each gene to the particulate fractions were observed; these results corroborate the published information on the induction of Nrf2 activity seen in FP and UFP groups in acute and subchronic exposure in different brain regions.<sup>23</sup>

The rapid induction of HO-1 increases the rate of free heme catabolism via the formation of carbon monoxide (CO) and biliverdin, and HO-1 confers cytoprotective effects through the biliverdin–bilirubin system.<sup>44–46</sup> The overexpression of HO-1 has cytoprotective effects in the lung, with a large beneficial spectrum of effects in several lung diseases.<sup>47</sup> The acute HO-1 mRNA induction observed in the UFP group suggests a cytoprotective effect to the smallest particulate fraction toxicity. Moreover, our results corroborate a previous study by Li et al. (2003), who observed an induction of HO-1 dependence on the particle size that could be related to the high organic content of UFP, and to the redox activity.<sup>42</sup> However, subchronic exposure to any PM fraction did not induce HO-1 mRNA expression, suggesting a secondary effect on the gene regulation of HO-1 or the nonparticipation of HO-1 in the chronic toxicity of the PM.

GST catalyzes the addition of reduced glutathione to electrophilic species and is important in the detoxification of the oxidizing agents that are produced due to a normal cellular activity.<sup>48</sup> GST-Pi, which corresponds to the sequence that we tested, is known to be involved in protein interaction (1-Cys peroxiredoxin) and related to the susceptibility to developing lung and esophageal cancer and other lung diseases such as asthma.<sup>49,50</sup> Our results imply the induction of GST-Pi by exposure to FP and UFP in a time-dependent response, which might be influenced by the particle size and chemical composition and could be involved in the development of lung diseases.

SOD2, also termed manganese superoxide dismutase, is the main antioxidant enzyme in the inner mitochondrial matrix that protects mitochondrial DNA and mitochondrial function, and it has been identified in cell senescence.<sup>51,52</sup> Exposure to PM, FP, and UFP has the mitochondria as a target organelle at a cellular level. Li et al. (2003) observed the presence of UFP, and to a lesser degree FP, into the mitochondria of murine macrophages and human bronchial epithelial cells.<sup>42</sup> In contrast, Hiura et al. (2000) reported that the organic chemicals extracted from DEP could induce a decrease in the mitochondrial membrane potential and intracellular ATP production in RAW 264.7 cells.<sup>53</sup> Our results indicate that SOD2 expression has been increased only in response to FP and UFP in acute and subchronic exposures suggesting an oxidative damage in mitochondria from lung tissue.

According to our results, the antioxidant response in the lung is influenced by the particle fraction, the exposure time, and Nrf2-target gene evaluated.

#### Lung inflammation response to PM fractions

Inhalation of PM caused inflammation of the airways and lungs (local inflammation), as one of the main toxic mechanisms of PM that could be responsible for secondary adverse effects on other tissues, for example,

cardiovascular effects, or the development of systemic responses as reported by Mutlu et al.<sup>54</sup>

IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  participate in the production of various other pro-inflammatory cytokines and hepatic acute phase proteins. It has been suggested that TNF- $\alpha$  is a key player in the innate immune system in the cytokine network and in the activation and recruitment of inflammatory cells.<sup>55</sup> In the present study, we did not observe statistically significant differences in the TNF- $\alpha$  concentrations in BALF among the PM exposure groups. TNF- $\alpha$  could be downregulated during acute PM exposure by the IL-6 cytokine,<sup>56,57</sup> in agreement with the findings presented herein.

IL-1 $\beta$  is defined as a prototype pro-inflammatory and “alarm” cytokine. It is produced rapidly by macrophages in response to inflammatory stimuli, inducing different immune cellular and molecular mechanisms that include the expression and synthesis of adhesion molecules (e.g. ICAM-1 and VCAM-1) and nitric oxide. They promote the infiltration of inflammatory and immunocompetent cells from the circulation into extravascular space and tissues.<sup>58</sup> We observed the presence of IL-1 $\beta$  in BALF only after acute exposure to UFP, suggesting that this inflammatory response could be mediated by the presence of the smallest particulates, which have higher surface areas than do CP and FP. However, IL-1 $\beta$  production and TNF- $\alpha$  could be inhibited or modulated by IL-6.

We observed that IL-6 increased after acute exposure to FP and UFP. IL-6 production is sensitive to IL-1 $\beta$ ; the high IL-6 concentration inhibited the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Our results could explain the nonresponse of TNF- $\alpha$  concentrations in BALF in the same particulate groups and the unresponsiveness in IL-1 $\beta$  in the FP group. Additionally, IL-6 is involved in the hepatic induction of acute phase response inducing proteins related to restoring the disturbed homeostasis due to the immune process, such as fibrinogen,<sup>59</sup> which has been reported to increase after PM exposure.<sup>60</sup> This finding suggests that IL-6 release by PM exposure is related to a coagulation effect.<sup>54</sup>

IL-1 $\beta$  and IL-6 concentrations indicated an inflammatory response. To investigate the chemotaxis signal in the lung, we evaluated the concentration of the chemotactic molecule MIP-2, which is homologous to IL-8 in humans. An increment in MIP-2 concentration in BALF was observed in the acute exposure to FP and UFP; these results confirm the release of humoral mediators in the immune response against small particulates (<2.5  $\mu$ m). MIP-2 is involved in the recruitment of neutrophils in the lungs and mediates the acute inflammatory response following exposure to particles.<sup>15</sup> Our results are consistent with other studies that used particles from different origins. It has been reported that exposure to higher doses of DEPs increased the expression level of IL-6 and MIP-2, independent of TNF- $\alpha$  status in C57 $\times$ CBA mice.<sup>58</sup>

Significant increments in IL-1 $\beta$ , IL-6, and MIP-2 after acute exposure could be due to OxS, the chemical composition (transition metals and PAH), or simply the

interaction of FP and UFP fractions with the alveolar macrophages.<sup>60</sup>

An important observation was the absence of cytokines in the BALF in the group exposed to the CP fraction. *In vitro* studies using PM<sub>10</sub> as representative particles of CP suggested a pro-inflammatory response;<sup>60</sup> however, other factors could influence unresponsiveness to CP exposure such as: (1) the mucociliary clearance,<sup>61</sup> CP deposition in upper airways including the bronchial tree; and (2) anatomic features of the *in vivo* model, nasal turbinate bones, bearing sensory epithelium, confer additional surface area, and increase the air turbulence to enhance the air particulates deposition.<sup>62</sup> Differences in the turbinate dimension between species can influence the deposition of CP, *Rattus norvegicus*, for example, has long and deep turbinates compared to those of humans. For these reasons, possibly CP exposure did not induce antioxidant and immune responses in the rat model.

Our results for cytokines in BALF did not support the hypothesis of chronic inflammation during repeated exposures to PM. However, we cannot rule out that other cytokines such as IL-4, IL-10, and TGF- $\beta$ , which can modulate immune cells and decrease inflammatory response and mediators, are induced in the subchronic response to PM. The immunological response to constant stimuli along a relatively large exposure period could modulate the immune response to protect from tissue damage and initiate the tissue remodeling. It has been observed that PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10-2.5</sub> exposure induced Toll-like-receptor expression and increased the pro-inflammatory cytokines in the early phase of the immune response.<sup>63</sup> Future studies are needed to confirm *in vivo* the immune response balance present during the chronic exposure to PM.

#### *Nrf2* mediates antioxidant response in aorta

In epidemiological studies, exposure to FP and UFP has been associated with adverse health effects, including cardiorespiratory diseases.<sup>64,65</sup> Many hypotheses have been postulated to explain the mechanisms responsible for the adverse effects of FP exposure.<sup>65,66</sup> One of the most accepted hypotheses is that PM causes OxS in the airways and induces an inflammatory response with an upregulation of OxS-sensitive pathways. Moreover, FP and UFP can cross the epithelial alveolar-endothelium barrier, reach the pulmonary circulation, and be distributed into the heart, with direct interactions with the systemic vasculature generating adverse effects at various sites.<sup>16,66,67</sup> Several studies have assessed the direct effect of particles *in vivo*<sup>68,69</sup> and *ex vivo*.<sup>70-73</sup> However, studies to evaluate the effect of PM translocation are needed, since it is known that UFP can get across the alveolar-endothelium barrier.<sup>4</sup>

We propose that PM fractions can induce OxS in the aorta after their initial effect in the lung. Our study provides evidence that exposure to any PM fraction was not associated with Nrf2 activation or *SOD2*, *HO-1*, and *GST*

expression in the aorta after an acute exposure. In contrast, we found that the antioxidant response occurred only after repeated exposures during subchronic exposure.

Similar effects have been found in other studies: a study in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice showed that UFP induced OxS at early stages of atherosclerosis, inducing the mRNA liver expression of Nrf2-related genes. It is thought that the FP and UFP fractions have more long-term health effects but that the CP fraction is associated with short-term health effects.<sup>74</sup>

We demonstrated that the subchronic exposure to FP and UFP caused Nrf2 activation in the aorta. However, the subchronic exposure to CP resulted in a significant increase in the gene transcription of HO-1 mRNA in the aorta. Previously, we demonstrated that CP exposure induced the expression of components of the angiotensin endocrine system and that subchronic exposure to CP increased the intramyocardial coronary artery thickness. The HO-1 effect by CP in aorta might result in pulmonary and cardiac effects on angiotensin in these tissues through a different mechanism.<sup>75</sup>

The increased toxicity of UFP can be explained by their small size, large particle number per unit of mass, high organic carbon content, high content of PAHs, and ability to reach subcellular organelles, such as mitochondria.<sup>7</sup> OxS could be the central mechanism by which ambient PM induces adverse health effects. Moreover, the small size of UFP allows their access to the systemic circulation, and they can be involved in inflammatory events in the vessel wall, for example, atherosclerosis, or translocated from the lungs into the circulation and extrapulmonary organs (i.e. liver, heart, spleen, and brain).<sup>4,66</sup> Our study demonstrates that antioxidant enzymes in aorta were observed when Nrf2 is activated but only after subchronic exposure to FP and UFP.

Our study data correlate with those of Araujo et al., who found that exposure to FP and UFP in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice led to increased hepatic lipoperoxidation, accompanied by a higher upregulation of Nrf2-regulated antioxidant genes and unfolded protein response genes of UFP-exposed mouse livers.<sup>21</sup>

#### *Chemical composition is related to PM fraction effect*

This is the first study to evaluate the time- and PM size-related induction of OxS, DNA damage, and inflammation in the lung and the effect on the aorta, which is not a direct target tissue described in PM toxicity.

Previously, we reported the particulate concentration measured in whole body chamber exposure and the chemical composition (transition metals and PAH) from the present exposure.<sup>23</sup> In addition, it has been reported that the CP and FP fractions from Mexico City contain metals such as Fe, Zn, and Ti and, to a lesser extent, Mn, Cu, V, Cd, Ni, Cr, and Pb. There are also high levels of organic and elemental carbon, endotoxins, and PAHs.<sup>76</sup> Transition and divalent metals exposure can explain the effect of the

different PM fractions on the deregulation of cardiovascular system control because these metals can impact allosteric sites or interfere with calcium pathways.<sup>75</sup> However, in the present study, we now demonstrate that the small fractions (<2.5 µm) can be involved in OxS induction via prooxidant activity promoting ROS production by divalent metals and a significant concentration of PAH.

PAHs are important in the toxicity of the UFP because PAH *in vitro* cell models demonstrate the expression of HO-1. Our results from carcinogen-DNA adducts, inflammation, and antioxidant Nrf2 response support the hypothesis of UFP as being more reactive. Although we did not determine the UFP mass and chemical composition, FP characterization, which includes the UFP fraction, indicated a high total concentration of PAH (10.1 µg/m<sup>3</sup>) and CP (2.8 µg/m<sup>3</sup>), which could explain the major effects observed in the present study.

### Conclusions

The present study indicates that the exposure to PM induced OxS, DNA damage, and inflammation in the lung, which was dependent on the particle size and the time of exposure. Exposure to FP and UFP induced higher oxidative damage and Nrf2 antioxidant response in the lung than CP exposure did. The effect of FP and UFP on the antioxidant Nrf2-dependent response induction is mainly evident in the subchronic exposure in the aorta. We concluded that UFP is the main particulate fraction related to OxS, DNA damage, and inflammation in the lung, mainly as an acute response. DNA damage persisted in the subchronic exposure. Additionally, an effective response of Nrf2 antioxidant-related elements in the aorta as a representative of systemic vasculature was observed in the subchronic exposure. We observed the biological plausibility of OxS translocated from the lung to the vascular system after repeated exposure.



### Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (167778 and 57752) and NIH Fogarty Grant (5D43TW000623).

### ORCID iD

A Osornio-Vargas  <http://orcid.org/0000-0001-8287-7102>  
A De Vizcaya-Ruiz  <http://orcid.org/0000-0002-2097-0464>

### References

1. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiovascular mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; **287**(9): 1132–1141.
2. Lin CC, Chen SJ, Huang KL, et al. Characteristics of metals in nano/ultrafine/fine/coarse particles collected beside a heavily trafficked road. *Environ Sci Technol* 2005; **39**(21): 8113–8122.
3. Happo MS, Salonen RO, Hälinen AI, et al. Dose and time dependency of inflammatory responses in the mouse lung to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European cities. *Inhal Toxicol* 2007; **19**(3): 227–246.
4. Oberdörster G, Oberdörster E and Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; **113**(7): 823–839.
5. Wallenborn JG, Schladweiler MJ, Richards JH, et al. Differential pulmonary and cardiac effects of pulmonary exposure to a panel of particulate matter-associated metals. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; **241**(1): 71–80.
6. Rubio V, Valverde M and Rojas E. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ Sci Pollut Res Int* 2010; **17**(2): 369–382.
7. Li N, Sioutas C, Cho A, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003; **111**(4): 455–460.
8. Hur W and Gray NS. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr Opin Chem Biol* 2011; **15**(1): 162–173.
9. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004; **114**(9): 1248–1259.
10. Papaiahgari S, Yerrapureddy A, Reddy SR, et al. Genetic and pharmacologic evidence links oxidative stress to ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**(12): 1222.
11. Cho HY and Kleeberger SR. Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; **244**(1): 43–56.
12. Kensler TW, Wakabayashi N and Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; **47**(1): 89–116.
13. Kaspar JW, Niture SK and Jaiswal AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**(9): 1304–1309.
14. Araujo JAA. Particulate air pollution, systemic oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis. *Air Qual Atmos Heal* 2011; **4**(1): 79–93.
15. Driscoll KE. TNF $\alpha$  and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett* 2000; **112**: 177–183.
16. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med* 2009; **6**(1): 36–44.

17. Danielsen PH, Loft S, Jacobsen NR, et al. Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in rats after intratracheal instillation or oral exposure to ambient air and wood smoke particulate matter. *Toxicol Sci* 2010; **118**(2): 574–585.
18. Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J Appl Toxicol* 2013; **33**(2): 109–119.
19. Rossner P, Topinka J, Hovorka J, et al. An acellular assay to assess the genotoxicity of complex mixtures of organic pollutants bound on size segregated aerosol. Part II: oxidative damage to DNA. *Toxicol Lett* 2010; **198**(3): 312–316.
20. Ntziachristos L, Froines JR, Cho AK, et al. Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Part Fibre Toxicol* 2007; **4**(1): 5.
21. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, et al. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res* 2008; **102**(5): 589–596.
22. Kim S, Jaques PA, Chang M, et al. Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous in vivo and in vitro evaluation of toxic effects of ultrafine, fine and coarse ambient particles. Part II: field evaluation. *J Aerosol Sci* 2001; **32**(11): 1299–1314.
23. Guerra R, Vera-Aguilar E, Uribe-Ramirez M, et al. Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum. *Toxicol Lett* 2013; **222**(2): 146–154.
24. Phillips DH and Arlt VM. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts. *Nat Protoc* 2007; **2**(11): 2772–2781.
25. Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**(4): 424–430.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–254.
27. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; **21**(3): 361–370.
28. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, et al. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**(4): 1376–1383.
29. Brunekreef B and Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002; **360**(9341): 1233–1242.
30. Osburn WO and Kensler TW. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2008; **659**(1-2): 31–39.
31. Donaldson K, Brown D, Clouter A, et al. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 2002; **15**(2): 213–220.
32. Li N, Hao M, Phalen RF, et al. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 2003; **109**(3): 250–265.
33. Zhang W, Cao YX, He JY, et al. Down-regulation of  $\alpha$ 1-adrenoceptor expression by lipid-soluble smoke particles through transcriptional factor nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; **101**(6): 401–406.
34. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003; **9**(4): 169–176.
35. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006; **10**(2): 389–406.
36. Suzuki YJ, Carini M and Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal* 2010; **12**(3): 323–325.
37. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 2005; **24**(7): 1311–1317.
38. Curtis JM, Hahn WS, Long EK, et al. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab* 2012; **23**(8): 399–406.
39. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, et al. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med* 2004; **8**(2): 201–212.
40. Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic Res* 2010; **44**(1): 1–46.
41. Sørensen M, Autrup H, Møller P, et al. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res Mutat Res* 2003; **544**(2–3): 255–271.
42. Li N, Venkatesan MI, Miguel A, et al. Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol* 2000; **165**(6): 3393–3401.
43. Baulig A, Sourdeval M, Meyer M, et al. Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro* 2003; **17**(5–6): 567–573.
44. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, et al. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002; **234–235**(1–2): 249–263.
45. Otterbein LE and Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279**(6): 1029–1037.
46. Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med* 2003; **200**(4): 167–186.
47. Fredenburgh LE, Perrella MA and Mitsialis SA. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; **36**(2): 158–165.
48. Sherratt PJ and Hayes JD. Glutathione S-transferases. In: Ioannides C (ed) *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics [Internet]*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002, pp. 319–352.
49. Vasieva O. The many faces of glutathione transferase pi. *Curr Mol Med* 2011; **11**(2): 129–139.
50. Conklin DJ, Haberkzettel P, Prough RA, et al. Glutathione-S-transferase P protects against endothelial dysfunction induced

- by exposure to tobacco smoke. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2009; **296**(5): H1586–H1597.
51. Wegesser TC, Franzi LM, Mitloehner FM, et al. Lung antioxidant and cytokine responses to coarse and fine particulate matter from the great California wildfires of 2008. *Inhal Toxicol* 2010; **22**(7): 561–570.
  52. Zelko IN, Mariani TJ and Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(3): 337–349.
  53. Hiura TS, Li N, Kaplan R, et al. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J Immunol* 2000; **165**(5): 2703–2711.
  54. Mutlu GM, Green D, Bellmeyer A, et al. Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway. *J Clin Invest* 2007; **117**(10): 2952–2961.
  55. Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; **10** (1350–9047 (Print)): 45–65.
  56. Aderka D, Le JM and Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989; **143**(11): 3517–3523.
  57. Ulich TR, Yin S, Guo K, et al. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am J Pathol* 1991; **138**(5): 1097–1101.
  58. Saber AT, Jacobsen NR, Bornholdt J, et al. Cytokine expression in mice exposed to diesel exhaust particles by inhalation. Role of tumor necrosis factor. *Part Fibre Toxicol* 2006; **3**: 4.
  59. Heinrich PC, Castell JV and Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; **265**(3): 621–636.
  60. Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, et al. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 2003; **111**(10): 1289–1293.
  61. Stuart BO. Deposition and clearance of inhaled particles. *Environ Health Perspect* 1976; **16**: 41–53.
  62. Hillenius WJ. The evolution of nasal turbinates and mammalian endothermy. *Paleobiology* 1992; **18**(1): 17–29.
  63. Miyata R and van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; **257**(2): 209–226.
  64. Pope CA and Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manage Assoc* 2006; **56**(6): 709–742.
  65. Atkinson RW, Anderson HR, Sunyer J, et al. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**(10 I): 1860–1866.
  66. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, et al. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett* 2004; **49**(1–3): 243–253.
  67. Vermylen J, Nemmar A, Nemery B, et al. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost [Internet]* 2005; **3**(9): 1955–1961.
  68. Da Silva DR, Binotti RS, Da Silva CM, et al. Mites in dust samples from mattress surfaces from single beds or cribs in the south Brazilian city of Londrina. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; **16**(2): 132–136.
  69. Nemmar A and Inuwa IM. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. *Toxicol Lett* 2008; **176**(1): 20–30.
  70. Meiring JJ, Borm PJA, Bagate K, et al. The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Part Fibre Toxicol* 2005; **2**: 3.
  71. Hamoir J, Nemmar A, Halloy D, et al. Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; **190**(3): 278–285.
  72. Nemmar A, Hamoir J, Nemery B, et al. Evaluation of particle translocation across the alveolo-capillary barrier in isolated perfused rabbit lung model. *Toxicology* 2005; **208**(1): 105–113.
  73. Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Vanaudenaerde BM, et al. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. *Eur Respir J* 2008; **32**(5): 1184–1194.
  74. Brunekreef B and Forsberg B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J* 2005; **26**(2): 309–318.
  75. Aztatzi-Aguilar OG, Uribe-Ramírez M, Arias-Montaño JA, et al. Acute and subchronic exposure to air particulate matter induces expression of angiotensin and bradykinin-related genes in the lungs and heart: angiotensin-II type-I receptor as a molecular target of particulate matter exposure. *Part Fibre Toxicol* 2015; **12**(1): 17.
  76. De Vizcaya-Ruiz A, Gutiérrez-Castillo ME, Uribe-Ramirez M, et al. Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. *Atmos Environ* 2006; **40**: 583–592.