

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFEECTO DIFERENCIAL DE PM₁₀ COLECTADAS EN DOS
AÑOS DISTINTOS EN LA CIUDAD DE MÉXICO SOBRE LOS
NIVELES Y CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR
DE HMSH6, HMSH2 Y HMLH1 DE LA VÍA DE REPARACIÓN
DE BASES MAL APAREADAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PABLO EMILIANO MONROY BORDON



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX (2020)



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.

1. Datos del alumno
Monroy
Bordon
Pablo Emiliano
0445544666085
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312229328
2. Datos del tutor
Dra.
Claudia María
García
Cuellar
3. Datos del Sinodal 1
Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte
4. Datos del Sinodal 2
Dr.
Marco Alonso
Andonegui
Elguera
5. Datos del Sinodal 3
Dra.
Teresa Imelda
Fortoul
Van der Goes
6. Datos del Sinodal 4
Dra.
Patricia
Segura
Medina
7. Datos del trabajo escrito
Efecto diferencial de PM_{10} colectadas en dos años distintos en la Ciudad de México sobre los niveles y la capacidad de translocación nuclear de hMSH6, hMSH2 y hMLH1 de la vía de reparación de bases mal apareadas.
65 p.
2020

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias y la Universidad Nacional Autónoma de México por enseñarme los valores necesarios para formarme como científico.

A los miembros de mi jurado: Dra. Teresa I. Fortoul Van der Goes, Dra. María E. Gonsebatt Bonaparte, Dra. Patricia Segura Medina y el Dr. Marco A. Andonegui Elguera por sus observaciones y consejos sobre este trabajo.

Al Instituto Nacional de Cancerología y a todos los miembros del laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente.

A mi tutora la Dra. Claudia María García Cuellar, por aceptarme y permitirme se parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y conocimiento los cuales me permitieron la elaboración de este proyecto.

A la M. en C. Ericka Marel Quezada Maldonado por su tiempo, guía, apoyo, conocimiento, paciencia y amistad, sin los cuales no hubiera podido concluir este proyecto de manera satisfactoria.

A la Dra. Yessenia Sánchez Pérez por sus observaciones para la realización de este trabajo.

Al Dr. Javier Miranda y al Fis. Juan Carlos Pineda Santamaría del Instituto de Física por su ayuda en la caracterización de las muestras.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a mis padres por su amor y apoyo durante la vida sin los cuales no sería quien soy ahora, y por proveerme siempre de lo necesario para alcanzar mis metas.

A mis abuelos Carlota y Raúl, a mis hermanos Valentina, Cristobal y María, a mi tía Sylvia, y a toda la familia Monroy. Los quiero.

A mis camaradas del laboratorio: Carlos, Miguel, Marel, Yanueh, Ana y Abner por su amistad, apoyo y cariño.

A mis amigos de la vida: Sandra, Elihu, Alfredo, Azael, Wendy, Frida, César, Eunice, Andrés, Miguel y Edgar, por los buenos tiempos, las largas pláticas, su amistad, confianza y cariño.

GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
1.1 LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.....	8
1.1.1 La atmósfera.....	8
1.2 MATERIAL PARTICULADO (PM).....	9
1.2.1 Origen y composición del material particulado.....	9
1.2.2 Normas y regulación sobre la exposición a PM.....	11
1.3 EFECTOS DEL MATERIAL PARTICULADO EN LA SALUD.....	12
1.3.1 Efectos a Nivel celular.....	13
1.3.2 Mecanismos de reparación del DNA.....	14
1.4 VÍA DE REPARACIÓN DE BASES MAL APAREADAS.....	15
1.4.1 Descripción general de la vía MMR.....	15
1.4.2 Regulación de la vía de MMR mediante modificaciones postraduccionales.....	17
1.4.3 Defectos de la vía MMR y su impacto en la salud.....	18
1.4.4 Alteraciones de la vía MMR por compuestos tóxicos.....	19
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	22
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	23
5.1 COLECTA DE PARTÍCULAS PM_{10}	23
5.2 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS DE PM_{10}	23
5.3 CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA A549.....	24
5.4 EXPOSICIÓN A MATERIAL PARTICULADO (PM_{10}).....	24
5.5 EXTRACCIÓN DE RNA.....	25
5.6 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE INTEGRIDAD DE RNA.....	26
5.7 SÍNTESIS DE cDNA Y qPCR.....	26
5.8 SÍNTESIS DE cDNA.....	26
5.9 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HMSH2, HMSH6 Y HMLH1 POR qRT-PCR.....	27
5.10 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	28
5.11 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	28
5.12 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE PROTEÍNA DE HMSH2, HMSH6 Y HMLH1.....	29
5.13 DETECCIÓN SUBCELULAR DE HMSH6 Y HMSH2 POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	30
5.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1 LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL PARTICULADO VARÍA DE ACUERDO CON EL TIEMPO... 33	33
6.2 EL MATERIAL PARTICULADO NO AFECTA LOS NIVELES DE MRNA O PROTEÍNA DE HMSH2.....	35
6.3 EL MATERIAL PARTICULADO DISMINUYE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE HMSH6.....	37

6.4 EL MATERIAL PARTICULADO DISMINUYE LOS NIVELES DE PROTEÍNA HMLH1 SIN CAMBIAR LOS NIVELES DE MRNA	39
6.5 LA EXPOSICIÓN A PM₁₀ ALTERA LA DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS HMSH2 Y HMSH6 DISMINUYENDO SUS NIVELES EN NÚCLEO	41
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
8. CONCLUSION	52
9. PERSPECTIVAS.....	53
10. REFERENCIAS.....	54
11. REFERENCIAS EN LÍNEA:.....	64

RESUMEN

Introducción: El material particulado (PM) es uno de los principales contaminantes del aire y se define como una mezcla compleja de materiales líquidos y sólidos suspendidos en el aire. De manera general el material particulado contiene componentes inorgánicos como metales, orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos y materiales biológicos como polen y endotoxinas. La composición es una de sus características importantes pues diversos estudios han demostrado que esta cambia de manera espacio-temporal y que la abundancia de cada uno de los componentes varía acorde con las características de la zona y año de colecta. Con base en evidencia toxicológica y epidemiológica, el PM está clasificado como un carcinógeno para los humanos, principalmente asociado con el desarrollo de cáncer pulmonar. El PM puede ingresar en las vías respiratorias y depositarse a niveles profundos como los alvéolos. Con base en su diámetro aerodinámico se clasifican en PM₁₀, PM_{2.5} y PM_{0.1}. Su capacidad de penetración, aunada a su compleja composición, permite al material particulado ejercer efectos biológicos perjudiciales para la salud. A nivel celular, el PM induce la producción de moléculas inflamatorias, generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que causan estrés oxidante, y además genera diferentes tipos de daño en el DNA. Asociado a este daño genotóxico, trabajos recientes indican que el material particulado también puede desregular el funcionamiento de algunos mecanismos de reparación de DNA. Dentro de estos mecanismos encontramos la vía de reparación de bases mal apareadas (MMR), la cual está encargada de reparar daños de tipo endógeno que surgen en el DNA principalmente durante su replicación. Esta vía mantiene la estabilidad del genoma evitando la acumulación de mutaciones puntuales. En el mecanismo MMR participan las proteínas MSH2, MSH6 y MLH1, encargadas de reconocer y eliminar las lesiones del DNA, y la desregulación de estas moléculas se asocia al desarrollo de procesos carcinogénicos. Considerando que la composición del material particulado puede determinar respuestas diferenciales en las células, el objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto en la vía MMR, del material particulado de diferentes años de colecta (2004-2005 y 2017). Como hipótesis se tuvo que la exposición de células epiteliales de pulmón a material particulado (PM₁₀) induciría la disminución en los niveles de expresión y de proteína

de la vía de MMR (*hMLH1*, *hMSH2*, y *hMSH6*), además de alterar la translocación nuclear de las proteínas que conforman el complejo MutS α (*hMSH2/hMSH6*). Para evaluar esto, se utilizaron células A549 (derivadas de epitelio alveolar) expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24h en las cuales se evaluaron los niveles de expresión y de proteína de *hMSH2*, *hMSH6* y *hMLH1* mediante qRT-PCR y western blot respectivamente. Además, se determinó la localización subcelular del complejo MutS α conformado por el dímero de *hMSH2/hMSH6* por inmunofluorescencia. Primero caracterizamos ambas muestras de PM y encontramos que de manera general la concentración de metales de transición es mayor en las PM_{10} del 2017 que en aquellas del 2004-05. Observamos que las PM del 2004-05 inducen una disminución significativa de los niveles de proteína de *hMSH6* y *hMLH1*. Por otro lado, los niveles de expresión de *hMSH6* tendieron a aumentar tras la exposición a ambas muestras de partículas (no estadísticamente significativo). La expresión de *hMLH1* y *hMSH2*, así como los niveles de proteína de *hMSH2* no se vieron alterados por la exposición a ninguna de las muestras de PM_{10} . Finalmente encontramos un aumento en la señal fluorescente de *hMSH2* en el citoplasma y mediante densitometría vimos una disminución significativa de la señal nuclear de *hMSH6* y *hMSH2* (de 14.7% y del 12% para *hMSH6*, y del 13.9% y 13% para *hMSH2* con PM 2004-05 y PM 2017 respectivamente), ocurriendo esto tras la exposición a ambas muestras de PM_{10} . Con base en lo anterior concluimos que el material particulado es capaz de alterar a las proteínas del sistema MMR tanto en sus niveles como en su localización subcelular, pudiendo derivar en una deficiente capacidad de reparación de bases mal apareadas y bucles de inserción o delección del DNA surgidos durante procesos de replicación de este. De esta manera encontramos otro mecanismo molecular afectado por el PM el cual pudiera formar parte de las diferentes alteraciones causadas por este contaminante relacionadas a su potencial como un carcinógeno para humanos. A su vez concluimos que la composición de las PM varía con el tiempo, y de la misma manera varían los efectos que tiene sobre los componentes de la vía MMR, pues observamos efectos compartidos por ambas muestras de PM, así como efectos independientes de cada muestra.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La contaminación atmosférica

1.1.1 La atmósfera

La atmósfera es una mezcla de diferentes gases que rodea a la Tierra entre los que se encuentran principalmente el Nitrógeno en un 78% y oxígeno en un 21%, el 1% que resta se compone de diversos gases traza como el ozono, vapor de agua, dióxido de carbono, metano, entre otros. La atmósfera permite que se mantenga la temperatura del planeta de manera constante y filtra la radiación ultravioleta, por lo que sin ella sería imposible la vida como se conoce actualmente. (SEMARNAT, 2013). Cuando se presentan sustancias como polvo, humos, gases, y partículas que no forman parte de la composición natural de la atmósfera, y a concentraciones que pueden ocasionar daño tanto a la salud humana como al medio ambiente, ocurre lo que conocemos como contaminación del aire (EPA, 2004; Meo y Suraya, 2015). Dentro de los diversos contaminantes del aire, destacan los contaminantes criterio, que se ha comprobado son perjudiciales para la salud y los cuales se utilizan para evaluar la calidad del aire, dichos contaminantes son el dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), ozono (O₃), el plomo (Pb) y el material particulado PM₁₀ y PM_{2.5} (SEDEMA, 2015; EPA, 2017).

La contaminación del aire se asocia con afecciones en la salud entre las que se encuentran problemas respiratorios como tos, reducción de la función pulmonar, bronquitis y asma (INECC, 2015). A su vez se ha asociado con problemas cardiovasculares como isquemia, arterosclerosis, enfermedad coronaria e infarto del miocardio (Meo y Suraya, 2015). Además la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) clasificó a la contaminación atmosférica como carcinógeno del tipo I (IARC, 2016).

Por lo que en este trabajo nos enfocamos en el estudio del efecto del material particulado, el cual ha sido principalmente relacionado al desarrollo de cáncer de pulmón (Pope et al. 2002), sobre la alteración de los mecanismos de reparación del DNA, aportando así evidencias para profundizar en el conocimiento del potencial carcinogénico de este contaminante.

1.2 Material Particulado (PM)

1.2.1 Origen y composición del material particulado

El material particulado (PM) es una mezcla compleja de compuestos sólidos y líquidos suspendidos en el aire, presentes en diferentes tamaños, formas, composición y origen (Mühlfeld et al. 2008). De acuerdo a su origen podemos encontrar dos tipos de partículas, las primarias, provenientes de una fuente de emisión directa las cuales son liberadas hacia a la atmósfera (como metales o polvo resuspendido) y las partículas secundarias, generadas por procesos físico-químicos en el aire (como sulfatos o nitratos) (Falcon-Rodriguez et al. 2016). Por otro lado, de acuerdo a su diámetro aerodinámico, las partículas pueden dividirse en tres grupos representativos: partículas gruesas o PM_{10} con diámetro aerodinámico menor o igual a $10\ \mu m$, las partículas finas o $PM_{2.5}$ con diámetro aerodinámico igual o menor $2.5\ \mu m$ y las partículas ultrafinas con diámetro igual o menor a $0.1\ \mu m$ (Pope y Dockery 2006) (figura 1). Cabe destacar que las PM gruesas contienen a su vez a las partículas de menor diámetro siendo cada fracción parte de la anterior de mayor diámetro.

La fracción gruesa es producto principalmente de la re-suspensión de polvo, suelo y otros materiales de la corteza provenientes de la minería, volcanes, y ventiscas, por lo que contiene principalmente cristales, sales marinas y material biológico. Las partículas finas, son producidas principalmente por procesos de combustión (uso de gasolina, diésel, quema de leña, etc) y por reacciones secundarias entre compuestos gaseosos (óxido de nitrógeno y azufre). Y las partículas ultrafinas,

surgen de procesos de combustión y por reacciones fotoquímicas atmosféricas y suelen tener una vida media muy corta por lo que generalmente se encuentran formando agregados de mayor tamaño (Mühlfeld et al. 2008; Pope y Dockery 2006).

En general, el PM contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), de los que destacan por su impacto en la salud el benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno y por su abundancia el benzo(ghi)perileno; también contiene metales como el titanio, hierro, níquel, plomo, azufre, aluminio, cromo, manganeso, etc. Entre los materiales biológicos se encuentran las endotoxinas, el polen, esporas, bacterias y virus (Chirino et al. 2015). La presencia de estos compuestos dentro del material particulado es importante debido a que HAPs como el benzo(a)pireno y metales como el níquel o el cadmio son compuestos carcinogénicos capaces de causar alteraciones en el DNA; mientras que componentes como el polen, las endotoxinas y virus, son capaces de exacerbar respuestas inflamatorias en el organismo (Scanlon et al. 2017; Falcon-Rodriguez et al. 2016; Moorthy et al. 2015; Banerjee 2005).

Es relevante destacar que la proporción de los componentes mencionados, contenidos en el material particulado, puede variar de manera espacio-temporal, lo cual va asociado a diversas condiciones entre las que se encuentran la zona geográfica, la estación del año, y las características de la región que dependen de los fenómenos naturales y de las actividades antropogénicas que se desarrollan (Bell et al. 2007; Manzano-León et al. 2013; Chirino et al. 2015; Falcon-Rodriguez et al. 2016). Dicha variación entre los componentes del material particulado es relevante para los efectos inducidos por las PM en la salud. Por ejemplo, estudios realizados con muestras de PM de zonas rurales y urbanas colectadas en verano e invierno mostraron que el PM colectado en invierno tiene un potencial citotóxico mayor que aquel colectado durante el verano (Seagrave et al. 2006). A su vez, estudios realizados en la Ciudad de México han encontrado diferencias en la citotoxicidad y potencial inflamatorio de muestras de PM colectadas en el norte, centro y sur de la Ciudad de México (Alfaro-Moreno et al. 2002).

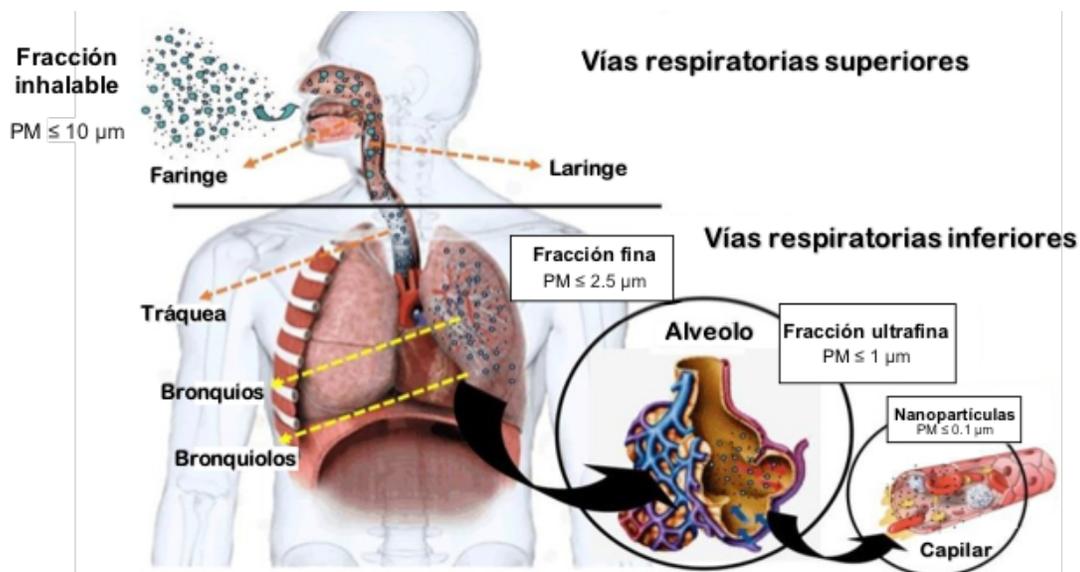


Figura 1. Diámetro aerodinámico de las partículas suspendidas. Las partículas con un diámetro aerodinámico igual o menor a $10 \mu m$ se conocen como fracción inhalable y pueden ingresar a las vías respiratorias profundas. De acuerdo a su diámetro aerodinámico las PM se dividen en fracción fina, ultrafina y nanopartículas, Siendo capaces incluso de llegar al nivel de alveolos y de internarse en capilares sanguíneos (Modificado de Barraza–Castelo, 2017).

1.2.2 Normas y regulación sobre la exposición a PM

Análisis de datos obtenidos por el Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) durante el periodo entre 2003-2015, han determinado una concentración promedio anual de $51.79 \mu g / m^3$ de PM_{10} y de $23.22 \mu g / m^3$ de $PM_{2.5}$ en la Ciudad de México (Mora et al. 2017), dichas concentraciones son mayores a las permitidas tanto por las normas mexicanas como por las normas establecidas a nivel internacional (Tabla 1). Esto es de importancia debido a que a pesar de que se conoce que no hay un umbral por debajo del cual el material particulado no ejerce efectos en la salud, el incremento en la concentración de este contaminante tiene efectos

adversos en la población expuesta, los cuales se discutirán mas adelante (Gurung, 2017; Ferreira et al. 2016).

Tabla 1. Valores límite permisibles de PM establecidos por la Norma Oficial Mexicana y la OMS

	México NOM-025-SSA1-2014	Organización Mundial de la Salud
Límite del promedio de 24 horas	<ul style="list-style-type: none"> • PM₁₀: 75 µg/cm³ • PM_{2.5}: 45 µg/cm³ 	<ul style="list-style-type: none"> • PM₁₀: 50 µg/cm³ • PM_{2.5}: 25 µg/cm³
Límite del promedio anual	<ul style="list-style-type: none"> • PM₁₀: 40 µg/cm³ • PM_{2.5}: 12 µg/cm³ 	<ul style="list-style-type: none"> • PM₁₀: 25 µg/cm³ • PM_{2.5}: 10 µg/cm³

1.3 Efectos del Material Particulado en la salud

El Aumento en los niveles de PM se han asociado a una mayor mortalidad general (Achilleos et al. 2017) y la OMS señalan que cada año cerca de 4.2 millones de muertes se deben a la contaminación atmosférica extramuros (OMS, 2018).

Los estudios epidemiológicos demuestran que la exposición aguda a material particulado se asocia a un aumento en el número de admisiones hospitalarias posteriores a incrementos desde 10 µg/m³ en los niveles de PM en el aire (Ferreira et al. 2016; Gurung et al. 2017); además se relaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como arritmias, infarto, hipertensión, y falla del corazón (Fiordelisi et al. 2017); enfermedades del sistema nervioso como autismo, fallas auditivas, trastornos psicológicos, enfermedades neurodegenerativas (Wang, 2017); así como una mayor incidencia de diabetes mellitus tipo dos (He et al. 2017). Especialmente la exposición a PM representa un riesgo para la salud mediante el desarrollo de enfermedades de vías respiratorias entre las que podemos mencionar el cáncer de pulmón (Pope y Dockery 2006; Zhou et al. 2017). En este sentido se ha demostrado que un aumento de 10 µg /m³ en las concentraciones de PM_{2.5} en el aire, se asocian con un aumento del 8% en la mortalidad por cáncer de pulmón

(Pope et al. 2002). A su vez se ha reportado que un incremento de $10 \mu\text{g} /\text{m}^3$ en la concentración de PM_{10} se asocia también a un incremento en la mortalidad por cáncer pulmonar del 3.4 % al 6% (Chen et al. 2016).

Además estudios publicados recientemente han reportado una correlación entre la concentración de PM_{10} con la incidencia de cáncer de pulmón (Zhou et al. 2017), mostrando que un incremento de $10 \mu\text{g} /\text{m}^3$ en la concentración de $\text{PM}_{2.5}$ se asocia con un riesgo de incidencia de este cáncer del 1.074 (Guo et al. 2016).

De acuerdo con evidencias epidemiológicas como las ya mencionadas y toxicológicas como su capacidad de ejercer daño genotóxico, el material particulado fue declarado como carcinógeno para humanos (agentes del grupo 1) por la IARC, esto significa que existe suficiente evidencia de carcinogenicidad en humanos, obtenida de estudios epidemiológicos en personas expuestas y en animales experimentales (IARC, 2016).

1.3.1 Efectos a Nivel celular

Mediante los estudios toxicológicos se conocen algunos de los mecanismos alterados por el material particulado, se ha reportado que induce la producción de procesos de inflamación al inducir la generación de moléculas pro-inflamatorias como lo son las interleucinas 1β , 6 y 8, y el factor de crecimiento tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) (Cachon et al. 2014; Alfaro-Moreno et al. 2002); estrés oxidante mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales son capaces de dañar macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos vitales de la célula mediante procesos de oxidación (Li et al. 2008; Pardo et al. 2016); y daño en DNA (Lepers et al. 2014; Garçon et al. 2006; García-Cuellar et al. 2002). Como parte del daño que generan las PM se ha demostrado que inducen la formación de aductos en el DNA (Lepers et al. 2014) incluyendo aductos de HAP's (Salcido-Neyoy et al. 2015) y de 8-OHdG (Garçon et al. 2006), además de la inducción de rompimiento de doble cadena (DSBs) (Sánchez-Pérez et al. 2009; Yang et al. 2016). Debido a que el daño, o la presencia de anomalías en el DNA puede inducir la muerte

celular y alteraciones como mutaciones, las cuales pueden dar lugar al desarrollo de un fenotipo carcinogénico en las células volviéndolas capaces de proliferar desmesuradamente e invadir otros tejidos dando lugar a neoplasias (Hanahan y Weinberg 2011; Lemjabbar-Alaoui et al. 2015), las células cuentan con mecanismos de reparación que vigilan y mantienen la estabilidad del genoma a través de la eliminación y corrección de las anomalías o errores que puedan surgir por la interacción del material genético con distintos agentes genotóxicos o incluso por errores durante procesos como la replicación de este (Torgovnick y Schumacher 2015). Los antecedentes han mostrado que algunos de los mecanismos de reparación pueden verse alterados tras la exposición a material particulado (Mehta et al. 2008; Hernández-Espinosa 2015; Alvarado-Cruz et al. 2017), pero no se ha profundizado en el estudio de este efecto.

1.3.2 Mecanismos de reparación del DNA

En general las vías de reparación se pueden dividir en: vías de escisión y vías de reparación de rompimientos de doble cadena. Dentro de las vías de escisión se encuentran la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER), la vía de reparación por escisión de bases (BER) y la vía de reparación de bases mal apareadas (MMR) (Gourzones-Dmitriev et al. 2013).

Como se mencionó anteriormente las PM pueden afectar estos mecanismos. Se ha reportado una disminución en la capacidad de reparación de NER posterior a la exposición a PM (Mehta et al. 2008). También se ha encontrado disminución en los niveles de proteínas que conforman la maquinaria de la vía BER (Mukherjee et al. 2014; Hernández-Espinosa 2015; Alvarado-Cruz et al. 2017), así como la inducción de cambios epigenéticos en algunos genes de reparación como PARP1, OGG1 y APEX en los que aumenta la metilación de dinucleótidos CpG en los promotores de dichos genes que participan en la vía de BER (Alvarado-Cruz et al. 2017). Dentro de las vías de escisión importantes para el mantenimiento del DNA también

se encuentra la vía de reparación de bases mal apareadas, sin embargo, no existen reportes sobre el efecto de las PM sobre dicha vía de reparación.

1.4 Vía de reparación de bases mal apareadas

1.4.1 Descripción general de la vía MMR

La vía de MMR es un mecanismo altamente conservado que juega un papel importante durante la replicación, reparación y recombinación, así como en la meiosis, y la maduración de inmunoglobulinas y su diversificación. Promueve la estabilidad genómica debido a que corrige errores de apareamiento de bases y bucles de inserción o deleción generados durante la replicación, recombinación y reparación del DNA. Estos errores pueden surgir cuando la DNA polimerasa incorpora la base errónea durante reacciones de procesamiento del DNA como su reparación y replicación. También se pueden generar cuando hay daño a precursores de nucleótidos, o se forman heterodúplex entre dos hebras de DNA homólogas durante procesos de recombinación (Li, 2008; Liu et al. 2017).

La vía MMR a su vez, puede participar en respuesta a otros tipos de daño induciendo un arresto del ciclo celular en respuesta a afecciones causadas por agentes alquilantes como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o MNNG (Stojic et al. 2004); puede participar en la vía de respuesta a daño al DNA (DDR), facilitando la activación de p53 y promoviendo la muerte celular por apoptosis (Peters et al. 2003) a su vez, puede inducir la activación de otras vías de reparación incluida la reparación de DSBs, BER, y entrecruzamiento de hebras (ICL) (Li, 2008; Liu et al. 2017).

En la vía MMR, los complejos proteicos MutS α (compuesto por las proteínas hMSH2/hMSH6), y MutS β (compuesto por hMSH2/hMSH3); se encargan de reconocer el daño a DNA. El primero reconoce y se une principalmente a bases mal apareadas, inserciones o deleciones de hasta 3 nucleótidos (nt). Mientras que

MutS β se une a inserciones o deleciones de hasta 13 nt. MutS α recluta a MutL α (hMLH1/hPMS2) formando un complejo tetramérico, el cual contiene una función de endonucleasa latente que es activada por PCNA. La activación de MutL α introduce cortes en ambas hebras de DNA, la asimetría de PCNA unido a DNA, dirige la incisión de forma específica sobre la hebra naciente de DNA. Tras el corte del DNA, la exonucleasa-1 (EXO1) es reclutada y activada por MSH2 y/o MLH1, y corta la nueva hebra de DNA sintetizado, este espacio es resintetizado por la DNA polimerasa- δ , la cual es estimulada por PCNA. Cuando la re-síntesis de la nueva hebra termina, el corte es unido por una proteína ligasa (Li, 2008; Liu et al. 2017). Este proceso es esquematizado en la figura 2.

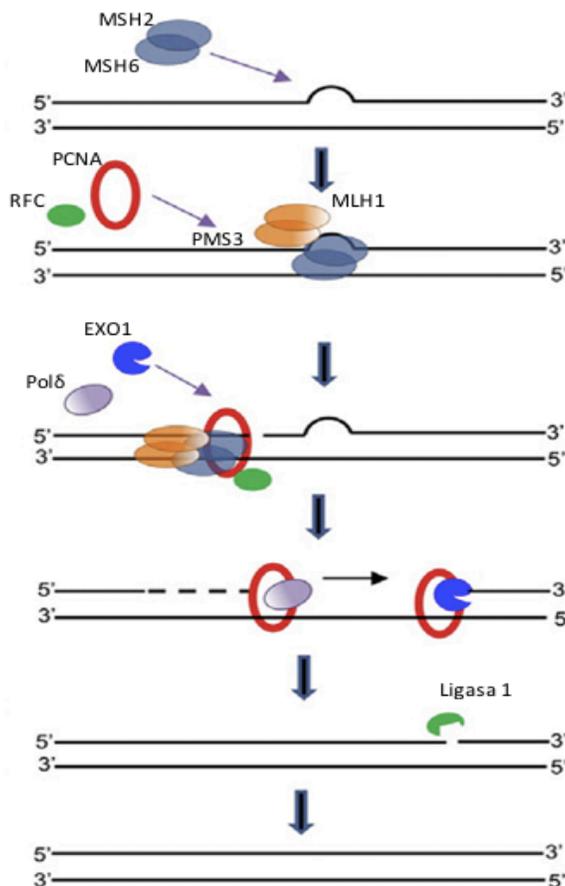


Figura 2. Esquema general del funcionamiento de la vía de reparación de bases mal apareadas.

El complejo MutS α reconoce al daño y se une a este en el DNA, reclutando al complejo MutL α formando un tetrámero. Esto induce el reclutamiento de PCNA y RFC, la interacción de estas proteínas induce la actividad latente de endonucleasa del complejo y dirige un corte en la hebra dañada.

Posteriormente la exonucleasa 1 degrada la sección del DNA con el daño, este gap es resintetizado por la DNA polimerasa δ y finalmente ambos extremos son ligados por la ligasa uno (Modificado de Liu et al. 2017).

1.4.2 Regulación de la vía de MMR mediante modificaciones postraduccionales

Se sabe que la vía de MMR se puede regular a nivel del complejo encargado de reconocer el daño, Mut α , formado por el heterodímero de hMSH6 y hMSH2, ya que estas proteínas son degradadas mediante la vía de proteosoma mediante su ubiquitinización (Hernandez-Pigeon et al. 2004).

Este proceso es mediado por la proteína HDAC6, la cual induce la degradación de MSH2, mediante la poli-ubiquitinización de cuatro residuos diferentes de lisina cuando MSH2 se encuentra en su estado monomérico. HDAC6 también puede desacetilar a MSH2 cuando se encuentra formando el complejo con MSH6, lo cual facilita la disociación de Mut α y permite la poliubiquitinación del monómero de MSH2 y su consecuente degradación vía proteosoma (Zhang et al. 2014). La modificación de MSH2 por HDAC6 puede ser revertida por la proteína USP10, la cual desubiquitina a MSH2, evitando su degradación y estabilizándola, lo que permite que prosiga el proceso de reparación mediado por esta vía (Zhang et al. 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que la fosforilación también juega un papel regulatorio debido a que inhibe la degradación de las proteínas del complejo Mut α . Se ha reportado que la isoforma PKC ζ puede fosforilar a MSH6 y MSH2 en residuos de treonina, lo cual evita la ubiquitinación de las proteínas de este complejo y por lo tanto inhibe su degradación vía proteosoma (Hernandez-Pigeon et al. 2005). Específicamente la fosforilación de MSH2 y MSH6 por PKC y CKII, permite la translocación a núcleo del complejo Mut α en presencia de daño e incrementa la capacidad de unión del complejo a las bases mal apareadas (Christmann et al. 2002). De manera contrastante, la fosforilación de MLH1 en el residuo S477 por la CKII, tiene un efecto inhibitorio en la proteína y como consecuencia disminuye la actividad de reparación de la vía (Weißbecher et al. 2018).

1.4.3 Defectos de la vía MMR y su impacto en la salud

La deficiencia de las vías de reparación de daño al DNA generan la acumulación de alteraciones genómicas; en especial las deficiencias de la vía de reparación de MMR puede causar un incremento de hasta 1000 veces la tasa de mutación celular (Kelley et al. 2014).

Se ha descrito que alteraciones de los genes de esta vía resultan en un fenotipo de inestabilidad microsatelital, el cual se caracteriza por la inserción o delección de nucleótidos en secuencias pequeñas y repetidas que se encuentran de manera aleatoria en el genoma, conocidas como microsatélites (Richman 2015; Ratti et al. 2018). Específicamente, portadores con mutaciones germinales en *hMLH1* y *hMSH2* presentan deficiencias en el funcionamiento de MMR tienen mayor probabilidad de desarrollar diferentes tipos de cáncer (Dowty et al. 2013), siendo esta condición denominada como síndrome de Lynch, también conocido como cáncer colorrectal hereditario no poliposo, el cual está caracterizado por conferir alto riesgo de desarrollar cáncer principalmente colorrectal, aunque también incrementa el riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer como el endometrial, gastrointestinal, en vías urinarias, piel y cerebro (Carethers y Stoffel, 2015).

Esta condición va asociada con que las alteraciones en los genes y proteínas de la vía MMR conducen a la falla en la detección de errores generados por la DNA polimerasa durante la replicación del DNA (Dowty et al. 2013; Carethers y Stoffel 2015; Forsström et al. 2017).

Además de la condición mencionada anteriormente, los estudios en pacientes con cáncer han mostrado hipermetilación en el promotor de *hMLH1* en tumores de pacientes con cáncer colorrectal asociado con bajos niveles de la proteína hMLH1 (Herman et al. 1998) y en relación con el cáncer pulmonar se han reportado niveles bajos en la expresión y proteína de *hMLH1* y *hMSH2*, específicamente en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), asociado a un desbalance alélico de

hMLH1 (Xinarianos et al. 2000) o bien asociado a la hipermetilación del promotor de *hMSH2* y *hMLH1* (Wang et al. 2003).

1.4.4 Alteraciones de la vía MMR por compuestos tóxicos

Como se mencionó anteriormente, no se han reportado efectos directos sobre la vía MMR a causa de la exposición a PM ambiental. Sin embargo diferentes contaminantes que pueden formar parte de la mezcla compleja que comprende el material particulado si han sido reportados como agentes capaces de alterar esta vía de reparación.

Se ha encontrado una asociación entre la disminución de los niveles de proteína de *hMSH2* y *hMLH1* en tumores de pacientes con NSCLC y el consumo de tabaco (Xinarianos et al. 2000). Entre los componentes del cigarro se encuentra el benzo(a)pireno, el cual tiene la capacidad de disminuir la actividad de la vía MMR, y de afectar negativamente la expresión de los genes de *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*, así como los niveles de proteína de este último, siendo esto el mecanismo clave para la disminución de la actividad de la vía (Chen et al. 2013).

El humo de leña, que se encuentra constituido principalmente por compuestos orgánicos volátiles dentro de los que encontramos a los HAPs (Simoneit 2002), es otro de los compuestos que puede afectar a la vía MMR, debido a que se ha encontrado que las células epiteliales de mujeres pre-menopáusicas expuestas crónicamente al humo de leña presentan una reducción significativa en los niveles de las proteínas *hMLH1* y *hMSH2*, siendo esto relacionado con la generación de estrés oxidante producido por la contaminación intramuros (Mukherjee et al. 2014).

Se ha observado que algunos metales tienen un efecto negativo sobre la vía MMR. Específicamente el níquel y el arsénico reprimen al promotor del gen *hMLH1* en líneas celulares de epitelio de pulmón (A549, BEAS-2B), y la represión se mantiene de forma sostenida si la exposición a arsénico es prolongada (Scanlon et al. 2017). Por otro lado, el cadmio inhibe la expresión génica, disminuye los niveles de proteína de *hMSH6* y reduce su capacidad de unión a los sitios de bases mal apareadas (Hsu et al. 2010).

Con base en lo anterior y siendo que estos contaminantes pueden formar parte de la composición de la contaminación atmosférica, específicamente del material particulado, y siendo que este último ya se ha reportado como un agente capaz de alterar diferentes mecanismos de reparación de daño al DNA tanto a nivel de expresión, actividad, e incluso epigenético (Mehta et al. 2008; Hernández-Espinosa 2015; Alvarado-Cruz et al. 2017), es importante evaluar el efecto de este contaminante del aire sobre la reparación del DNA. Una de las vías más importantes para esta reparación es la vía MMR sobre la cual existen indicios que puede verse afectada tras aumentos en los niveles de PM intramuros (Mukherjee, Dutta, et al. 2014) sin embargo, estos resultados no son concluyentes respecto del efecto de este contaminante sobre dicha vía de reparación, por lo que es de interés determinar si las PM_{10} afectan a este sistema.

2. JUSTIFICACIÓN

El material particulado, ha sido clasificado como un carcinógeno para humanos del grupo 1, y se ha asociado a una mayor mortalidad por cáncer de pulmón, del cual mueren cerca de 1.6 millones de personas al año. Si bien, existe evidencia epidemiológica y toxicológica que describe la participación de las PM como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer, aún falta por entender muchas de las alteraciones celulares que inducen las PM, las cuales puedan favorecer el desarrollo de cáncer.

Importantemente, el material particulado induce daño al DNA y se sabe que afecta el funcionamiento de las vías de reparación como la vía de NER y BER. Una falla en la reparación de daño en el material genético podría incrementar la tasa de mutación y generar un número mayor de alteraciones a nivel de genes o cromosomas, las cuales podrían favorecer el desarrollo de un proceso carcinogénico.

La vía de MMR es uno de los principales mecanismos de reparación, ya que se encarga de reparar errores generados durante la replicación del DNA y cuando esta vía se encuentra desregulada o presenta fallas, la tasa de mutación puede aumentar hasta 1000 veces. Sin embargo, no se ha estudiado directamente si el material particulado induce alteraciones en los genes y proteínas que participan en dicha vía. Por lo tanto, en este trabajo se tiene como fin investigar el impacto diferencial que tienen las PM₁₀ colectadas en dos diferentes años, en la expresión génica y en los niveles de proteína de hMLH1 hMSH2 y hMSH6, de la vía de reparación MMR, en células epiteliales de pulmón humano, así como en la translocación nuclear del complejo que reconoce al daño en el DNA.

3. HIPÓTESIS

La exposición de células epiteliales de pulmón a material particulado (PM₁₀) muestreado en dos diferentes años (2004 y 2017) en la Ciudad de México, inducirá la disminución en los niveles de expresión de los genes *hMLH1*, *hMSH2*, y *hMSH6* y de sus proteínas, alterando la localización subcelular de las proteínas que conforman el complejo MutSα.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General: Evaluar cambios en la expresión génica de *hMLH1*, *hMSH2*, y *hMSH6* y en los niveles de sus proteínas correspondientes; así como la localización subcelular del complejo MutSα en células epiteliales de pulmón expuestas a muestras de PM₁₀ de dos diferentes años de muestreo colectadas en la Ciudad de México

4.2 Objetivos Particulares:

- Caracterizar la composición elemental de las muestras de material particulado colectadas a lo largo de dos distintos años (2004-05 y 2017) en la Ciudad de México y determinar si existen diferencias entre ambas.

En células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ colectadas en la CDMX en dos años diferentes:

- Evaluar los niveles de mRNA de *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*.
- Evaluar los niveles de proteína de hML1, hMSH2 y hMSH6.
- Determinar la localización subcelular del complejo MutSα
- Comparar el efecto que tiene la exposición a material particulado de dos años distintos.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 *Colecta de partículas PM₁₀*

El material particulado utilizado para el desarrollo de este trabajo fue colectado en la Ciudad de México durante dos periodos: el primero desde septiembre del 2004 hasta mayo del 2005, y el segundo durante todo el año 2017. La colecta de partículas se realizó con un colector de grandes volúmenes (GMW modelo 1200 VFCHVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA) con una velocidad de flujo de 1.13m³/min y las partículas fueron capturadas en soportes con membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 3 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany). Después de la colecta, las membranas fueron removidas y se mantuvieron a una temperatura de 4°C en oscuridad. Las PM se recuperaron mediante el raspado de las membranas utilizando un bisturí estéril. Las partículas recuperadas fueron almacenadas en viales de vidrio estériles y libres de endotoxinas y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta el momento de su utilización.

5.2 *Análisis de la composición de las muestras de PM₁₀*

Cada una de las muestras de PM utilizadas fueron caracterizadas para obtener las concentraciones de los distintos elementos presentes dentro de cada una.

El material particulado muestreado entre los años 2004 y 2005 se caracterizó mediante la técnica de emisión de rayos-X inducidos por partículas (PIXE) utilizando un rayo de protones de 2.2 MeV producido por un acelerador Pelletron 9SDH-2 (National Electrostatics Corp., Middleton, WI, USA) en el Instituto de Física de la UNAM, como se describe en (Sánchez-Pérez et al. 2014).

Posteriormente la muestra de PM obtenida durante el año 2017 fue caracterizada por medio de fluorescencia de rayos-X (XRF) con un espectrómetro de rayos X desarrollado en el Instituto de Física de la UNAM, utilizando tubos de rayos X de Rh y W, (Oxford Instruments, EUA), así como un detector Amptek Si-PIN (con una

resolución 160 eV a 5.9 keV). El tubo opero a 50kV y una corriente de 250 μ A. la irradiación de cada muestra se hizo durante 900 s y por triplicado. La calibración de los sistemas de detección se realizó mediante la irradiación a los patrones elementales de película delgada (MicroMatter, Deer Harbor, WA, EUA), irradiados por 300 s. Las muestras se prepararon colocando en un cuadro de Mylar® de 4x4 cm², una gota de grasa Apiezon® L diluida con tolueno (1 g /10 mL) que se dejó secar por 1 h. Posteriormente se adhirió aproximadamente 1 mg de PM y se colocaron en marcos de transparencia. Las muestras se irradiaron en vacío a 45°. La radiación captada se transformó en pulsos electrónicos mediante un amplificador acoplado a un analizador multicanal (Ortec, USA). Los espectros se analizaron a través del programa de sistema de análisis cuantitativo de rayos X (QXAS Versión 3.6) del Organismo Internacional de Energía Atómica, para XRF, con acceso libre y se comparó con los patrones calibrados.

5.3 Cultivo celular de la línea A549

Este trabajo se desarrolló con la línea celular A549 (línea celular de tipo epitelial derivada de un adenocarcinoma pulmonar) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, No. CCL-185). Las células fueron cultivadas conforme lo recomendado por la ATCC, en medio de cultivo F12K (Gibco, No. 21127-022), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco, No. 160000) a 37°C en una atmósfera con una concentración de CO₂ del 5%.

5.4 Exposición a Material particulado (PM₁₀)

Se sembraron 90,000 y 300,000 células en placas de 12 pozos (3.8 cm²) y de 6 pozos (10 cm²) respectivamente. Una vez transcurridas 24 horas desde el

sembrado, cuando las células se encontraban a un 70% de confluencia, se realizó el cambio de medio de cultivo a las células. Las PM₁₀ a utilizar se esterilizaron en autoclave y resuspendieron en medio F12K+10% de SFB obteniendo una concentración de 1mg/ml. Esta mezcla se agitó con vórtex y posteriormente se añadió el volumen necesario al pozo con las células A549 llevando a una concentración final de 10 µg/cm². Las células fueron mantenidas en incubación por 24 horas. De manera paralela, como control se mantuvieron cultivos sin exponer en las mismas condiciones.

5.5 Extracción de RNA

Posterior a la exposición a PM₁₀ durante 24 horas, se extrajo el RNA total usando TRIZOL (Ambion, No. 15596018) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) como indica el siguiente protocolo:

Se retiró el medio de cultivo de cada pozo, las células fueron lavadas con 1 ml de PBS, se retiró el PBS, se añadió 1ml de TRIZOL, y se raspó el pozo con la punta de una pipeta, el contenido de cada pozo fue colocado en tubos de 1.5 ml e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se añadieron 200 µl de cloroformo (SIGMA, C-2432) a cada tubo, y estos se agitaron fuertemente por 15 segundos para luego ser incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm a 4°C por 15 minutos. Se recuperó cuidadosamente la fase acuosa (superior) y se transfirió a un nuevo tubo. A cada tubo se añadieron 500 µl de isopropanol (SIGMA, I9516) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos, para su posterior centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 ml de etanol al 70% (EMD Millipore Corporation, No. 1.08543.0250) y se resuspendió el botón en vortex. Los tubos fueron centrifugados nuevamente a 7,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en

40 µl de agua libre de RNAsas, se calentaron las muestras a 60°C por 10 minutos, y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.6 Cuantificación y análisis de integridad de RNA

La cuantificación y pureza del RNA (índice 260/280) se realizó en un espectrofotómetro (Nanodrop™ 2000, Thermo Scientific Wilmington, DE, USA) mediante el análisis de 1 µl de cada muestra.

La integridad del RNA se evaluó mediante la electroforésis, en geles de agarosa al 1.5% a 100 V por 45 minutos con 300 ng de RNA de cada muestra. Los geles fueron observados en un transiluminador (UVP ChemiDoc-It^{TS3} Imager) para valorar la integridad del RNA. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.7 Síntesis de cDNA y qPCR

Una vez obtenidos los datos de concentración e integridad del RNA, se calculó la cantidad de RNA necesaria para la realización de la reacción de la retrotranscriptasa, y los volúmenes necesarios de los componentes del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), se diseñó el programa para la síntesis de cDNA en el termociclador (Axygen Maxygene), y el programa para la amplificación por qPCR del software de Applied Biosystems.

5.8 Síntesis de cDNA

Se descongelaron los componentes: 10X RT Buffer, RT Random Primers y 25X dNTP Mix (100mM), se mezclaron y se centrifugaron rápidamente y se colocaron en hielo hasta su uso. Se tomaron 300 ng de RNA de cada muestra y se llevaron a un volumen final de 10 µl con agua libre de RNAsas manteniéndose en una gradilla refrigerada a -20°C.

Cada reacción se preparó añadiendo los componentes de la siguiente manera: agua libre de nucleasas (3.2 µl), 10X RT Buffer (2 µl), 25X dNTP Mix 100mM (0.8 µl), 10X RT Random Primers (2 µl), inhibidor de RNasa (1 µl), MultiScribe™ Reverse

Transcriptase (1 μ l), para un volumen total de 10 μ l por reacción. Estos últimos 10 μ l de RT Master mix 2X se agregaron a cada tubo con 10 μ l de RNA, se mezclaron las muestras en un vortex y se centrifugaron brevemente.

Los tubos con la Master mix 2X y el RNA se colocaron en un termociclador siguiendo el siguiente programa: 10 min a 25°C; 120 min a 37°C; y 5 min a 85°C. El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

5.9 Determinación de la expresión de *hMSH2*, *hMSH6* y *hMLH1* por qRT-PCR

Se realizó cada reacción con los siguientes componentes: agua libre de nucleasas (6.8 μ l), TB Green Advantage Premix 2X (10 μ l), PCR forward Primer 10 μ M (0.4 μ l), PCR Reverse Primer 10 μ M (0.4 μ l) (Tabla 2), ROX Reference Dye LSR 50X (0.4 μ l), para un volumen final de 18 μ l. La mezcla se preparó en un tubo dependiendo el número total de muestras a evaluar por cada gen.

Se tomó el volumen necesario de la mix para hacer cada muestra por triplicado en un tubo nuevo, posteriormente se adicionaron 6 μ l de cDNA (5 ng/ μ l), para un volumen final de 60 μ l. Estos tubos se mezclaron y centrifugaron rápidamente y se colocaron 20 μ l de la mezcla en cada pozo correspondiente, en una placa de 96 pozos o en tiras de 8 tubos (Applied Biosystems REF 4346906 y REF 4358293). Estos se centrifugaron a 1,200 rpm por dos minutos antes de taparse la placa o la tira de tubos, revisando que no hubiera burbujas en el volumen de reacción, y centrifugando de nuevo por 1 minuto a la misma velocidad.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador Step One Plus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems, dando inicio al programa y el análisis. Las secuencias de primers utilizados para cada gen se encuentran descritas en la tabla 2. El programa utilizado para evaluar la expresión de los tres genes consistió en las siguientes etapas: desnaturalización (1 ciclo de 95°C por 10s); amplificación (35 ciclos con una etapa de 95°C por 15 s y una segunda etapa de 60°C por 60s); y disociación (1 ciclo con una etapa de 95°C por 15 s, otra de 60°C por 60 s, y otra de 95°C por 15 s).

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados para qRT-PCR

<i>hMSH2</i>	Sentido	5'- AGA GAC AGG TTG GAG TTG GG -3'
	Antisentido	5'- GTC TCC AGC AGT CTC TCC TC -3'
<i>hMSH6</i>	Sentido	5'- TGG TGG CTC TGA TGT GGA AT -3'
	Antisentido	5'- AGA GCC ATT TCC AGT CAC CA -3'
<i>hMLH1</i>	Sentido	5'- CAG GCC ATT GTC ACA GAG GA -3'
	Antisentido	5'- CCC GAT GTC TCT TTC TGG GG -3'
<i>GAPDH</i>	Sentido	5'- GCA AAT TCC ATG GCA CCG TC -3'
	Antisentido	5'- AGC ATC GCC CCA CTT GAT TT -3'

5.10 Extracción de proteínas totales

Se sembraron 300,000 células A549 en placas de seis pozos, y se expusieron a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} durante 24 horas. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de proteínas totales de cada pozo de la siguiente manera:

Se aspiró el medio de cultivo de cada pozo y se lavó con 1ml de PBS, el cual se removió dejando el pozo seco. Se añadieron 120 μl de buffer de lisis (realizado para 100 ml de la forma: 4ml de TRIS 0.5M + 15ml NaCl 1M+1ml IGEPAL + 80ml H_2O) más un inhibidor de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific REF: 78440) en cada pozo Siendo el volumen del inhibidor usado de 10 μl por cada 1ml de buffer de lisis. La placa se colocó en hielo en agitación constante por 10 minutos. Posteriormente se raspo la superficie de cada pozo y se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml, el cual fue centrifugado por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se recuperó en nuevos tubos, y se realizaron alícuotas para evitar la contaminación. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.11 Cuantificación de proteínas totales

Se prepararon las muestras tomando 1 μl del extracto de proteína y adicionando 9 μl de Tris 10mM pH 7.4, la cuantificación se realizó por triplicado utilizando el kit

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific No. 23227). En una placa de 96 pozos, primero se cargó por triplicado la curva de albúmina de suero bovino (BSA) (de 1.25, 2.5, 5 y 10 µg/µl) la cual se obtiene de la dilución seriada de ampollitas de albúmina a 2mg/ml, posteriormente se cargaron 10 µl de cada muestra por triplicado. A cada pozo se agregaron 200 µl de reactivo de trabajo (BCA+ CuSO₄ en relación 100:2). La placa se calentó a 90°C por 10 minutos, dejándola enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se analizó la concentración de proteína haciendo uso del lector de placas Tecan Infinite M200 PRO, y leyendo las muestras a una longitud de onda de 570 nm.

5.12 Determinación de niveles de proteína de hMSH2, hMSH6 y hMLH1

La evaluación de los niveles de proteína de hMSH2, hMSH6 y hMLH1, se realizó mediante ensayos de Western Blot.

Los extractos de proteína obtenidos se corrieron por electroforesis en geles de acrilamida (Bio-Rad No. 1610156) usando un gel separador al 12% y un gel concentrador al 5%, cargando 25 µg de proteína en conjunto con los volúmenes necesarios de Tris 10 mM pH 7.4 y de Buffer Laemmli 5% (Bio-Rad, No. 161-0737) con 5% de 2-Mercaptoetanol (BME) para obtener una relación 1:1 entre el volumen de proteína/Tris y el buffer Laemmli/BME. Posteriormente las muestras fueron sometidas a electroforesis en los geles previamente preparados, con buffer Tris/Glicina/SDS (Bio-Rad No.161-0772) durante 1:30 horas para hMSH2 y hMLH1 y por 2 horas para hMSH6, a un voltaje de 170 V.

Posteriormente se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF con un poro de 0.45 µm, estabilizada con buffer de transferencia (Tris/Glicina/Metanol/H₂O), con ayuda del equipo Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, No. 1704150) a un voltaje de 25 V con amperaje menor a 1.0 A por 30 minutos. Posteriormente la membrana se bloqueó con una dilución de leche en polvo baja en grasa al 5% en TBS (Bio-Rad No.170-6435) + 0.1%Tween (Golden Bell Reactivos

No. 25610) (TBST) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posterior a esto se incubó la membrana con el anticuerpo primario de la proteína a evaluar; hMLH1 con una dilución 1:1000 (Cell Signaling, 4C9C7, Mouse mAb 3515), hMSH2 diluido 1:1000 (Cell Signaling, D24B5, XP, Rabbit mAb 2017), o hMSH6 igualmente en dilución 1:1000 (Cell Signaling, 3E1, Mouse mAb 12988), en leche al 5% y en agitación constante a 4°C durante toda la noche (12-16 horas). Después de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBST en agitación, y se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón (Amersham, NXA931) en caso de hMLH1 o hMSH6, o el anticuerpo secundario anti-conejo (Amersham, NA934) en caso de hMSH2, por 1 hora a temperatura ambiente en agitación a una dilución 1:3000 en leche baja en grasa al 5% en TBST. Se realizaron 3 lavados con TBS+Tween 0.1% (TBST) de igual duración y se realizó el revelado de la membrana haciendo uso del kit Millipore Immobilon Western (HRP Substrate Peroxide Solution y HRP Substrate Luminol Reagent), el revelado se llevó a cabo en el fotodocumentador (UVP ChemiDoc-It^{TS3} Imager) con un 56% de enfoque, y una apertura de f0.95, sin usar ninguna fuente de luz ni filtro para poder observar las proteínas de interés.

Posteriormente al revelado de la proteína de interés se llevó a cabo la incubación y revelado de la proteína control. Como control de carga se utilizó GAPDH, siendo determinada tras un lavado de la membrana de 15 minutos con TBST a temperatura ambiente, repitiendo el procedimiento anterior desde el bloqueo de la membrana, utilizando el anticuerpo primario para GAPDH (Santa Cruz Biotechnology No. sc-32233) y el anticuerpo secundario (anti-ratón), ambos en una dilución 1:3000 en leche baja en grasa 5% en TBST, incubados por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

5.13 Detección subcelular de hMSH6 y hMSH2 por inmunofluorescencia

Para evaluar la localización subcelular del complejo MutS α se realizó una co-inmunofluorescencia entre hMSH2 y hMSH6 (proteínas que componen dicho complejo).

Primero se sembraron 18,000 células (A549) de la manera previamente descrita en laminillas de 8 pozos (Thermo Fisher Scientific #177402), y después de 24 h, se expusieron a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} durante 24hrs.

Transcurridas las 24 hrs de exposición, se removió el medio de cultivo de cada pozo, y se realizó un lavado de cinco min en agitación con PBS, posteriormente se retiró el PBS y se fijaron las células con una solución de formaldehído al 4% en TBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Tras la fijación se realizó un lavado con TBS por cinco min, y se permeabilizaron las células con una solución de Tritón al 0.5% en TBS durante cinco minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron tres lavados de cinco min con TBS en agitación. Después, para evitar autofluorescencia se agregó una solución de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich #480886) al 0.1% en TBS por cinco min. Subsecuentemente se procedió a realizar el bloqueo de la laminilla añadiendo una solución de bloqueo [albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en TBS + Suero de caballo 10%], posteriormente se removió la solución, se realizó un lavado con TBS y se añadió el anticuerpo primario para hMSH2 (Cell Signaling, D24B5, XP, Rabbit mAb 2017) a una dilución 1:100 en BSA al 1%, dejando incubar el anticuerpo a 4°C durante toda la noche (12-16 horas). Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS y se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 488 (Jackson Inmuno Research, 115-545-144) a una dilución 1:200 en BSA 1% durante una hora, en agitación, a temperatura ambiente y protegiendo la laminilla de la luz.

Posteriormente se realizaron otros tres lavados con TBS y se incubó el anticuerpo primario para hMSH6 (Cell Signaling, 3E1, Mouse mAb 12988) a una dilución 1:100 en BSA 1%, en agitación, a 4°C durante 12-16 horas con la laminilla protegida de la luz. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS protegiendo de la luz la laminilla, y se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 594 (Jackson Inmuno Research, 715-585-151) a una dilución 1:200 en BSA 1% en agitación a temperatura ambiente, protegido de la luz durante una hora. Finalmente se realizaron otros tres lavados con TBS tras retirar el anticuerpo secundario, se dejaron secos los pozos y se retiraron, dejando solo las células fijadas en la laminilla, ésta se limpió bien con etanol al 70% y se le aplicó medio de montaje con

DAPI (Invitrogen #P36935) suficiente y se le colocó un cubreobjetos limpio encima, procurando evitar la formación de burbujas y esparciendo bien el medio de montaje, posteriormente la laminilla se conservó a 4°C durante una noche (12:16 horas) y posteriormente se limpió el exceso de medio y se fijó el cubreobjetos a la laminilla con barniz transparente comercial. Una vez seco el barniz, la laminilla fue observada con ayuda de un microscopio de fluorescencia Axio imager.D2 (Carl Zeiss), se tomaron fotografías de los diferentes tratamientos y posteriormente se analizaron los niveles de fluorescencia con ayuda del software ImageJ para evaluar de manera semi-cuantitativa los niveles de proteína nuclear.

5.14 Análisis estadístico

Todos los experimentos en los que se trabajó con células cultivadas in vitro (5.3 – 5.13) se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de variancia de ANOVA de una vía, tomando en cuenta la media obtenida de los resultados de las tres replicaciones de cada experimento. La media de los grupos expuestos a PM₁₀ se comparó con la media obtenida de los controles respectivos de cada experimento. Se utilizó el ajuste de Bonferroni para corregir para múltiples comparaciones, y evitar falsos positivos. Siendo estadísticamente significativas las diferencias entre los grupos cuando $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software Prism 7 para Mac OS X.

6. RESULTADOS

6.1 La composición elemental del material particulado varía de acuerdo con el tiempo

Se realizó la comparación de los datos de componentes elementales entre los dos periodos muestreados en diferentes años (PM_{10} 2004-2005 y PM_{10} 2017), obtenidos mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X (XRF).

Encontramos que las muestras difieren significativamente en la concentración de distintos elementos (tabla 3). Dentro de los elementos de interés debido a su carcinogenicidad (REF), encontramos diferencias en cuanto a la concentración de metales de transición específicamente Ni, Fe, Cu, Cr, Pb y Ti, que se encuentran en una concentración mayor en las PM_{10} colectadas el 2017 comparado con las PM_{10} del periodo 2004-05 (figura 3).

Tabla 3. Concentración en unidades de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de elementos presentes en ambas de las muestras de PM_{10} utilizadas.

	Al	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mn	Ni	P	Pb	S	Si	Ti	Zn
PM_{10} 2004-05	17	15	0.04	0.3	10.1	4	0.3	0.03	0.5	0.2	5	51.1	1.3	0.5
PM_{10} 2017	7.76	26.35	0.06	0.79	21.86	4.97	0.35	0.1	0.38	0.68	10.8	25.98	2.35	0.87

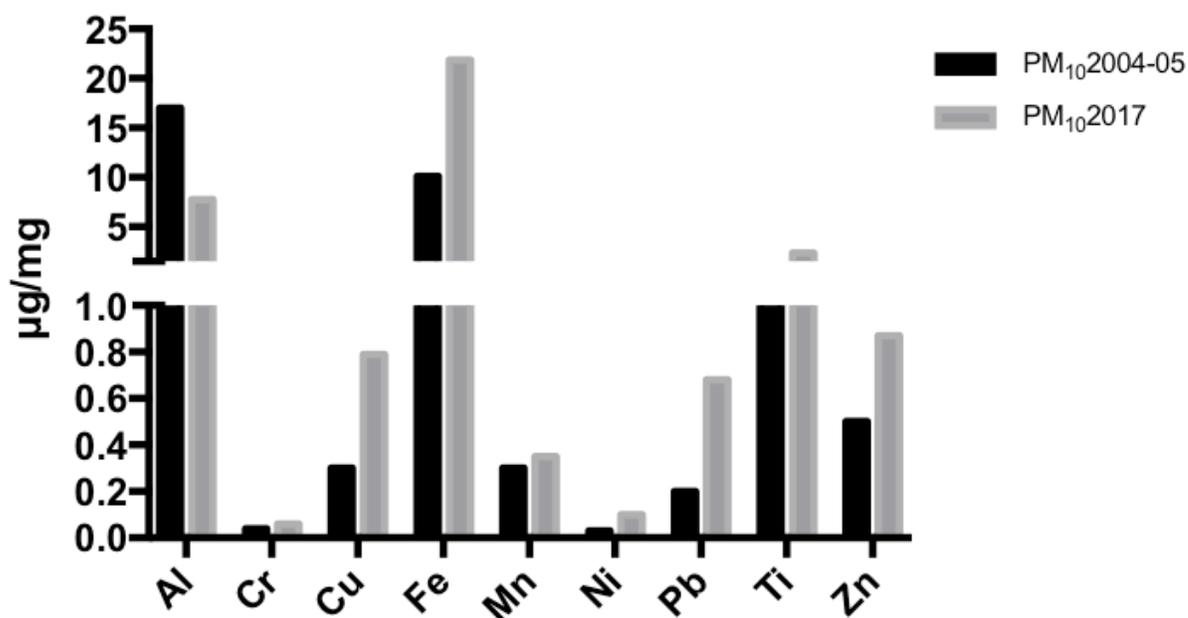


Figura 3. La concentración de los distintos metales presentes en las PM varía con el tiempo. Se realizó una comparación de datos de concentración de μg de elemento por cada mg de PM_{10} obtenidos mediante la técnica de PIXE. Se encontró que los metales de transición (Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Ti y Zn) así como el Pb se encuentran en mayores concentraciones en las PM del año 2017 a comparación de aquellas muestreadas colectadas durante el periodo de 2004-2005. El Aluminio es el único metal presente en las PM con mucha mayor representación en la muestra del 2004-05 que en las colectadas en el 2017.

6.2 El material particulado no afecta los niveles de mRNA o proteína de hMSH2

Evaluamos el efecto del material particulado sobre la expresión génica de *MSH2* (encargada de identificar el daño al DNA (Liu et al. 2017) en células A549 expuestas a PM₁₀ del 2004-05 y del 2017 durante 24 hrs a 10µg/cm². Se observó que la exposición a ambas muestras de material particulado no induce cambios significativos en los niveles de mRNA del gen *MSH2* (Figura 4A). Para observar si las PM tienen un efecto a nivel proteico sobre hMSH2 se evaluaron los niveles totales de proteína mediante Western blot, sin encontrar cambios significativos tras la exposición a ambas muestras de PM₁₀ (figura 4B).

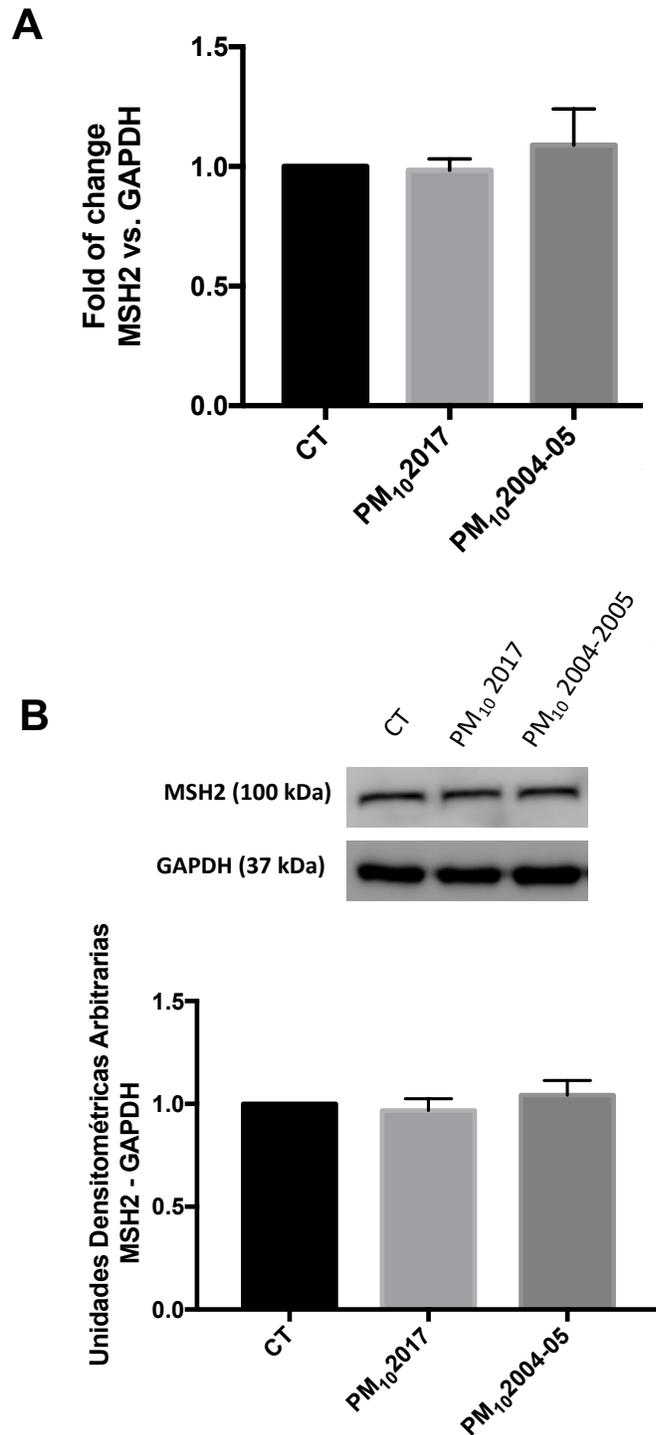


Figura 4. Las PM₁₀ no inducen cambios de los niveles de expresión ni proteína de hMSH2. Las células A549 fueron expuestas durante 24 hrs a PM₁₀ del 2004-05 y del 2017 a una concentración de 10 µg/cm² **A)** Se evaluaron los niveles de mRNA de hMSH2 por qRT-PCR, no se observaron cambios en la expresión tras la exposición a PM₁₀ (N=3). **B)** Se evaluaron los niveles de proteína de hMSH2 mediante Western Blot, no se encontraron cambios significativos en los niveles de proteína tras la exposición a PM₁₀ de ninguno de los periodos de colecta (N=3).

6.3 El material particulado disminuye los niveles de proteína de hMSH6

Se evaluó el efecto del material particulado en hMSH6, el otro componente necesario para la formación del complejo MutS α (Liu et al. 2017), analizándose de igual manera tanto los niveles de mRNA como de proteína. Se encontró una tendencia al incremento en los niveles de expresión de *MSH6* posterior a las 24h de exposición, tanto con PM₁₀ del 2004-05 y del 2017 (figura 5A), sin embargo, dicha tendencia no resultó significativa estadísticamente ($p > 0.05$).

Pero contrario a lo observado en la expresión génica, la exposición a PM₁₀ del año 2004-05 indujo de forma significativa una disminución en los niveles de proteína de hMSH6 (** $p = 0.0091$ vs. control), sin embargo, la exposición a PM₁₀ del 2017 no causó un cambio significativo en los niveles de esta proteína (figura 5B).

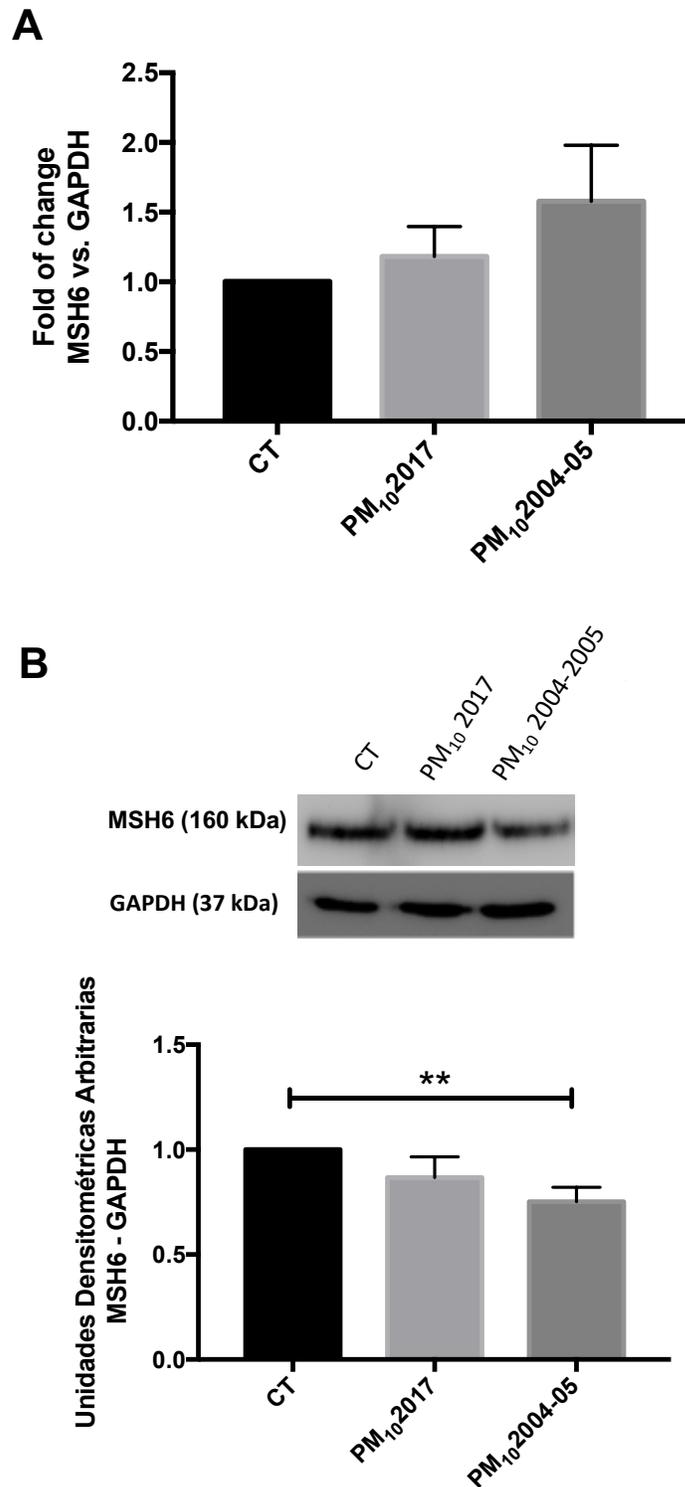


Figura 5. Las PM₁₀ inducen una disminución de los niveles de proteína de hMSH6. Células A549 fueron expuestas durante 24 hrs a PM₁₀ colectadas el 2004-05 y el 2017 a una concentración de 10 µg/ cm². **A)** Mediante qPCR se evaluaron los niveles de mRNA de hMSH6 y se observó un aumento en la expresión tras la exposición a ambas muestras de PM₁₀ sin embargo, dicho aumento no fue significativo (N=3). **B)** Se evaluaron los niveles de proteína de hMSH6 mediante Western Blot, y se observó que la exposición a PM₁₀ 2004-05 induce una disminución en el nivel de proteína de hMSH6 (** p = 0.0091, N=3).

6.4 El material particulado disminuye los niveles de proteína hMLH1 sin cambiar los niveles de mRNA

Una vez evaluados los efectos del material particulado en las proteínas y genes responsables de la formación del complejo MutS α , decidimos evaluar el efecto en hMLH1, uno de los componentes del complejo efector de la vía MMR, necesario para la reparación del daño al DNA tras su reconocimiento.

Se observó que las PM₁₀ de los años 2004-05 y 2017 no cambian la expresión del gen de *MLH1* posterior a 24h de exposición (figura 6A) pero si disminuye significativamente los niveles de la proteína hMLH1 (*p = 0.0491 vs. control) tras la exposición a PM₁₀ del 2004-05, mientras que la exposición a PM₁₀ del 2017 no induce cambios en los niveles de esta proteína (figura 6B).

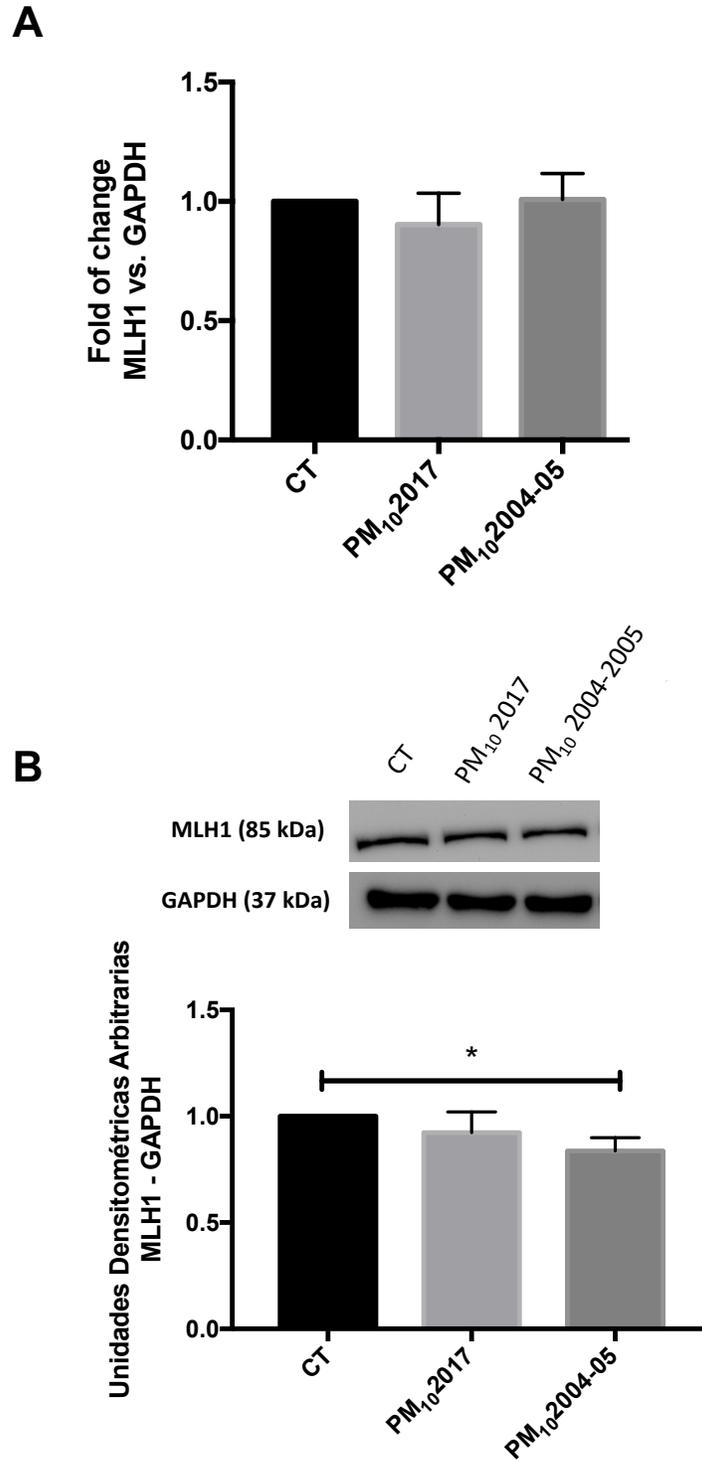


Figura 6. Las PM₁₀ inducen disminución de los niveles de la proteína de hMLH1. Las células A549 fueron expuestas durante 24 hrs a PM₁₀ colectadas el 2017 y a PM₁₀ del 2004-05, a una concentración de 10 µg/ cm². **A)** Se evaluaron los niveles de mRNA de hMLH1 por qRT-PCR, y no se observaron cambios en la expresión tras la exposición a PM₁₀ (N=3). **B)** Se evaluaron los niveles de proteína de hMLH1 mediante Western Blot, se observó que la exposición a PM₁₀ colectadas en 2004-05 indujo una disminución en el nivel de proteína de hMLH1 (*p = 0.0491, N=3).

6.5 La exposición a PM₁₀ altera la distribución de las proteínas hMSH2 y hMSH6 disminuyendo sus niveles en núcleo

Mediante inmunofluorescencia, se observó un aumento de hMSH2 (verde) en el citoplasma de células expuestas a PM₁₀ de ambos años de colecta (Figura 7A). Si bien no se observaron cambios obvios en los niveles nucleares de hMSH2 como de hMSH6 (rojo), al realizar el análisis de la intensidad de la señal nuclear de hMSH2 y hMSH6 por densitometría, y se encontró que la exposición tanto a PM₁₀ del 2004-05 como del 2017 disminuye significativamente los niveles nucleares de ambas proteínas (**p = 0.0026 y **p = 0.0036 respectivamente para hMSH2; y **p=0.0015 y **p= 0.0041 para hMSH6) (figura 7B y 7C).

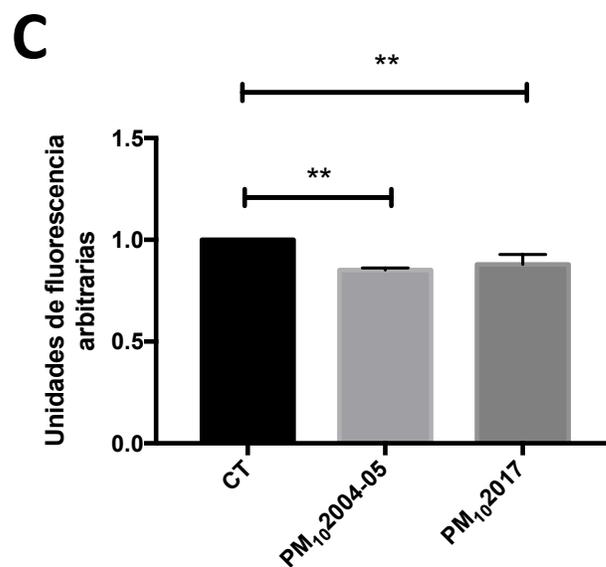
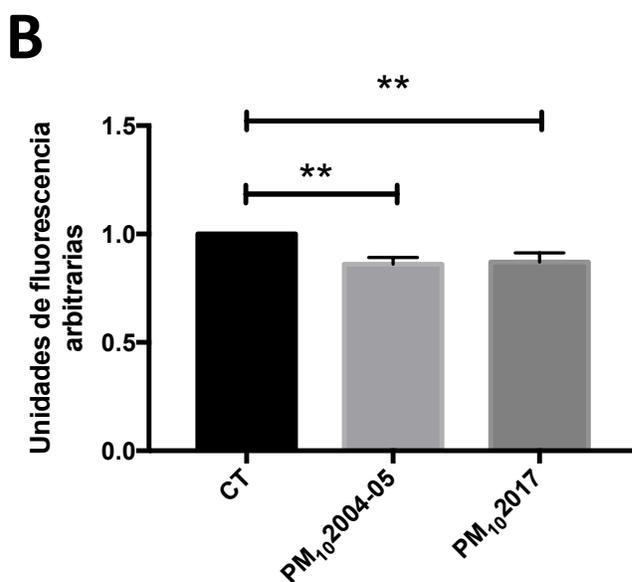
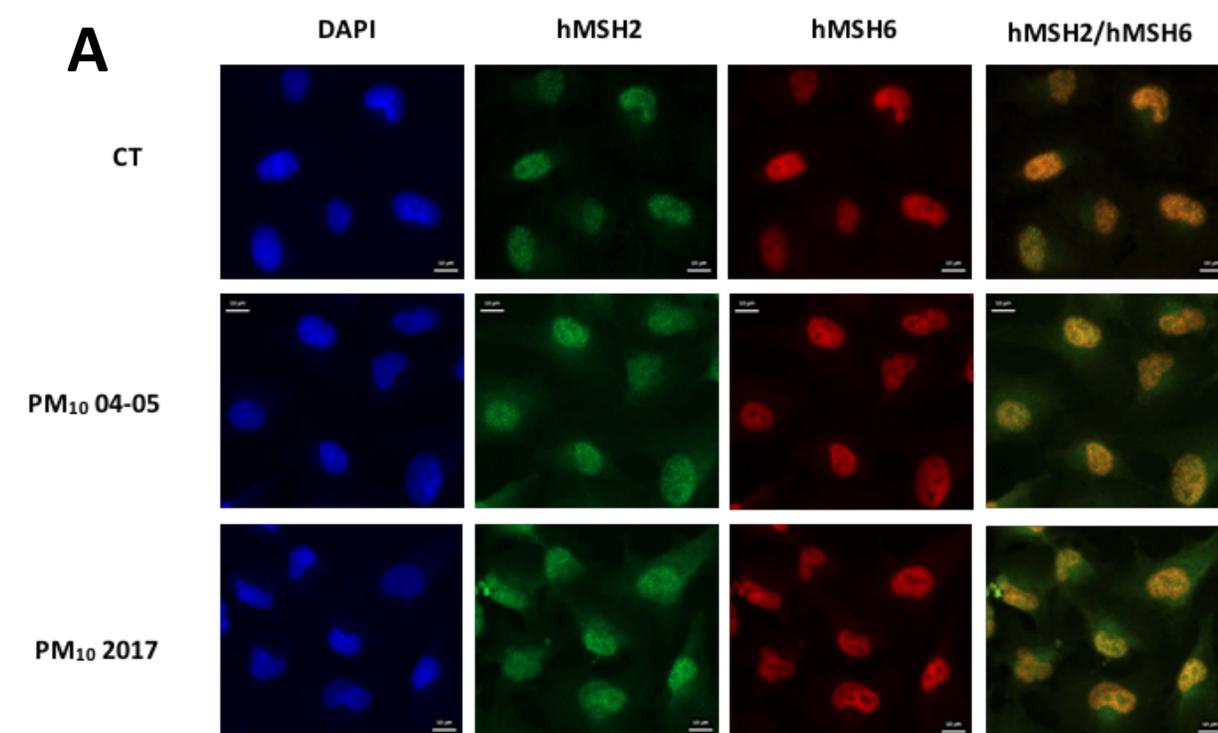


Figura 7. Las PM₁₀ disminuyen los niveles nucleares de hMSH2 y hMSH6. Células A549 fueron expuestas durante 24 hrs a PM₁₀ del 2017 y a PM₁₀ del 2004-05 de la CDMX a una concentración de 10 µg/ cm². **A)** Se evaluó la localización sub-celular de las proteínas hMSH2 y hMSH6 (señal verde y roja respectivamente) por co-inmunofluorescencia, y se observó que la exposición a PM₁₀ tanto del 2004-2005 como del 2017 de la CDMX indujo un aumento en la señal citoplásmica de hMSH2. Se midió la intensidad de la señal de hMSH2 (B) y hMSH6 (C) en núcleo, y se encontró una disminución significativa en los niveles de fluorescencia de ambas proteínas, en células expuestas a PM₁₀ tanto del 2004-2005 como del 2017 (siendo para hMSH2 **p = 0.0026 y **p = 0.0036 respectivamente; y para hMSH6 **p = 0.0015 y **p = 0.0011).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las PM₁₀ forman parte de los contaminantes criterio del aire que se caracterizan por ser perjudiciales para la salud en humanos (SEDEMA, 2015; EPA, 2017). Las PM están clasificadas como un carcinógeno para los humanos (IARC, 2013) y principalmente han sido asociadas al desarrollo y mortalidad por cáncer de pulmón (Pope et al. 2002; Chen et al. 2016; Zhou et al. 2017). Sin embargo, los mecanismos celulares mediante los cuales este contaminante puede favorecer el desarrollo de cáncer deben ser estudiados aún con mayor profundidad. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la exposición de células epiteliales de pulmón A549 a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24 horas en diferentes proteínas de la vía de reparación de bases mal apareadas (MMR) como hMSH2, hMSH6 y hMLH1. El correcto funcionamiento de la vía MMR evita la acumulación de mutaciones en el DNA, y por lo tanto su alteración puede dar lugar al desarrollo de neoplasias, entre las que se encuentra el cáncer de pulmón (Herman et al. 1998; Dowty et al. 2013; Carethers y Stoffel, 2015).

Para la realización de este proyecto se utilizó como modelo la línea celular A549 proveniente de un carcinoma pulmonar de células alveolares (Lieber et al. 1976), y cuya caracterización a nivel genómico (Hellmann, 2001) y proteómico (Korrodi-Gregório et al. 2016) ha mostrado que esta línea celular no presenta alteraciones en el gen de TP53 ni en otros genes encargados de reparación del DNA (Blanco et al. 2009). Por otra parte, esta línea celular muestra una respuesta al daño en DNA similar a la respuesta en líneas celulares no tumorigénicas de pulmón, como son las BEAS-2B y las NHBE, tras la exposición a agentes genotóxicos (Zhao et al. 2009; Biola-Clier et al. 2017), por lo que se consideran un buen modelo para estudios sobre el funcionamiento de los mecanismos de reparación. Aunado a lo anterior, las células A549 se han utilizado para el estudio de los efectos de metales (Peterson-Roth et al. 2005; Scanlon et al. 2017), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Bai et al. 2017) y material particulado (Palacio et al. 2016; Lai et al. 2016; Vuong et al. 2017), por lo que esta línea celular es considerada un buen modelo para realizar estudios toxicológicos y del funcionamiento de las vías de reparación del DNA.

En este trabajo se utilizó una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , la cual ha sido previamente reportada como una dosis sub-letal, debido a que no induce cambios en la viabilidad, pero sí, alteraciones a nivel molecular y celular (Ferecatu et al. 2010; Quezada-Maldonado et al. 2018; Sánchez-Pérez et al. 2009; Morales-Bárceñas et al. 2015). Además dicha concentración equivale a cinco días de exposición en humanos (Li et al. 2003).

Si bien, se sabe que componentes de las PM inducen diversos daños moleculares, es importante analizar el efecto que tienen las PM como mezcla compleja, ya que se conoce que existen efectos sinérgicos o antagónicos generados por la interacción entre sus componentes (Chen et al. 2013), eventos que no se verían reflejados si se analizaran las fracciones orgánica, inorgánica y biológica por separado. Por otra parte se sabe que los efectos de las PM dependen directamente de su composición (Alfaro-Moreno et al. 2002; Osornio-Vargas et al. 2003; Manzano-León et al. 2013) la cual varía de manera espacio-temporal y conforme a las actividades antropogénicas y procesos meteorológicos (Bell et al. 2007; Mugica et al. 2009).

Debido a que la composición de las PM está estrechamente relacionada con el nivel y tipo de daño, en este trabajo se decidió evaluar el efecto diferencial de PM_{10} colectadas en dos años diferentes sobre la vía de reparación de bases mal apareadas. Se conoce que las PMs causan daño al DNA (Salcido-Neyoy et al. 2015; Sánchez-Pérez et al. 2009; Garçon et al. 2006; Lepers et al. 2014; García-Cuellar et al. 2002) pero no se conoce con exactitud si estos daños son reparados correctamente. Además del daño generado por compuestos exógenos, las células son susceptibles a desarrollar daño de tipo endógeno durante la replicación del DNA, el cual puede modificar la secuencia del genoma, permitiendo la aparición de mutaciones. Por lo tanto, fue de interés analizar cuál es el efecto del material particulado sobre una vía de reparación MMR, ya que en caso de que el daño tanto

endógeno como exógeno no se repare correctamente, se pueden acumular alteraciones a nivel genómico que dan lugar a procesos de inestabilidad genómica.

La evaluación del impacto de las PM_{10} en la vía de reparación de MMR fue de nuestro interés debido a su papel fundamental en el proceso de replicación del DNA, y esta es un vía que se conserva desde organismos procariontes y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Liu et al. 2017). Previos trabajos reportan que proteínas que pertenecen a esta vía, como hMLH1 y hMSH2, son susceptibles a cambios causados por la exposición a contaminantes del aire intramuros, específicamente el humo de leña (Mukherjee et al. 2014).

En este trabajo encontramos que, tras la exposición a PM_{10} del año 2004-2005 los niveles de proteína de hMSH6 disminuyeron significativamente, dicha tendencia también fue encontrada tras la exposición a PM_{10} del 2017 aunque ésta no fue estadísticamente significativa. Esta disminución concuerda con lo ya reportado en la literatura con respecto al efecto de algunos componentes oxidantes presentes en el material particulado como es el cadmio (Hsu et al. 2010). Sin embargo, la concentración de metales es mayor en las PM_{10} 2017 comparadas con las PM_{10} 2004-05, siendo que las primeras no mostraron ningún efecto significativo sobre los niveles de esta proteína. Por lo tanto es posible que otros componentes del PM sean los responsables de los cambios observados en hMSH6, como podría ser el caso de los HAPs, dentro de los cuales encontramos al benzo(a)pireno que igual ha demostrado capacidad de disminuir los niveles de esta proteína (Chen et al. 2013).

La disminución de hMSH6 podría tener como efecto directo en los niveles de dímeros de hMSH2/hMSH6 (complejo MutS α), ya que hMSH2 es más susceptible a ser ubiquitinada y degradada en su estado monomérico (Zhang et al. 2014) y con base en esto, esperábamos que los niveles de hMSH2 disminuyeran tras la exposición a PM_{10} debido a la pérdida de estabilidad y a su probable ubiquitinación como consecuencia de la disminución de hMSH6, sin embargo, este no fue el caso. Tras las 24hrs de exposición a PM_{10} de ambos años de colecta, no encontramos

cambios significativos en los niveles de mRNA ni de proteína de hMSH2, contrario a lo esperado. Posiblemente el efecto en los niveles de hMSH2 ocurra en tiempos más largos de exposición.

Al analizar la localización subcelular de ambas proteínas, se observó una disminución de los niveles nucleares de hMSH6 tras la exposición a PM de ambos años, siendo este resultado concordante a lo observado mediante el análisis de la proteína total, pudiendo deberse entonces esta disminución en núcleo a la disminución de la proteína total. Por otro lado, se encontró que la exposición a PM₁₀ no reduce los niveles totales de hMSH2 (Fig.4B) pero si se observa una disminución significativa de la abundancia de esta proteína en núcleo posterior a la exposición a ambas muestras de PM₁₀ (Fig. 7B). Esto nos lleva a pensar que las PM₁₀ inducen la retención de hMSH2 en citoplasma. Por lo tanto, la disminución en los niveles nucleares de hMSH2 puede deberse a que esta proteína pierde capacidad de translocación nuclear en ausencia de hMSH6, ya que el complejo formado por ambas proteínas debe dimerizar en citoplasma antes de translocar al núcleo (Christmann y Kaina, 2000). Esto puede deberse al hecho de que hMSH2 no cuenta con un dominio o señal de localización nuclear (NLS) la cual es necesaria para la translocación de proteínas a núcleo (Edelbrock et al. 2013), mientras que, hMSH6 cuenta con tres secuencias de localización nuclear funcionales en su región amino terminal (NTR) (Gassman et al. 2011). Por lo tanto, la disminución en los niveles de proteína de hMSH6 inducida por las PM₁₀ probablemente alteran la formación de dímeros MutS α y por lo tanto la translocación nuclear de hMSH2, la cual queda retenida en citoplasma.

Si bien, la reducción de hMSH6 pudiera ser un factor causal de la disminución en la translocación nuclear de hMSH2, la exposición a PM₁₀ 2017 no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de proteína de hMSH6, pero si provocó la disminución en los niveles nucleares de hMSH2 y su retención en citoplasma. Por lo tanto, puede que otros mecanismos regulatorios de la translocación nuclear de estas proteínas sean los causantes de esta retención y se vean alterados por la exposición a PM₁₀.

Uno de los posibles mecanismos para la retención de hMSH2 observada, es la fosforilación de hMSH6. Ya que se ha demostrado la presencia de diferentes sitios de fosforilación en hMSH6, encontrándose varios en su región amino terminal (NTR) (Beausoleil et al. 2004; Beausoleil et al. 2006; Matsuoka et al. 2007; Daub et al. 2008) (Kaliyaperumal et al. 2011) la cual es esencial para su translocación, ya que esta región contiene secuencias funcionales de localización nuclear (Gassman et al. 2011). Se ha reportado que CK2 y PKC (Kaliyaperumal et al. 2011), promueven la translocación de MutS α mediante su fosforilación (Christmann et al. 2002). En este sentido se sabe que componentes de las PM, así como el estrés oxidante pueden alterar patrones de fosforilación de diferentes proteínas (Ou y Ramos 1992; Kim y Andrezza 2012; Shrivastava et al. 2014). Por lo tanto, es factible que la exposición a PM₁₀ altere las marcas de fosforilación necesarias para mantener la estabilidad del complejo y evitar la degradación de hMSH6, así como para inducir su translocación nuclear, lo cual pudiera aumentar su susceptibilidad a degradación y reducir la capacidad del dímero hMSH2/hMSH6 de translocar a núcleo.

Por otro lado, se ha reportado que el estrés oxidante puede inducir alteraciones en los componentes de la maquinaria encargada del transporte de proteínas a través de la envoltura nuclear e inhibir tanto el exporte e importe de moléculas al núcleo (Kodiha et al. 2004; Crampton et al. 2009), por lo que en conjunto la desregulación de estos mecanismos a causa del estrés oxidante generado por la exposición a PM₁₀ podría ser el causante de la ineficiencia en la translocación nuclear observada en las proteínas del complejo MutS α .

De manera contraria a lo observado a nivel de proteína, los niveles de mRNA de hMSH6 presentaron una tendencia al aumento tras la exposición a PM₁₀ 2004-05. Lo cual pudiera deberse a una activación de la vía de MMR en respuesta al daño inducido por el material particulado, ya que hMSH6 actúa en respuesta a la presencia de agentes alquilantes (Hickman y Samson, 1999; Christmann y Kaina, 2000; Cahill et al. 2007; Chen et al. 2013), los cuales podemos encontrar dentro de

los diversos componentes del material particulado (Greenberg et al. 1993; Butler et al. 1987).

Esta discrepancia entre los niveles de mRNA y proteína posiblemente se pueda explicar mediante las alteraciones a nivel post-traduccionales que hemos discutido anteriormente y las cuales podrían derivar en la pérdida de estabilidad de la proteína e inducir su degradación y por lo tanto su disminución.

En este trabajo también se evaluó el efecto de la exposición a PM₁₀ en hMLH1, una de las proteínas necesarias para que se lleve a cabo la reparación del daño una vez reconocido por el complejo MutS α . Al evaluar los niveles de mRNA y proteína de hMLH1 tras 24h de exposición a PM₁₀ encontramos que la expresión génica no se ve alterada por las PM₁₀ de ningún año de colecta, sin embargo, las PM₁₀ del 2004-05 si causaron una disminución significativa en los niveles de proteína.

Al igual que hMSH2 y hMSH6, hMLH1 es regulado por modificaciones post-traduccionales, y la estabilidad de esta proteína también puede ser regulada por procesos de fosforilación. Específicamente, la fosforilación en el residuo S406 es necesaria para la estabilización y acumulación de esta proteína (Romeo et al. 2011). Con base en esto se refuerza la idea de que las PM₁₀ así como el estrés oxidante que éstas inducen, pudieran estar alterando las marcas de fosforilación, como las encargadas de la estabilización de las proteínas de esta vía, siendo posible que la alteración de la fosforilación de hMLH1 en S406 sea causa de la disminución de hMLH1 tras la exposición a PM, en conjunto con la activación de la vía de degradación por proteosoma como se discutió anteriormente.

Además, los niveles de hMLH1 al igual que con hMSH6, pueden ser regulados por la actividad del proteosoma (Hernandez-Pigeon et al. 2004; Abildgaard et al. 2019) el cual puede ser activado por las PM₁₀ (Lai et al. 2016) las que además generan oxidación y degradación de proteínas a causa de la inducción de estrés oxidante (Pardo et al. 2016; Lai et al. 2016; R. Zhao et al. 2018) por lo que posiblemente el

estrés oxidante inducido por el material particulado esté promoviendo la degradación de hMLH1.

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, así como por la composición de las PM colectadas en diferentes años, consideramos que el estrés oxidante podría estar jugando un papel importante en los efectos observados en las proteínas de la vía MMR tras la exposición a PM. Si bien se conoce que los metales, son los principales inductores de estrés oxidante mediante reacciones las de Fenton y Harber-Weiss (Li et al. 2008), otros componentes del material particulado como los hidrocarburos aromáticos policíclicos son capaces de inducir estrés oxidante mediante su biotransformación a quinonas, en la que estos HAPs son activados metabólicamente por los citocromos P450s y la enzima epóxido hidrolasa, formando un trans-dihidrodiol, que sirve como sustrato para las enzimas Aldo-ceto reductasas (AKR), que catalizan la formación de catecol, el cual se oxida en o-quinonas. Durante esta conversión, se producen especies reactivas de oxígeno (EROs) y sus precursores como peróxido de hidrógeno y el anión superóxido (Penning et al. 1999; Palackal et al. 2001). Además, estas o-quinonas pueden sufrir reducciones no enzimáticas volviendo a formarse el catecol, y por lo tanto, se puede dar un ciclo de reacciones de óxido-reducción que tiene como resultado la múltiple formación de EROs (Penning et al. 1999; Palackal et al. 2001). Esto es importante ya que como mencionamos anteriormente los efectos encontrados sobre las proteínas del sistema MMR son inducidos por las PM₁₀ 2004-2005, las cuales contienen una menor concentración de metales comparada con el material particulado del 2017, por lo que es posible que además de los metales, sean los HAPs los que induzcan estos efectos, además se ha demostrado previamente que los HAPs como el benzo(a)pireno pueden alterar vías de reparación, específicamente la vía de reparación de bases mal apareadas (Chen et al. 2013).

Por otro lado, y como ya se mencionó anteriormente, el material particulado también contiene elementos biológicos, dentro de los cuales destacan las endotoxinas o lipopolisacáridos derivados de la pared celular de bacterias grama negativas. Estas

endotoxinas han mostrado jugar un papel importante en la generación de inflamación derivada de la exposición a material particulado y su capacidad de inducir la producción de moléculas inflamatorias (Bonner et al. 1998).

Dos de estas moléculas, el factor de necrosis tumor al alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), las cuales ya se han reportado como moléculas inflamatorias inducidas en respuesta a la exposición a material particulado (Alfaro-Moreno et al. 2002; Cachon et al. 2014), también han mostrado capacidad de alterar la expresión génica, niveles de proteína, y localización nuclear de diferentes componentes de la vía MMR (Fernandes et al. 2007; Eso et al. 2016; Tseng-Rogenski et al. 2015; Germini et al. 2019).

Específicamente hMSH3 que también forma parte de la vía MMR, es retenido en citoplasma en células tratadas con IL-6 (Tseng-Rogenski et al. 2015), mientras que el tratamiento con TNF- α provoca una disminución en la expresión génica y en los niveles de la proteína hMSH2 en células hepáticas (Eso et al. 2016). A su vez la expresión de TNF- α en muestras de cáncer colorectal ha sido asociada con bajos niveles de las proteínas hMLH1 y hMSH2 (Germini et al. 2019). Por lo tanto, es posible que la respuesta inflamatoria inducida tras la exposición a PM, participe en las alteraciones observadas en este trabajo y por lo cual sería interesante realizar la comparación entre los niveles de endotoxina contenidos entre las PM 2004-05 y 2017, ya que por los efectos observados es plausible que las PM 2004-05 sean capaces de inducir mayor concentración de moléculas proinflamatorias.

Otras de las moléculas alteradas por la exposición a PM son o los micro-RNAs (miRNAs) (Quezada-Maldonado et al. 2018), lo cuales son moléculas que regulan la expresión génica y pueden incrementar o disminuir los niveles de proteína y mRNA de diferentes genes blanco (Pillai, 2005).

En relación con la vía MMR, el miR-155 se encarga de la regulación de hMLH1, hMSH2 y hMSH6, el cual es capaz de promover la inestabilidad genómica al reducir

los niveles de estas proteínas (Valeri et al. 2010; Czocho et al. 2016). Los niveles del miR-155 se han encontrado sobre-expresados en personas expuestas a niveles altos de PM₁₀ intramuros (Liu et al. 2019) y además se ha visto aumentado en cáncer (Valeri et al. 2010). Por lo anterior, es posible que la disminución en los niveles de hMLH1 y hMSH6 observada en este trabajo sea causado por un aumento en la expresión y actividad del miR-155 a causa de la exposición a PM₁₀.

De manera general, las alteraciones en la vía de reparación MMR pueden desregular procesos celulares esenciales que evitan el desarrollo de neoplasias. Mutaciones en uno solo de los cuatro genes *hMSH6*, *hMSH2*, *hMLH1* y *hPMS2* son suficientes para causar el desarrollo de inestabilidad microsatelital, lo cual induce un aumento en la tasa de mutación y predispone al desarrollo de cáncer (Ismael et al. 2017). Por lo tanto, las alteraciones inducidas por el material particulado en los componentes de la vía MMR podrían ser un mecanismo a través del cual las PM predispongan al desarrollo del proceso carcinogénico, que estaría asociado a una deficiente capacidad de reparación de daño en bases mal apareadas.

De manera específica la ausencia de hMLH1 promueve procesos de proliferación, migración e inhibición de la apoptosis en modelos in vitro (Fukuhara et al. 2014; Yanamadala y Ljungman, 2003). Mientras que células deficientes en hMSH6 se vuelven resistentes a la muerte celular por apoptosis inducida por agentes terapéuticos, e incrementan su capacidad tumorigénica (Hickman y Samson 1999; Chen et al. 2013; Hunter et al. 2006; Cahill et al. 2007). Debido a que en este trabajo encontramos disminución de hMLH1 y hMSH6 posterior a la exposición a PM, sería interesante explorar si estos cambios se relacionan con alteraciones en los procesos mencionados.

Con relación a hMSH2 se ha reportado que deficiencias en esta proteína aceleran el desarrollo de cáncer pulmonar derivado de mutación en K-RAS en un modelo de ratón (Downey y Jirik 2015). Y a su vez se ha observado una disminución en la capacidad de unión del complejo MutS α al DNA en células de etapas avanzadas de

cáncer comparadas con células de etapas tempranas del desarrollo de cáncer y células no cancerosas (Sigley et al. 2017) además, algunas mutaciones en *MSH2* tienen como consecuencia la retención de dicha proteína en citoplasma, lo cual se observa en el síndrome de Lynch (Lützen et al. 2008).

Por lo tanto, dentro del contexto del desarrollo carcinogénico las alteraciones en la vía MMR encontradas en este trabajo pueden ser de vital importancia de manera que predispongan a la acumulación de mutaciones por una deficiente capacidad de reparación de daño en el DNA posterior a la exposición a PM_{10} , en conjunto con el hecho que las PM generan daño en el DNA.

Con los resultados obtenidos contribuimos a demostrar que las PM_{10} alteran a diferentes componentes de uno de los sistemas de reparación más esenciales de la célula, sin embargo, aún debemos explorar que el funcionamiento de la vía se ve disminuido por la exposición a este contaminante. A su vez mostramos que las PMs presentan diferencias en sus efectos a nivel celular, dependientes de su año de colecta, siendo dicho comportamiento esperado, debido a la variabilidad temporal de su composición.

Con base en esto son necesarios cambios en el estilo de vida y de actividades humanas que generen menos emisiones de contaminantes, específicamente de material particulado y sus componentes, así como la instauración de políticas públicas más estrictas y la promoción del uso y aplicación de energías alternativas, con el fin de regular los niveles de este contaminante en el aire, podrían reducir la incidencia y mortalidad de enfermedades asociadas a este contaminante, tal como lo es el cáncer de pulmón.

8. CONCLUSION

La exposición de las células A549 derivadas de epitelio alveolar a PM_{10} disminuye los niveles de proteína de hMSH6 y hMLH1, y disminuye la capacidad de translocación nuclear del complejo MutS α .

9. PERSPECTIVAS

Si bien, en este trabajo se lograron dilucidar los efectos que pudiera tener el material particulado sobre algunos de los componentes de la vía de reparación de bases mal apareadas, aún es necesario definir los mecanismos por los que se llevan a cabo estas alteraciones. Por lo tanto, dentro de las perspectivas tenemos, el evaluar la oxidación de hMSH6 y hMLH1 como consecuencia del estrés oxidante, así como la participación de la vía de degradación por proteosoma en relación con la disminución de las proteínas. Evaluar mediante la separación de proteínas por fracción (citoplasma, núcleo), los cambios en los niveles de proteína, debido a que el análisis por inmunofluorescencia solo nos da una aproximación de esto. A su vez, será necesario analizar la posible alteración de la fosforilación de hMSH6 por las PM₁₀, esto mediante la inhibición de cinasas como CK2 y PKC, así como la detección de residuos específicos fosforilados dentro de la región de aminoácidos necesaria para la translocación. Y en caso de resultar que éste no es el mecanismo por el cual las PM₁₀ inducen la alteración de la translocación nuclear, evaluar el efecto de las PM sobre las componentes del proceso de transporte de proteínas a través de la membrana nuclear como lo son las importinas. Por otro lado, queda pendiente evaluar en su totalidad la composición de las PM₁₀ 2017 para poder encontrar los posibles componentes responsables de las diferencias entre las alteraciones descritas.

10. REFERENCIAS

- Abildgaard, Amanda B., Amelie Stein, Katrine Schultz-Knudsen, Sofie V. Nielsen, Elena Papaleo, Amruta Shrikhande, Eva R. Hoffmann, et al. 2019. "Structural destabilization and chaperone-assisted proteasomal degradation of MLH1 as a mechanism for Lynch syndrome". *bioRxiv*, abril. <https://doi.org/10.1101/622266>.
- Achilleos, Souzana, Marianthi-Anna Kioumourtzoglou, Chih-Da Wu, Joel D. Schwartz, Petros Koutrakis, y Stefania I. Papatheodorou. 2017. "Acute Effects of Fine Particulate Matter Constituents on Mortality: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis". *Environment International* 109 (diciembre): 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.09.010>.
- Alfaro-Moreno, Ernesto, Leticia Martínez, Claudia García-Cuellar, James C. Bonner, J. Clifford Murray, Irma Rosas, Sergio Ponce de León Rosales, y Alvaro R. Osornio-Vargas. 2002. "Biologic Effects Induced in Vitro by PM10 from Three Different Zones of Mexico City". *Environmental Health Perspectives* 110 (7): 715–20.
- Alvarado-Cruz, Isabel, Marco Sánchez-Guerra, Leticia Hernández-Cadena, Andrea De Vizcaya-Ruiz, Violeta Mugica, Nadia Azenet Pelallo-Martínez, María de Jesús Solís-Heredia, Hyang-Min Byun, Andrea Baccarelli, y Betzabet Quintanilla-Vega. 2017. "Increased Methylation of Repetitive Elements and DNA Repair Genes Is Associated with Higher DNA Oxidation in Children in an Urbanized, Industrial Environment". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 813 (enero): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.007>.
- Bai, Hongzhen, Min Wu, Hongjian Zhang, y Guping Tang. 2017. "Chronic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Causes DNA Damage and Genomic Instability in Lung Epithelial Cells". *Oncotarget* 8 (45). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20891>.
- Banerjee, S. 2005. "Cadmium Inhibits Mismatch Repair by Blocking the ATPase Activity of the MSH2-MSH6 Complex". *Nucleic Acids Research* 33 (4): 1410–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gki291>.
- Beausoleil, S. A., M. Jedrychowski, D. Schwartz, J. E. Elias, J. Villen, J. Li, M. A. Cohn, L. C. Cantley, y S. P. Gygi. 2004. "Large-Scale Characterization of HeLa Cell Nuclear Phosphoproteins". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (33): 12130–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404720101>.
- Beausoleil, Sean A, Judit Villén, Scott A Gerber, John Rush, y Steven P Gygi. 2006. "A Probability-Based Approach for High-Throughput Protein Phosphorylation Analysis and Site Localization". *Nature Biotechnology* 24 (10): 1285–92. <https://doi.org/10.1038/nbt1240>.
- Bell, Michelle L., Francesca Dominici, Keita Ebisu, Scott L. Zeger, y Jonathan M. Samet. 2007. "Spatial and Temporal Variation in PM_{2.5} Chemical Composition in the United States for Health Effects Studies". *Environmental Health Perspectives* 115 (7): 989–95. <https://doi.org/10.1289/ehp.9621>.
- Biola-Clier, M., D. Beal, S. Caillat, S. Libert, L. Armand, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki, y M. Carriere. 2017. "Comparison of the DNA Damage Response in BEAS-2B and A549 Cells Exposed to Titanium Dioxide Nanoparticles". *Mutagenesis* 32 (1): 161–72. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew055>.
- Blanco, Raquel, Reika Iwakawa, Moying Tang, Takashi Kohno, Barbara Angulo, Ruben Pio, Luis M. Montuenga, John D. Minna, Jun Yokota, y Montse Sanchez-Cespedes. 2009. "A Gene-Alteration Profile of Human Lung Cancer Cell Lines". *Human Mutation* 30 (8): 1199–1206. <https://doi.org/10.1002/humu.21028>.
- Bonner, James C., Annette B. Rice, Pamela M. Lindroos, Patricia O. O'Brien, Kevin L. Dreher, Irma Rosas, Ernesto Alfaro-Moreno, y Alvaro R. Osornio-Vargas. 1998. "Induction of the Lung Myofibroblast PDGF Receptor System by Urban Ambient

- Particles from Mexico City". *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19 (4): 672–80. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.4.3176>.
- Butler, J.P., T.J. Kneip, y J.M. Daisey. 1987. "An Investigation of Interurban Variations in the Chemical Composition and Mutagenic Activity of Airborne Particulate Organic Matter Using an Integrated Chemical Class/Bioassay System". *Atmospheric Environment (1967)* 21 (4): 883–92. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(87\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0004-6981(87)90084-9).
- Cachon, Boris Fresnel, Stéphane Firmin, Anthony Verdin, Lucie Ayi-Fanou, Sylvain Billet, Fabrice Cazier, Perrine J. Martin, et al. 2014. "Proinflammatory Effects and Oxidative Stress within Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Atmospheric Particulate Matter (PM_{2.5} and PM_{>2.5}) Collected from Cotonou, Benin". *Environmental Pollution* 185 (febrero): 340–51. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.026>.
- Cahill, D. P., K. K. Levine, R. A. Betensky, P. J. Codd, C. A. Romany, L. B. Reavie, T. T. Batchelor, et al. 2007. "Loss of the Mismatch Repair Protein MSH6 in Human Glioblastomas Is Associated with Tumor Progression during Temozolomide Treatment". *Clinical Cancer Research* 13 (7): 2038–45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2149>.
- Carethers, John M, y Elena M Stoffel. 2015. "Lynch Syndrome and Lynch Syndrome Mimics: The Growing Complex Landscape of Hereditary Colon Cancer". *World Journal of Gastroenterology* 21 (31): 9253. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i31.9253>.
- Chen, Xi, Li-Wen Zhang, Jia-Ju Huang, Feng-Ju Song, Luo-Ping Zhang, Zheng-Min Qian, Edwin Trevathan, et al. 2016. "Long-Term Exposure to Urban Air Pollution and Lung Cancer Mortality: A 12-Year Cohort Study in Northern China". *The Science of the Total Environment* 571 (noviembre): 855–61. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.064>.
- Chen, Xi, Yong Zhao, Guo-Min Li, y Lin Guo. 2013. "Proteomic Analysis of Mismatch Repair-Mediated Alkylating Agent-Induced DNA Damage Response". *Cell & Bioscience* 3 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-37>.
- Chen, Yuanhong, Changjiang Huang, Chenglian Bai, Hui Gao, Xiaojuan Liu, y Qiaoxiang Dong. 2013. "Benzo[α]Pyrene Repressed DNA Mismatch Repair in Human Breast Cancer Cells". *Toxicology* 304 (febrero): 167–72. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.003>.
- Chen, Yuanhong, Changjiang Huang, Chenglian Bai, Hui Gao, Ruihua Ma, Xiaojuan Liu, y Qiaoxiang Dong. 2013. "Benzo[α]Pyrene Repressed DNA Mismatch Repair in Human Breast Cancer Cells". *Toxicology* 304 (febrero): 167–72. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.003>.
- Chirino, Yolanda I., Yesennia Sánchez-Pérez, Álvaro Román Osornio-Vargas, Irma Rosas, y Claudia María García-Cuellar. 2015. "Sampling and Composition of Airborne Particulate Matter (PM₁₀) from Two Locations of Mexico City". *Data in Brief* 4 (septiembre): 353–56. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.06.017>.
- Christmann, Markus, y Bernd Kaina. 2000. "Nuclear Translocation of Mismatch Repair Proteins MSH2 and MSH6 as a Response of Cells to Alkylating Agents". *Journal of Biological Chemistry* 275 (46): 36256–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005377200>.
- Christmann, Markus, Maja T. Tomicic, y Bernd Kaina. 2002. "Phosphorylation of Mismatch Repair Proteins MSH2 and MSH6 Affecting MutSα Mismatch-Binding Activity". *Nucleic Acids Research* 30 (9): 1959–66.
- Crampton, Noah, Mohamed Kodiha, Sanhita Shrivastava, Rehan Umar, y Ursula Stochaj. 2009. "Oxidative Stress Inhibits Nuclear Protein Export by Multiple Mechanisms That Target FG Nucleoporins and Crm1". Editado por Kunxin Luo. *Molecular Biology of the Cell* 20 (24): 5106–16. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-05-0397>.
- Czochor, J. R., P. Sulkowski, y P. M. Glazer. 2016. "MiR-155 Overexpression Promotes Genomic Instability by Reducing High-Fidelity Polymerase Delta Expression and

- Activating Error-Prone DSB Repair". *Molecular Cancer Research* 14 (4): 363–73. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0399>.
- Daub, Henrik, Jesper V. Olsen, Michaela Bairlein, Florian Gnad, Felix S. Oppermann, Roman Körner, Zoltán Greff, György Kéri, Olaf Stemmann, y Matthias Mann. 2008. "Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle". *Molecular Cell* 31 (3): 438–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.007>.
- Downey, Charlene M., y Frank R. Jirik. 2015. "DNA Mismatch Repair Deficiency Accelerates Lung Neoplasm Development in *K-Ras*^{LA1/+} Mice: A Brief Report". *Cancer Medicine* 4 (6): 897–902. <https://doi.org/10.1002/cam4.420>.
- Dowty, James G., Aung K. Win, Daniel D. Buchanan, Noralane M. Lindor, Finlay A. Macrae, Mark Clendenning, Yoland C. Antill, et al. 2013. "Cancer Risks for *MLH 1* and *MSH 2* Mutation Carriers". *Human Mutation* 34 (3): 490–97. <https://doi.org/10.1002/humu.22262>.
- Edelbrock, Michael A., Saravanan Kaliyaperumal, y Kandace J. Williams. 2013. "Structural, Molecular and Cellular Functions of MSH2 and MSH6 during DNA Mismatch Repair, Damage Signaling and Other Noncanonical Activities". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 743–744 (marzo): 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.12.008>.
- Eso, Y., A. Takai, T. Matsumoto, T. Inuzuka, T. Horie, K. Ono, S. Uemoto, et al. 2016. "MSH2 Dysregulation Is Triggered by Proinflammatory Cytokine Stimulation and Is Associated with Liver Cancer Development". *Cancer Research* 76 (15): 4383–93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2926>.
- Falcon-Rodriguez, Carlos I., Alvaro R. Osornio-Vargas, Isabel Sada-Ovalle, y Patricia Segura-Medina. 2016a. "Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases". *Frontiers in Immunology* 7 (enero). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>.
- . 2016b. "Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases". *Frontiers in Immunology* 7 (enero). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>.
- Ferecatu, Ioana, Marie-Caroline Borot, Camille Bossard, Melanie Leroux, Nicole Boggetto, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban, y Karine Andreau. 2010. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Components Contribute to the Mitochondria-Antiapoptotic Effect of Fine Particulate Matter on Human Bronchial Epithelial Cells via the Aryl Hydrocarbon Receptor". *Particle and Fibre Toxicology* 7 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-18>.
- Fernandes, Anacélia Mendes, Vânia Ribeiro da Cunha De Souza, Cornelis Robert Araújo Springer, Sérgio Vitorino Cardoso, Adriano Mota Loyola, Ricardo Alves Mesquita, y Maria Cássia Ferreira Aguiar. 2007. "Tobacco and Inflammation Effects in Immunoexpression of HSMH2 and HMLH1 in Epithelium of Oral Mucosa". *Anticancer Research* 27 (4B): 2433–37.
- Ferreira, Tatiane, Maria Forti, Clarice de Freitas, Felipe Nascimento, Washington Junger, y Nelson Gouveia. 2016. "Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (10): 947. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100947>.
- Fiordelisi, Antonella, Prisco Piscitelli, Bruno Trimarco, Enrico Coscioni, Guido Iaccarino, y Daniela Sorriento. 2017. "The Mechanisms of Air Pollution and Particulate Matter in Cardiovascular Diseases". *Heart Failure Reviews* 22 (3): 337–47. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9606-7>.
- Forsström, Linda M., Koichiro Sumi, Markus J. Mäkinen, Ji Eun Oh, Riitta Herva, Paul Kleihues, Hiroko Ohgaki, y Lauri A. Aaltonen. 2017. "Germline MSH6 Mutation in a

- Patient With Two Independent Primary Glioblastomas". *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 76 (10): 848–53. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx066>.
- Fukuhara, Shinichiro, Inik Chang, Yozo Mitsui, Takeshi Chiyomaru, Soichiro Yamamura, Shahana Majid, Sharanjot Saini, et al. 2014. "DNA Mismatch Repair Gene MLH1 Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells". *Oncotarget* 5 (22). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2315>.
- García-Cuellar, C., E. Alfaro-Moreno, F. Martínez-Romero, S. Ponce-de-León Rosales, I. Rosas, E. Pérez-Cárdenas, y A.R. Osornio-Vargas. 2002. "DNA Damage Induced by PM10 from Different Zones of Mexico City". *Annals of Occupational Hygiene* 46 (Supplement 1): 425–28.
- Garçon, Guillaume, Zeina Dagher, Farid Zerimech, Frédéric Ledoux, Dominique Courcot, Antoine Aboukais, Emile Puskaric, y Pirouz Shirali. 2006. "Dunkerque City Air Pollution Particulate Matter-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Inflammation in Human Epithelial Lung Cells (L132) in Culture". *Toxicology in Vitro* 20 (4): 519–28. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.09.012>.
- Gassman, Natalie R., Jill E. Clodfelter, Anita K. McCauley, Keith Bonin, Freddie R. Salsbury, y Karin D. Scarpinato. 2011. "Cooperative Nuclear Localization Sequences Lend a Novel Role to the N-Terminal Region of MSH6". Editado por Martin Marinus. *PLoS ONE* 6 (3): e17907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017907>.
- Gauthier, Patrick T., Warren P. Norwood, Ellie E. Prepas, y Greg G. Pyle. 2015. "Metal–Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixture Toxicity in *Hyalella Azteca*. 2. Metal Accumulation and Oxidative Stress as Interactive Co-Toxic Mechanisms". *Environmental Science & Technology* 49 (19): 11780–88. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03233>.
- Germi, Demétrius Eduardo, Maria Isete Fares Franco, Fernando Luiz Affonso Fonseca, Flávia de Sousa Gehrke, Beatriz da Costa Aguiar Alves Reis, Leonardo Cardili, Celina Tizuko Fujiyama Oshima, Thérèse Rachell Theodoro, y Jaques Waisberg. 2019. "Association of Expression of Inflammatory Response Genes and DNA Repair Genes in Colorectal Carcinoma". *Tumor Biology* 41 (4): 101042831984304. <https://doi.org/10.1177/1010428319843042>.
- Gourzones-Dmitriev, Claire, Alboukadel Kassambara, Surinder Sahota, Thierry Rème, Jérôme Moreaux, Pascal Bourquard, Dirk Hose, Philippe Pasero, Angelos Constantinou, y Bernard Klein. 2013. "DNA Repair Pathways in Human Multiple Myeloma: Role in Oncogenesis and Potential Targets for Treatment". *Cell Cycle* 12 (17): 2760–73. <https://doi.org/10.4161/cc.25951>.
- Greenberg, Arthur, Jung-Hen Lwo, Thomas B Antherholt, Robert Rosen, Thomas Hartman, James Butler, y Judy Louis. 1993. "Bioassay-Directed Fractionation of Organic Compounds Associated with Airborne Particulate Matter; An Interseasonal Study". *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* 27 (10): 1609–26. [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(93\)90160-Z](https://doi.org/10.1016/0960-1686(93)90160-Z).
- Guo, Yuming, Hongmei Zeng, Rongshou Zheng, Shanshan Li, Adrian G. Barnett, Siwei Zhang, Xiaonong Zou, Rachel Huxley, Wanqing Chen, y Gail Williams. 2016. "The Association between Lung Cancer Incidence and Ambient Air Pollution in China: A Spatiotemporal Analysis". *Environmental Research* 144 (enero): 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.004>.
- Gurung, Anobha, Ji-Young Son, y Michelle L. Bell. 2017. "Particulate Matter and Risk of Hospital Admission in the Kathmandu Valley, Nepal: A Case-Crossover Study". *American Journal of Epidemiology* 186 (5): 573–80. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx135>.
- Hanahan, Douglas, y Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

- He, Dian, Shaowen Wu, Haiping Zhao, Hongyan Qiu, Yang Fu, Xingming Li, y Yan He. 2017. "Association between Particulate Matter 2.5 and Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Cohort Studies". *Journal of Diabetes Investigation* 8 (5): 687–96. <https://doi.org/10.1111/jdi.12631>.
- Hellmann, G. M. 2001. "Gene Expression Profiling of Cultured Human Bronchial Epithelial and Lung Carcinoma Cells". *Toxicological Sciences* 61 (1): 154–63. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.154>.
- Herman, J. G., A. Umar, K. Polyak, J. R. Graff, N. Ahuja, J. P. Issa, S. Markowitz, et al. 1998. "Incidence and Functional Consequences of HMLH1 Promoter Hypermethylation in Colorectal Carcinoma". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12): 6870–75.
- Hernández-Espinosa, David Alejandro. 2015. "Cambios en la expresión de XRCC1 en células epiteliales de pulmón humano (A549) expuestas a material particulado PM10". Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernandez-Pigeon, Hélène, Guy Laurent, Odile Humbert, Bernard Salles, y Dominique Lautier. 2004. "Degradation of Mismatch Repair HMutS α Heterodimer by the Ubiquitin-Proteasome Pathway". *FEBS Letters* 562 (1–3): 40–44. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00181-4).
- Hernandez-Pigeon, Hélène, Anne Quillet-Mary, Thierry Louat, Alexia Schambourg, Odile Humbert, Janick Selves, Bernard Salles, Guy Laurent, y Dominique Lautier. 2005. "HMutS α Is Protected from Ubiquitin-Proteasome-Dependent Degradation by Atypical Protein Kinase C ζ Phosphorylation". *Journal of Molecular Biology* 348 (1): 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.001>.
- Hickman, M. J., y L. D. Samson. 1999. "Role of DNA Mismatch Repair and P53 in Signaling Induction of Apoptosis by Alkylating Agents". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (19): 10764–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10764>.
- Hsu, Todd, Huei-Ting Tsai, Kuan-Ming Huang, Mei-Chu Luan, y Chang-Ruei Hsieh. 2010. "Sublethal Levels of Cadmium Down-Regulate the Gene Expression of DNA Mismatch Recognition Protein MutS Homolog 6 (MSH6) in Zebrafish (Danio Rerio) Embryos". *Chemosphere* 81 (6): 748–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.014>.
- Hunter, Chris, Raffaella Smith, Daniel P. Cahill, Philip Stephens, Claire Stevens, Jon Teague, Chris Greenman, et al. 2006. "A Hypermutation Phenotype and Somatic MSH6 Mutations in Recurrent Human Malignant Gliomas after Alkylator Chemotherapy". *Cancer Research* 66 (8): 3987–91. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0127>.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, y International Agency for Research on Cancer. 2016. *Outdoor Air Pollution*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368024/>.
- Ismael, Nour El Hoda S., Samar A. El Sheikh, Suzan M. Talaat, y Eman M. Salem. 2017. "Mismatch Repair Proteins and Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2): Histopathological and Immunohistochemical Study". *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 5 (1): 9. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.003>.
- Kaliyaperumal, Saravanan, Steve M. Patrick, y Kandace J. Williams. 2011. "Phosphorylated HMSH6: DNA Mismatch versus DNA Damage Recognition". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 706 (1–2): 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.10.008>.

- Kelley, Mark R, Derek Logsdon, y Melissa L Fishel. 2014. "Targeting DNA Repair Pathways for Cancer Treatment: What's New?" *Future Oncology* 10 (7): 1215–37. <https://doi.org/10.2217/fon.14.60>.
- Kim, Helena Kyunghye, y Ana Cristina Andreazza. 2012. "The Relationship between Oxidative Stress and Post-Translational Modification of the Dopamine Transporter in Bipolar Disorder". *Expert Review of Neurotherapeutics* 12 (7): 849–59. <https://doi.org/10.1586/ern.12.64>.
- Kodiha, M, A Chu, N Matusiewicz, y U Stochaj. 2004. "Multiple Mechanisms Promote the Inhibition of Classical Nuclear Import upon Exposure to Severe Oxidative Stress". *Cell Death & Differentiation* 11 (8): 862–74. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401432>.
- Korrodi-Gregório, Luís, Vanessa Soto-Cerrato, Rui Vitorino, Margarida Fardilha, y Ricardo Pérez-Tomás. 2016. "From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research". Editado por Aamir Ahmad. *PLOS ONE* 11 (11): e0165973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165973>.
- Lai, Ching-Huang, Chun-Nin Lee, Kuan-Jen Bai, You-Lan Yang, Kai-Jen Chuang, Sheng-Ming Wu, y Hsiao-Chi Chuang. 2016. "Protein Oxidation and Degradation Caused by Particulate Matter". *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep33727>.
- Lemjabbar-Alaoui, Hassan, Omer UI Hassan, Yi-Wei Yang, y Petra Buchanan. 2015. "Lung Cancer: Biology and Treatment Options". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1856 (2): 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
- Lepers, Capucine, Véronique André, Mona Dergham, Sylvain Billet, Anthony Verdin, Guillaume Garçon, Dorothée Dewaele, Fabrice Cazier, François Sichel, y Pirouz Shirali. 2014. "Xenobiotic Metabolism Induction and Bulky DNA Adducts Generated by Particulate Matter Pollution in BEAS-2B Cell Line: Geographical and Seasonal Influence: Influence of PM Samples Composition on Bulky DNA Adducts Formation". *Journal of Applied Toxicology* 34 (6): 703–13. <https://doi.org/10.1002/jat.2931>.
- Li, Guo-Min. 2008. "Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair". *Cell Research* 18 (1): 85–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>.
- Li, Ning, Mingqi Hao, Robert F. Phalen, William C. Hinds, y Andre E. Nel. 2003. "Particulate Air Pollutants and Asthma. A Paradigm for the Role of Oxidative Stress in PM-Induced Adverse Health Effects". *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 109 (3): 250–65.
- Li, Ning, Tian Xia, y Andre E. Nel. 2008. "The Role of Oxidative Stress in Ambient Particulate Matter-Induced Lung Diseases and Its Implications in the Toxicity of Engineered Nanoparticles". *Free Radical Biology and Medicine* 44 (9): 1689–99. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.028>.
- Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, y G. Todaro. 1976. "A Continuous Tumor-Cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells". *International Journal of Cancer* 17 (1): 62–70.
- Liu, Dekang, Guido Keijzers, y Lene Juel Rasmussen. 2017. "DNA Mismatch Repair and Its Many Roles in Eukaryotic Cells". *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773 (julio): 174–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.07.001>.
- Liu, Qingbin, Wei Wang, y Wei Jing. 2019. "Indoor Air Pollution Aggravates Asthma in Chinese Children and Induces the Changes in Serum Level of MiR-155". *International Journal of Environmental Health Research* 29 (1): 22–30. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1506569>.
- Lützen, Anne, Niels de Wind, Dubravka Georgijevic, Finn Cilius Nielsen, y Lene Juel Rasmussen. 2008. "Functional Analysis of HNPCC-Related Missense Mutations in MSH2". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 645 (1–2): 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.08.015>.

- Manzano-León, Natalia, Raúl Quintana, Brisa Sánchez, Jesús Serrano, Elizabeth Vega, Inés Vázquez-López, Leonora Rojas-Bracho, et al. 2013. "Variation in the Composition and In Vitro Proinflammatory Effect of Urban Particulate Matter from Different Sites: PARTICULATE MATTER AND INFLAMMATORY POTENTIAL". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 27 (1): 87–97. <https://doi.org/10.1002/jbt.21471>.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, et al. 2007. "ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage". *Science* 316 (5828): 1160–66. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>.
- Mehta, Manju, Lung-Chi Chen, Terry Gordon, William Rom, y Moon-shong Tang. 2008. "Particulate Matter Inhibits DNA Repair and Enhances Mutagenesis". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 657 (2): 116–21. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.08.015>.
- Meo, S. A., y F. Suraya. 2015. "Effect of Environmental Air Pollution on Cardiovascular Diseases". *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19 (24): 4890–97.
- Moorthy, Bhagavatula, Chun Chu, y Danielle J. Carlin. 2015. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer". *Toxicological Sciences* 145 (1): 5–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040>.
- Mora, Marco, Rachel A. Braun, Taylor Shingler, y Armin Sorooshian. 2017. "Analysis of Remotely Sensed and Surface Data of Aerosols and Meteorology for the Mexico Megalopolis Area between 2003 and 2015: Analysis of Aerosols Mexico Megalopolis". *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 122 (16): 8705–23. <https://doi.org/10.1002/2017JD026739>.
- Morales-Bárcenas, Rocío, Yolanda I. Chirino, Yesennia Sánchez-Pérez, Álvaro Román Osornio-Vargas, Jorge Melendez-Zajgla, Irma Rosas, y Claudia María García-Cuellar. 2015. "Particulate Matter (PM10) Induces Metalloprotease Activity and Invasion in Airway Epithelial Cells". *Toxicology Letters* 237 (3): 167–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.06.001>.
- Mugica, V., E. Ortiz, L. Molina, A. De Vizcaya-Ruiz, A. Nebot, R. Quintana, J. Aguilar, y E. Alcántara. 2009. "PM Composition and Source Reconciliation in Mexico City". *Atmospheric Environment* 43 (32): 5068–74. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.06.051>.
- Mühlfeld, Christian, Barbara Rothen-Rutishauser, Fabian Blank, Dimitri Vanhecke, Matthias Ochs, y Peter Gehr. 2008. "Interactions of Nanoparticles with Pulmonary Structures and Cellular Responses". *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (5): L817–29. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00442.2007>.
- Mukherjee, Bidisha, Banani Bindhani, Hira Saha, y Manas Ranjan Ray. 2014. "Increased Oxidative DNA Damage and Decreased Expression of Base Excision Repair Proteins in Airway Epithelial Cells of Women Who Cook with Biomass Fuels". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38 (2): 341–52. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.06.010>.
- Mukherjee, Bidisha, Anindita Dutta, Saswati Chowdhury, Sanghita Roychoudhury, y Manas Ranjan Ray. 2014. "Reduction of DNA Mismatch Repair Protein Expression in Airway Epithelial Cells of Premenopausal Women Chronically Exposed to Biomass Smoke". *Environmental Science and Pollution Research* 21 (4): 2826–36. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2218-4>.
- Osornio-Vargas, Álvaro R., James C. Bonner, Ernesto Alfaro-Moreno, Leticia Martínez, Claudia García-Cuellar, Sergio Ponce-de-León Rosales, Javier Miranda, y Irma Rosas. 2003. "Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Mexico City Air Pollution

- Particulate Matter in Vitro Are Dependent on Particle Size and Composition". *Environmental Health Perspectives* 111 (10): 1289–93. <https://doi.org/10.1289/ehp.5913>.
- Ou, Xiaolan, y Kenneth S. Ramos. 1992. "Modulation of Aortic Protein Phosphorylation by Benzo(a)Pyrene: Implications in PAH-Induced Atherogenesis". *Journal of Biochemical Toxicology* 7 (3): 147–54. <https://doi.org/10.1002/jbt.2570070303>.
- Palacio, Isabel C., Silvia B.M. Barros, y Deborah A. Roubicek. 2016. "Water-Soluble and Organic Extracts of Airborne Particulate Matter Induce Micronuclei in Human Lung Epithelial A549 Cells". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 812 (diciembre): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.003>.
- Palackal, N. T., M. E. Burczynski, R. G. Harvey, y T. M. Penning. 2001. "Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Trans-Dihydrodiols by Ubiquitously Expressed Aldehyde Reductase (AKR1A1)". *Chemico-Biological Interactions* 130–132 (1–3): 815–24.
- Pardo, Michal, Ziv Porat, Assaf Rudich, James J. Schauer, y Yinon Rudich. 2016. "Repeated Exposures to Roadside Particulate Matter Extracts Suppresses Pulmonary Defense Mechanisms, Resulting in Lipid and Protein Oxidative Damage". *Environmental Pollution* 210 (marzo): 227–37. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.009>.
- Penning, Trevor M., Michael E. Burczynski, Chien-Fu Hung, Kirsten D. McCoull, Nisha T. Palackal, y Laurie S. Tsuruda. 1999. "Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o - Quinones". *Chemical Research in Toxicology* 12 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1021/tx980143n>.
- Peters, A. 2003. "Mammalian DNA Mismatch Repair Protects Cells from UVB-Induced DNA Damage by Facilitating Apoptosis and P53 Activation". *DNA Repair* 2 (4): 427–35. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00003-X).
- Peterson-Roth, E., M. Reynolds, G. Quievryn, y A. Zhitkovich. 2005. "Mismatch Repair Proteins Are Activators of Toxic Responses to Chromium-DNA Damage". *Molecular and Cellular Biology* 25 (9): 3596–3607. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3596-3607.2005>.
- Pillai, R. S. 2005. "MicroRNA Function: Multiple Mechanisms for a Tiny RNA?" *RNA* 11 (12): 1753–61. <https://doi.org/10.1261/rna.2248605>.
- Pope, C. Arden, Richard T. Burnett, Michael J. Thun, Eugenia E. Calle, Daniel Krewski, Kazuhiko Ito, y George D. Thurston. 2002. "Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-Term Exposure to Fine Particulate Air Pollution". *JAMA* 287 (9): 1132–41.
- Pope, C. Arden, y Douglas W. Dockery. 2006. "Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines That Connect". *Journal of the Air & Waste Management Association* 56 (6): 709–42. <https://doi.org/10.1080/10473289.2006.10464485>.
- Quezada-Maldonado, Ericka Marel, Yesennia Sánchez-Pérez, Yolanda I. Chirino, Felipe Vaca-Paniagua, y Claudia M. García-Cuellar. 2018. "MiRNAs Deregulation in Lung Cells Exposed to Airborne Particulate Matter (PM10) Is Associated with Pathways Deregulated in Lung Tumors". *Environmental Pollution* 241 (octubre): 351–58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.073>.
- Ratti, Margherita, Andrea Lampis, Jens C. Hahne, Rodolfo Passalacqua, y Nicola Valeri. 2018. "Microsatellite Instability in Gastric Cancer: Molecular Bases, Clinical Perspectives, and New Treatment Approaches". *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (22): 4151–62. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2906-9>.
- Richman, Susan. 2015. "Deficient Mismatch Repair: Read All about It (Review)". *International Journal of Oncology* 47 (4): 1189–1202. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3119>.

- Romeo, Francesco, Lucia Falbo, Maddalena Di Sanzo, Roberta Misaggi, Maria C. Faniello, Giuseppe Viglietto, Giovanni Cuda, Francesco Costanzo, y Barbara Quaresima. 2011. "BRCA1 Is Required for HMLH1 Stabilization Following Doxorubicin-Induced DNA Damage". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (12): 1754–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.08.011>.
- Salcido-Neyoy, Martha Estela, Yesennia Sánchez-Pérez, Alvaro Román Osornio-Vargas, María Eugenia Gonsebatt, Jorge Meléndez-Zajgla, Rocío Morales-Bárceñas, Pavel Petrosyan, et al. 2015. "Induction of C-Jun by Air Particulate Matter (PM10) of Mexico City: Participation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". *Environmental Pollution* 203 (agosto): 175–82. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.051>.
- Sánchez-Pérez, Yesennia, Yolanda I. Chirino, Álvaro R. Osornio-Vargas, Rocío Morales-Bárceñas, Concepción Gutiérrez-Ruíz, Inés Vázquez-López, y Claudia M. García-Cuellar. 2009. "DNA Damage Response of A549 Cells Treated with Particulate Matter (PM10) of Urban Air Pollutants". *Cancer Letters* 278 (2): 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.010>.
- Sánchez-Pérez, Yesennia, Yolanda I. Chirino, Álvaro Román Osornio-Vargas, Luis A. Herrera, Rocío Morales-Bárceñas, Alejandro López-Saavedra, Imelda González-Ramírez, Javier Miranda, y Claudia María García-Cuellar. 2014. "Cytoplasmic P21CIP1/WAF1, ERK1/2 Activation, and Cytoskeletal Remodeling Are Associated with the Senescence-like Phenotype after Airborne Particulate Matter (PM10) Exposure in Lung Cells". *Toxicology Letters* 225 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.018>.
- Scanlon, Susan E., Christine D. Scanlon, Denise C. Hegan, Parker L. Sulkowski, y Peter M. Glazer. 2017. "Nickel Induces Transcriptional Down-Regulation of DNA Repair Pathways in Tumorigenic and Non-Tumorigenic Lung Cells". *Carcinogenesis* 38 (6): 627–37. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx038>.
- Seagrave, JeanClare, Jacob D. McDonald, Edward Bedrick, Eric S. Edgerton, Andrew P. Gigliotti, John J. Jansen, Lin Ke, et al. 2006. "Lung Toxicity of Ambient Particulate Matter from Southeastern U.S. Sites with Different Contributing Sources: Relationships between Composition and Effects". *Environmental Health Perspectives* 114 (9): 1387–93. <https://doi.org/10.1289/ehp.9234>.
- Shrivastava, Vibha, Hannah Marmor, Sholom Chernyak, Marc Goldstein, Miriam Feliciano, y Margarita Vigodner. 2014. "Cigarette Smoke Affects Posttranslational Modifications and Inhibits Capacitation-Induced Changes in Human Sperm Proteins". *Reproductive Toxicology* 43 (enero): 125–29. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.12.001>.
- Sigley, Justin, John Jarzen, Karin Scarpinato, Martin Guthold, Tracey Pu, Daniel Nelli, Josiah Low, y Keith Bonin. 2017. "Diffusion and Binding of Mismatch Repair Protein, MSH2, in Breast Cancer Cells at Different Stages of Neoplastic Transformation". Editado por Thomas Abraham. *PLOS ONE* 12 (1): e0170414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170414>.
- Simoneit, Bernd R.T. 2002. "Biomass Burning — a Review of Organic Tracers for Smoke from Incomplete Combustion". *Applied Geochemistry* 17 (3): 129–62. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(01\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(01)00061-0).
- Stojic, L. 2004. "Mismatch Repair-Dependent G2 Checkpoint Induced by Low Doses of SN1 Type Methylating Agents Requires the ATR Kinase". *Genes & Development* 18 (11): 1331–44. <https://doi.org/10.1101/gad.294404>.
- Su, Hong, Zhou Li, Samuel Fiati Kenston, Hongbo Shi, Yafei Wang, Xin Song, Yuanliang Gu, et al. 2017. "Joint Toxicity of Different Heavy Metal Mixtures after a Short-Term Oral Repeated-Administration in Rats". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (10): 1164. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101164>.

- Torgovnick, Alessandro, y Björn Schumacher. 2015. "DNA repair mechanisms in cancer development and therapy". *Frontiers in Genetics* 6 (abril). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>.
- Tseng-Rogenski, Stephanie S., Yasushi Hamaya, Daniel Y. Choi, y John M. Carethers. 2015. "Interleukin 6 Alters Localization of HMSH3, Leading to DNA Mismatch Repair Defects in Colorectal Cancer Cells". *Gastroenterology* 148 (3): 579–89. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.027>.
- Valeri, N., P. Gasparini, M. Fabbri, C. Braconi, A. Veronese, F. Lovat, B. Adair, et al. 2010. "Modulation of Mismatch Repair and Genomic Stability by MiR-155". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (15): 6982–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002472107>.
- Vuong, Ngoc Q., Dalibor Breznan, Patrick Goegan, Julie S. O'Brien, Andrew Williams, Subramanian Karthikeyan, Premkumari Kumarathasan, y Renaud Vincent. 2017. "In Vitro Toxicoproteomic Analysis of A549 Human Lung Epithelial Cells Exposed to Urban Air Particulate Matter and Its Water-Soluble and Insoluble Fractions". *Particle and Fibre Toxicology* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0220-6>.
- Wang, Tian, Wei Feng, Dan Kuang, Qifei Deng, Wangzhen Zhang, Suhan Wang, Meian He, Xiaomin Zhang, Tangchun Wu, y Huan Guo. 2015. "The Effects of Heavy Metals and Their Interactions with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Oxidative Stress among Coke-Oven Workers". *Environmental Research* 140 (julio): 405–13. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.013>.
- Wang, Yan, Lilin Xiong, y Meng Tang. 2017. "Toxicity of Inhaled Particulate Matter on the Central Nervous System: Neuroinflammation, Neuropsychological Effects and Neurodegenerative Disease: Inhaled PM on the CNS". *Journal of Applied Toxicology* 37 (6): 644–67. <https://doi.org/10.1002/jat.3451>.
- Wang, Yi-Ching, Yung-Pin Lu, Ruo-Chia Tseng, Ruo-Kai Lin, Jer-Wei Chang, Jung-Ta Chen, Chuen-Ming Shih, y Chih-Yi Chen. 2003. "Inactivation of HMLH1 and HMSH2 by Promoter Methylation in Primary Non-Small Cell Lung Tumors and Matched Sputum Samples". *Journal of Clinical Investigation* 111 (6): 887–95. <https://doi.org/10.1172/JCI200315475>.
- Weißbecher, Isabel M., Inga Hinrichsen, Sebastian Funke, Thomas Oellerich, Guido Plotz, Stefan Zeuzem, Franz H. Grus, Ricardo M. Biondi, y Angela Brieger. 2018. "DNA Mismatch Repair Activity of MutL α Is Regulated by CK2-Dependent Phosphorylation of MLH1 (S477)". *Molecular Carcinogenesis* 57 (12): 1723–34. <https://doi.org/10.1002/mc.22892>.
- Xinarianos, G., T. Liloglou, W. Prime, P. Maloney, J. Callaghan, P. Fielding, J. R. Gosney, y J. K. Field. 2000. "HMLH1 and HMSH2 Expression Correlates with Allelic Imbalance on Chromosome 3p in Non-Small Cell Lung Carcinomas". *Cancer Research* 60 (15): 4216–21.
- Yanamadala, Sunitha, y Mats Ljungman. 2003. "Potential Role of MLH1 in the Induction of P53 and Apoptosis by Blocking Transcription on Damaged DNA Templates". *Molecular Cancer Research: MCR* 1 (10): 747–54.
- Yang, Lawei, Gang Liu, Ziyang Lin, Yahong Wang, Huijuan He, Tie Liu, y David W. Kamp. 2016. "Pro-Inflammatory Response and Oxidative Stress Induced by Specific Components in Ambient Particulate Matter in Human Bronchial Epithelial Cells: The Elemental NI in PM2.5 Increased the Expression of IL-1 β ". *Environmental Toxicology* 31 (8): 923–36. <https://doi.org/10.1002/tox.22102>.
- Zhang, Mu, Chen Hu, Dan Tong, Shengyan Xiang, Kendra Williams, Wenlong Bai, Guo-Min Li, Gerold Bepler, y Xiaohong Zhang. 2016. "Ubiquitin-Specific Peptidase 10 (USP10) Deubiquitinates and Stabilizes MutS Homolog 2 (MSH2) to Regulate

- Cellular Sensitivity to DNA Damage”. *Journal of Biological Chemistry* 291 (20): 10783–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700047>.
- Zhang, Mu, Shengyan Xiang, Heui-Yun Joo, Lei Wang, Kendra A. Williams, Wei Liu, Chen Hu, et al. 2014. “HDAC6 Deacetylates and Ubiquitinates MSH2 to Maintain Proper Levels of MutSc”. *Molecular Cell* 55 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.028>.
- Zhao, Hong, Anthony P. Albino, Ellen Jorgensen, Frank Traganos, y Zbigniew Darzynkiewicz. 2009. “DNA Damage Response Induced by Tobacco Smoke in Normal Human Bronchial Epithelial and A549 Pulmonary Adenocarcinoma Cells Assessed by Laser Scanning Cytometry”. *Cytometry Part A* 75A (10): 840–47. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20778>.
- Zhao, Renwu, Zhiqiang Guo, Ruxin Zhang, Congrui Deng, Jian Xu, Weiyang Dong, Zhicong Hong, et al. 2018. “Nasal Epithelial Barrier Disruption by Particulate Matter ≤ 2.5 Mm via Tight Junction Protein Degradation: PM2.5 INDUCES NASAL EPITHELIAL BARRIER DYSFUNCTION”. *Journal of Applied Toxicology* 38 (5): 678–87. <https://doi.org/10.1002/jat.3573>.
- Zhou, Yi, Lianshui Li, y Lei Hu. 2017. “Correlation Analysis of PM10 and the Incidence of Lung Cancer in Nanchang, China”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (10): 1253. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101253>.

11. REFERENCIAS EN LÍNEA:

1. Organización Mundial de la Salud, 2018, Calidad del aire y salud. En línea: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
2. Pray, L. (2008) DNA Replication and Causes of Mutation. *Nature Education* 1(1):214. En línea: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-replication-and-causes-of-mutation-409>
3. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2013. Cuadernos de divulgación ambiental. Calidad del aire: una práctica de vida. En línea: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2013/CD001593.pdf>
4. United States Environmental Protection Agency, 2017. Criteria Air Pollutants. En línea: <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants>
5. United States Environmental Protection Agency, Vocabulary Catalog: Greenhouse Gas Emissions & Sinks Glossary. En línea: https://ofmpub.epa.gov/sor_internet/registry/termreg/searchandretrieve/glossariesandkeywordlists/search.do;jsessionid=l4szdceP1-ZmwU5lcMO3i0w3U7XkgurkHmO9Bgy0Tmd2yFXo9ZmT!941367976?details=&vocabName=Greenhouse%20Emissions%20Glossary&filterTerm=air%20pollution&c

[checkedAcronym=false&checkedTerm=false&hasDefinitions=false&filterTerm=air%20pollution&filterMatchCriteria=Contains](#)

6. World Health Organization, 2018. Cancer. En línea:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>