



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Las PM₁₀ inducen evasión de apoptosis a través de la
activación de STAT3 vía las cinasas PKC ζ y Src**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A:

M. EN C. SILVIA ELIZABETH REYES ZÁRATE

Co-Directora: Dra. Verónica Souza Arroyo
Co-Directora: Dra. Claudia María García Cuellar
Asesora: Dra. Yesennia Sánchez Pérez

Ciudad de México, julio de 2016.

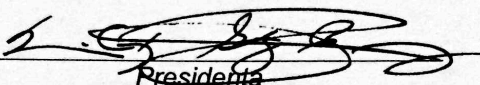
El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

El trabajo de investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos SEP-CONACYT CB-2011-180471 y SEP-CONACYT CB-2011-166042.

El Doctorado en Biología Experimental fue apoyado por el CONACYT a través de la beca otorgada durante el periodo 2011-2015 (CVU 59551).

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y en el Laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente del Instituto Nacional de Cancerología.

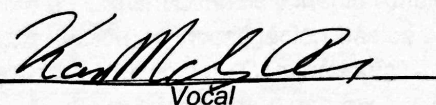
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Las PM₁₀ inducen evasión de apoptosis a través de la activación de STAT3 vía las cinasas PKC ζ y Src”, con fecha 26 julio de 2016.



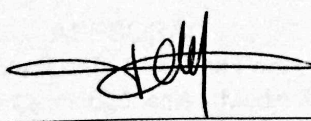
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Dra. Yesennia Sánchez Pérez
Laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente,
Instituto Nacional de Cancerología



Dra. Karina Martínez Flores
Laboratorio de Líquido Sinovial,
Instituto Nacional de Rehabilitación



Dra. Yolanda Irasema Chirino López
Laboratorio de Toxicología y Carcinogénesis,
Unidad de Biomedicina,
Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA

Dra. Verónica Souza Arroyo

Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
veso@xanum.uam.mx

CODIRECTORA

Dra. Claudia María García Cuellar

Laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología
claudia.garciac@salud.gob.mx

ASESORA:

Dra. Yesennia Sánchez Pérez

Laboratorio de Carcinogénesis y Medio Ambiente
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología
yesennia.sanchez@salud.gob.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa por permitirme llevar a cabo mis estudios de doctorado. Me siento muy orgullosa de pertenecer a esta institución.

A mi comité tutorial compuesto por la Dra. Verónica Souza, Dra. Claudia García y la Dra. Yesennia Sánchez, por su constante apoyo, sugerencias y observaciones realizadas durante la realización del proyecto.

A la Dra. Concepción Gutiérrez, quién me permitió integrarme al Laboratorio de Fisiología Celular en circunstancias complicadas durante el desarrollo experimental de mi proyecto. Asimismo deseo expresar mi agradecimiento a los profesores del Laboratorio: Dra. Verónica Souza, Dr. Luis E. Gómez, Dra. Leticia Bucio y Dra. Roxana Miranda, por su confianza y porque siempre tenían una sugerencia o comentario importante para mi proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Concepción Gutiérrez, Dra. Yesennia Sánchez, Dra. Karina Martínez, Dra. Irasema Chirino, Dra. Leticia Bucio, por sus valiosas aportaciones al trabajo.

Al Dr. Luis y a la Dra. Vero, por permitirme entrar a sus hermosas clases y enamorarme de la transducción de señales.

A todos mis compañeros y amigos de la UAM-I y de Cancerología, que por su invaluable amistad, su tiempo y apoyo hicieron más divertido y menos complicado mi transitar en este periodo de mi vida. Mi más sincero y profundo agradecimiento para Chío (doblemente agradecida por el préstamo de tus micropipetas), Patita Rosales, Ime, Angelitos, Sorashita, Lizbeth, May, Naty, Cris, Carlos, Deni, Benja, Kari, Arturo, Marelita, Gaby López, Inés, Raúl, Adriana, Miguel, Yan. Gracias por estos fabulosos años!!!!

A mi familia quienes en todo momento me impulsaron a seguir mi camino y justificar mi ausencia involuntaria y prolongada, especialmente a Juan, mi papá, mis hermanos, sobrinos, Lile, Barbarín, Clau, Lupe, Tere, Martha, Gloria, Memo, Marina, Ramón, Pilar, Héctor y Sara.

A mis amigas de siempre: Gaby, Lisilla, Emma, Brenda, Lucy, Almiux, Edi, Malenita, Lorita, por sus porras y porque el tiempo y la distancia no existe entre nosotras.

DEDICATORIAS

A ti Juan con todo mi amor y por lo maravilloso que es caminar y compartir mi vida junto a ti. Gracias infinitas por tu apoyo incondicional.

A ti padre, por tu amor, por tu valiosa presencia y por la riqueza de tus palabras.

A mis amados hermanos,
A mis maravillosos sobrinos
y a sus lindas mamás.

A ti madre que te llevo tatuada en mi corazón.

RESUMEN

Las partículas atmosféricas con diámetro aerodinámico igual o menor a 10 micrómetros (PM_{10}), forman parte de la contaminación atmosférica, principalmente de zonas urbanas, y son consideradas un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón aunque, poco se conoce sobre los mecanismos implicados en ello. Se ha reportado que las PM_{10} inducen a $p21^{Waf1/Cip1}$ en células epiteliales de pulmón, una proteína crítica que es inducida después de daño al DNA. Sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados en la inducción de $p21^{Waf1/Cip1}$ después de la exposición con PM_{10} . STAT3 es un factor de transcripción que regula proteínas relacionadas con el ciclo celular como $p21^{Waf1/Cip1}$, por lo que STAT3 está asociada con procesos proliferativos y sobrevivencia celular. En este trabajo se evaluó la vía de activación de STAT3 y su impacto en los niveles de $p21^{Waf1/Cip1}$, en el ciclo celular y la apoptosis en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a $10 \mu g/cm^2$ de PM_{10} . Los resultados mostraron que $p21^{Waf1/Cip1}$ es inducida por la exposición con PM_{10} vía la activación de STAT3 mediada por las cinasas Src y PKC ζ , como fue esclarecido con el uso de inhibidores específicos de estas cinasas. Se encontró que STAT3 participó en la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 y previno la apoptosis en las células expuestas a PM_{10} . Además, se determinó que la inhibición de la fosforilación de STAT3 evitó la detención del ciclo celular y se observó un incremento significativo de un 28% en los niveles de apoptosis, en comparación con las células control, lo que sugiere que STAT3 juega un papel antiapoptótico. Aunado a lo anterior, se encontró que la activación de STAT3 en células expuestas a PM_{10} ocasionó la estabilización de $p21^{Waf1/Cip1}$ en citoplasma, y se ha reportado que tiene como consecuencia funcional la no detención del ciclo celular, evento asociado con la promoción de carcinogénesis y progresión tumoral. En este trabajo se propone un mecanismo de señalización para la inducción de la proteína $p21^{Waf1/Cip1}$ a través de la fosforilación de STAT3, mediado por las cinasas Src y PKC ζ en células epiteliales de pulmón expuestas a PM_{10} . El mecanismo de activación de STAT3 que se reporta, es diferente al convencional, ya que la cinasa PKC ζ está implicada en la fosforilación del

residuo S727, evento relacionado con sobrevivencia celular. En conclusión, en este trabajo se demostró que células A549 expuestas con PM₁₀ indujeron la fosforilación de STAT3 en Y705 y S727 mediado por las cinasas Src y PKCζ respectivamente. Este evento se asoció con el incremento de p21^{Waf1/Cip1}, así como con la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 y previniendo la apoptosis.

ABSTRACT

Atmospheric particulate matter with aerodynamic diameter ≤ 10 micrometers, PM₁₀, mainly contributes to atmospheric pollution in urban zones. PM₁₀ is considered a risk factor for the development of lung cancer, although the mechanism underlying this process is still not elucidated. It has previously reported the induction of p21^{Waf1/Cip1} in lung epithelial cells exposed to PM₁₀, which is a critical protein induced after DNA damage. However, the mechanisms involved in p21^{Waf1/Cip1} induction after PM₁₀ exposure are unknown. STAT3 acts as a transcription factor that regulates the expression of cell cycle proteins such as p21^{Waf1/Cip1}, so STAT3 is associated with the proliferation process and cell survival. This work evaluated the STAT3 activation pathway and its impact on p21^{Waf1/Cip1} levels, cell cycle and apoptosis in A549 lung epithelial cells exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM₁₀. The results showed that PM₁₀ induced p21^{Waf1/Cip1} via STAT3 activation by Src and PKC ζ kinases, which was elucidated using specific inhibitors of these kinases. It also found that STAT3 mediated G0-G1 cell cycle arrest and prevented apoptosis in PM₁₀ exposed cells. Furthermore, it was determined that inhibition of STAT3 phosphorylation prevented cell cycle arrest, and a significant increase of 28% in the levels of apoptosis was observed, compared to control cells, suggesting that STAT3 plays an anti-apoptotic role. In addition to this, it found that STAT3 activation in cells exposed to PM₁₀ caused p21^{Waf1/Cip1} cytoplasm stabilization, which according to literature has no cell cycle arrest, event related to promoting carcinogenesis and tumor progression. In this work a signaling mechanism is proposed by which lung epithelial cells exposed to PM₁₀ induces p21^{Waf1/Cip1} through STAT3 phosphorylation mediated by Src and PKC ζ kinases. The STAT3 activation mechanism reported here is different from the canonical pathway, given that PKC ζ kinase is involved in the phosphorylation S727 residue, event related with cell survival. In conclusion, PM₁₀ induces phosphorylation of STAT3 at Y705 and S727 through Src and PKC ζ , respectively; this event is related to an increased p21^{Waf1/Cip1} expression level, inducing G0-G1 cell cycle arrest and preventing apoptosis.

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas	1
1	Introducción 3
1.1	Evaluación de la calidad del aire 4
1.2	Partículas suspendidas en la atmósfera 5
1.3	Partículas con diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm , PM ₁₀ 6
2	Antecedentes 8
2.1	PM ₁₀ y los efectos en la salud humana 8
2.2	PM ₁₀ y sus efectos a nivel celular 10
2.3	Ciclo celular y su regulación 13
2.4	PM ₁₀ y su efecto en el ciclo celular 15
2.5	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) 16
2.6	Mecanismo de activación de STAT3 18
3	Planteamiento del problema y justificación 22
4	Hipótesis 23
5	Objetivos 24
6	Materiales y Métodos 25
6.1	Muestreo de PM ₁₀ 25
6.2	Cultivo celular 26
6.3	Ensayo de viabilidad 26
6.4	Diseño experimental para la exposición de A549 con PM ₁₀ 27
6.5	Lisis celular y extracción de proteína total 29
6.6	Determinación de STAT3, EGFR, ERK1/2, PKC ζ y p21 ^{Waf1/Cip1} por Western blot 30

ÍNDICE

6.7	Evaluación de la interacción entre cinasa y su proteína blanco por inmunoprecipitación de proteínas	32
6.8	Evaluación del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo	34
6.9	Localización subcelular de p21 ^{Waf1/Cip1} por inmunofluorescencia	36
6.10	Análisis estadístico	37
7	Resultados	38
7.1	La viabilidad de las células A549 no fue afectada después de la exposición con PM ₁₀	38
7.2	Las PM ₁₀ inducen la fosforilación en Y705 y S727 de STAT3	39
7.3	El receptor EGF no es inducido por las PM ₁₀	43
7.4	La cinasa Src es inducida por las PM ₁₀ y participa en la fosforilación de STAT3 en el residuo Y705	45
7.5	Las PM ₁₀ inducen a ERK1/2 y PKCζ, pero PKCζ es la relacionada con la fosforilación de STAT3 en S727	50
7.6	Las PM ₁₀ inducen un incremento de p21 ^{Waf1/Cip1} mediado por la fosforilación de STAT3 a través de las cinasas Src y PKCζ	57
7.7	Las PM ₁₀ inducen la estabilización en citoplasma de p21 ^{Waf1/cip1} y este efecto es dependiente de STAT3	63
7.8	Las PM ₁₀ inducen la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 y STAT3 previno la apoptosis	65
8	Discusión	68
9	Conclusiones	75
10	Perspectivas	76
11	Referencias	77

LISTA DE ABREVIATURAS

A549	Células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano
Abl	Cinasa abelson
ACS	Sociedad Americana del Cáncer
Balb/c	Fibroblastos de ratón
BEAS-2B	Células de epitelio bronquial humano
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
DEP's	Partículas que provienen de la combustión de un motor a diésel
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK1/2	Cinasa de respuesta extracelular1/2
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
HAEC	Células epiteliales de vías respiratorias humanas
HAP's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
I-PKCζ	Inhibidor de la actividad de PKCζ
IARC	Agencia internacional para la investigación del cáncer
IL-6	Interleucina-6
J774A.1	Monocitos de ratón
JAK	Cinasa janus
MIP-2	Proteína-2 inflamatoria de Macrófago
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NOM	Norma Oficial Mexicana
O ₃	Ozono
Pb	Plomo
PBS	Buffer salino de fosfatos
pEGFR-Y845	EGFR fosforilada en tirosina 845
pERK1/2-T202	ERK1/2 fosforilada en treonina 202
PKCζ	Proteína cinasa C isoforma zeta
PM ₁₀	Partículas con diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm
PM _{2.5}	Partículas con diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm
PP2A	Fosfatasa de treonina/serina 2A
pPKCζ-T410	PKCζ fosforilada en treonina 410
PS	Partículas suspendidas
pSrc-Y418	Src fosforilada en tirosina 418
PST	Partículas suspendidas totales

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

pSTAT3-S727	STAT3 fosforilada en serina 727
pSTAT3-Y705	STAT3 fosforilada en tirosina 705
PTPRT	Fosfatasa de tirosina del receptor T, conocida como PTPp
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SHP1	Fosfatasa 1 con dominio SH2
SHP2	Fosfatasa 2 con dominio SH2
SO ₂	Dióxido de azufre
Src	Cinasa Src
STAT3	Transductor de señales y factor de transcripción 3
Stattic V	Inhibidor de la fosforilación en Y705 de STAT3
SU6656	Inhibidor de la actividad de Src cinasa
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UF	Partículas ultrafinas con diámetro aerodinámico $\leq 0.1 \mu\text{m}$
UNEP	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
WHO	Organización Mundial de la Salud
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Microgramos por centímetro cuadrado
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	Microgramos por metro cúbico
μm	Micrómetro

1 INTRODUCCIÓN

El aire contiene alrededor de 78.08% de nitrógeno, 20.95% de oxígeno, 0.93% de argón, 0.03% de dióxido de carbono, cantidades menores de 0.01% de helio y neón, y además contiene miles de partículas suspendidas por litro de aire (Jacobson, 2002; Phalen, 2004). La contaminación del aire se define como la presencia de uno o más contaminantes (polvo, ceniza, humo, bruma, gases, partículas) en suficientes cantidades y tiempos de residencia en la atmósfera, los cuales son capaces de provocar daños a la salud de las personas, animales y plantas, además de deteriorar la infraestructura urbana, como monumentos históricos, edificios y esculturas (Peavy, et al., 1986, Jacobson, 2002).

Los riesgos a la salud humana asociados a la contaminación del aire fueron reconocidos como perjudiciales desde la edad media (Jacobson, 2002). El evento de niveles elevados de contaminantes atmosféricos en Londres en 1952, dio lugar a que el Parlamento Inglés, en 1956, aprobara la Ley de Aire Limpio, la primera legislación en el mundo en relación a la contaminación del aire (Jacobson, 2002; Phalen, 2004; Sellers, 2007). Desde 1974 el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) han estado colaborando en un programa de monitoreo urbano de la calidad del aire en megaciudades, para abordar el problema de contaminación. Una megaciudad es definida como conjuntos urbanos con una población de 10 millones o más de habitantes, sin embargo, no son necesariamente las ciudades más contaminadas, aunque tienen problemas serios de contaminación, y entre ellas se encuentran la Ciudad de México, Bombay, Beijing, Jakarta, Los Ángeles, Moscú, Calcuta, Shangai, Delhi y Manila (Molina y Molina, 2005).

El episodio de contaminación del aire en Londres, entre otros, llamó la atención sobre el impacto de la contaminación atmosférica sobre la salud humana, por lo que la comunidad científica se centró en el estudio de los efectos adversos sobre la salud de la contaminación del aire ambiente (Ling and van Eeden, 2009). Actualmente, se sabe que la contaminación del aire es un factor de riesgo muy importante con

implicaciones globales en la salud pública (Dockery and Pope, 1994), y la Organización Mundial de la Salud estimó que la contaminación del aire, causó 3.7 millones de muertes prematuras en todo el mundo en el 2012 (WHO, 2014).

1.1 Evaluación de la calidad del aire

En la evaluación de la calidad del aire se emplean estándares o valores de referencia para la protección de la salud pública, lo cual permite vigilar su cumplimiento. En el caso particular de México, los estándares se encuentran publicados en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) a través del Diario Oficial de la Federación (DOF), en el que se establecen los límites permisibles de los contaminantes criterio y que son de observación obligatoria en todo el país (SIMAT, 2015). Los contaminantes atmosféricos considerados criterio son: dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO_2), ozono (O_3), plomo (Pb) y partículas suspendidas con diámetro aerodinámico igual o menor a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) y partículas con diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$). Los valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas en el aire ambiente son: (a) PM_{10} de $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en un promedio de 24 h y $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en promedio anual; (b) $\text{PM}_{2.5}$ es de $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para un promedio de 24 h y de $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual (SIMAT, 2015). El diámetro aerodinámico (DA) es el diámetro de una partícula hipotéticamente esférica con las mismas características de movimiento de la partícula en cuestión (Dockery and Pope, 1994; Phalen et al., 2006), es decir, que tienen la misma velocidad de sedimentación independientemente de su tamaño, forma o densidad. El usar el DA permite comparar diferentes partículas en términos de cómo sedimenta en la corriente o flujo de aire (Flagan and Seinfeld, 1988).

Por otra parte, es importante resaltar que las PM_{10} contienen a las $\text{PM}_{2.5}$ (Englert, 2004) y el análisis gravimétrico indica que la relación promedio $\text{PM}_{2.5}/\text{PM}_{10}$ varía entre diversas zonas urbanas del mundo (tabla 1). Este indicador permite saber la proporción que hay de $\text{PM}_{2.5}$ cuando se colecta PM_{10} . Históricamente se ha sugerido que las $\text{PM}_{2.5}$ afectan en mayor medida la salud humana debido a su

tamaño ya que pueden ingresar más profundamente a los pulmones (Pope and Dockery, 2006). Sin embargo, al caracterizar la fracción de tamaño de una muestra de PM₁₀, se encontró que partículas con DA de 0.6 a 0.87 µm formaron parte de esta muestra de manera importante (Hawley et al., 2015), sugiriendo que sus posibles efectos aditivos sobre la salud son debidos a la carga tóxica de PM₁₀ y de PM_{2.5}. Se sabe que las PM₁₀ inhaladas podrían inducir mediadores pro-inflamatorios de los pulmones a la circulación sistémica, generando toxicidad extrapulmonar, a nivel de cerebro y corazón (Farina et al., 2013).

Tabla 1. Relación PM_{2.5}/PM₁₀ en diversas partes del mundo.

Ciudad, País	Relación PM _{2.5} /PM ₁₀	Referencia
Barcelona, España	0.70	Querol et al., 2001.
Guangzhou, China	0.68	Wang et al., 2006.
Zurich, Suiza	0.61	Hueglin et al., 2005.
Nueva Delhi, India	0.48	Tiwari et al., 2009.
Shanghai, China	0.64	Wang et al, 2013.
Ciudad de México	0.47	Vega et al., 2004
Torino, Italia	0.68	Alessandria et al., 2014

1.2 Partículas suspendidas en la atmósfera

Las partículas suspendidas en el aire son una mezcla compleja de sustancias en estado líquido o sólido que se modifica en espacio y tiempo y que permanece suspendido en la atmósfera por periodos variables de tiempo. Por su origen, las partículas pueden definirse como **primarias** (aquellas producidas directamente por alguna fuente contaminante) o **secundarias** (las que se forman en la atmósfera, como resultado de la interacción química entre gases y partículas primarias). La contaminación de partículas abarca las emisiones de **fuentes naturales** y **antropogénicas**. Las naturales incluye al polvo arrastrado por el viento, ceniza volcánica, polen, esporas de hongos, las partículas que provienen de incendios forestales y erupciones volcánicas. Las partículas generadas por la actividades

humanas incluyen la quema de combustibles fósiles (especialmente las generadas por los vehículos automotores y de las centrales eléctricas), así como de los procesos industriales y de la construcción. La principal fuente de partículas suspendidas en áreas urbanas son: el transporte, las fábricas y las estaciones generadoras de energía (Pöschl, 2005; Dockery, 2009; Ghio et al., 2012; Kelly and Fusell, 2012). Otra fuente importante son las partículas emitidas por la combustión de diésel denominadas DEPs (por su siglas en inglés), que tienen un diámetro aerodinámico que varía de 0.03 a 1 μm (Cao et al., 2007) y es uno de los componentes de las PM_{10} (Kafoury and Kelley, 2005; Marr et al., 2006). En la Ciudad de México, por ejemplo, se ha estimado, que la aportación de DEPs a la contaminación de la Ciudad es entre el 5 y el 8%. (Vega et al., 1997; Vega et al., 2009).

1.3 Partículas con diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm , PM_{10}

Las PM_{10} son partículas que pasan a través de un cabezal de tamaño selectivo de 10 μm de diámetro aerodinámico con una eficiencia de corte del 50% (Alessandria et al., 2014). PM_{10} es el término utilizado para describir partículas suspendidas en la atmósfera, constituida por una mezcla compleja de compuestos, entre los que se encuentran metales de transición, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs, por sus siglas en inglés), especies químicas de origen secundario como nitratos, sulfatos y amonio, material biológico como endotoxinas, polen (Englert, 2004; Pöschl, 2005; Valavanidis et al., 2008; Kelly and Fussell, 2012; Manzano-León et al., 2013, Salcido-Neyoy et al., 2015). Es importante resaltar que los componentes de las PM_{10} pueden ser más importantes que sólo la concentración de partículas para explicar los efectos que producen en la salud humana (Rohr and Wyzga, 2012).

Las PM_{10} pueden permanecer suspendidas en el aire durante días a semanas (Jacobson, 2002) y debido a su tamaño pueden ingresar a las vías respiratorias, razón por la que se le conoce como la fracción respirable del material particulado (Englert, 2004). En promedio un adulto respira de 10 a 15 m^3 de aire al día, por lo

que el sistema respiratorio es blanco de los efectos nocivos de los contaminantes del aire y en particular del ingreso de partículas suspendidas (US-EPA 1997; Phalen et al. 1988; Phalen et al., 2006). Las partículas con un diámetro mayor de 0.5 micrómetros (μm) y que no fueron filtradas en la nasofaringe, pueden depositarse por impactación en diversos puntos del tracto respiratorio. El impulso de estas partículas en la corriente de aire inhalada, pueden chocar en la superficie de los puntos de ramificación en la región traqueobronquial del pulmón. Sin embargo, hay partículas que no se retiran de la corriente de aire por impactación por lo que pueden depositarse en los bronquios y bronquiolos por sedimentación, debido a la disminución de la velocidad de corriente del aire y la fuerza de la gravedad de las partículas (US-EPA 1997).

2 ANTECEDENTES

2.1 PM₁₀ y los efectos en la salud humana

A través de los estudios epidemiológicos, que utilizan herramientas matemáticas y estadísticas para elaborar modelos de exposición, se puede determinar la relación entre la salud y la contaminación por partículas suspendidas. Los estudios epidemiológicos que evalúan la asociación de la exposición de partículas con el incremento de mortalidad utilizan dos modelos de exposición: (a) la exposición a corto plazo que refleja la variabilidad de los cambios en la concentración del material particulado día a día y (b) la espacial, es decir la variabilidad que refleja diferencias a largo plazo de exposición, que va de años a décadas. La exposición a corto plazo captura solo una pequeña cantidad de los efectos globales a la salud a diferencia de la exposición de partículas a largo plazo. La evidencia epidemiológica global sugiere que los efectos adversos a la salud dependen de ambos tipos de exposición y que la exposición a largo plazo tiene más efectos acumulativos que la exposición a corto plazo (Pope, 2007).

En México, existen reportes de la asociación entre el ozono (un contaminante gaseoso) y PM₁₀, determinándose que el 8.8% de los individuos encuestados tuvieron bronquitis crónica y esta cifra se incrementa con una mayor exposición a estos contaminantes. También se reportó una relación importante con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, respiratorias, así como mortalidad (Santos-Burgoa, et al., 1995). Por otra parte, las concentraciones atmosféricas de PM₁₀ y PM_{2.5} se relacionaron con los registros de muerte en 6 delegaciones del Distrito Federal y se determinó que el incremento de 10 µg/m³ se asoció con un aumento de 1.3 a 1.7% de mortalidad cuatro días después de presentarse el incremento (Borja-Aburto et al., 1998). Además se ha estimado, a través de la metodología de Evaluación del Impacto a la Salud (HIA, por sus siglas en inglés) que una reducción de 20 µg/cm³ de PM₁₀ evitaría 2,300 muertes por año en la Ciudad de México, (Riojas-Rodríguez et al., 2014).

Por otra parte, se estudió el efecto de las PM_{10} en la mortalidad debida a enfermedades respiratorias en 32 ciudades de China. Este estudio, realizó una evaluación sub-crónica, es decir, una exposición de manera mensual, de 2006-2010. En este trabajo se reportó que el incremento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PM_{10} , se asoció con 1.05% de mortalidad por causas respiratorias en adultos y esta mortalidad se incrementó 1.62% en ancianos, aunque no se encontró significancia estadística entre la mortalidad por PM_{10} en adultos jóvenes (Zhou et al., 2015).

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que las partículas tienen una estrecha relación con el estado de salud, debido a que pueden depositarse en los pulmones y causar cáncer de pulmón, aunque también se las ha asociado con otras neoplasias como cáncer en mama y ovario (Iwai, et al., 2005; IARC, 2013), así como en las vías urinarias, vejiga, útero, e hígado (IARC, 2013). Estos trabajos han proporcionado también evidencia para vincular los efectos de las partículas en poblaciones vulnerables como aquellas personas con enfermedades preexistentes como asma y afecciones cardiovasculares (Kelly and Fusell, 2012).

En estos trabajos se utilizan grandes bases de datos de varios años de estudio, como el realizado por la Sociedad Americana del Cáncer (ACS, por sus siglas en inglés) entre los años de 1982 a 1998. En este trabajo participaron aproximadamente 1.2 millones de adultos, pero alrededor de 500,000 personas fueron las que mostraron una asociación entre la exposición con $PM_{2.5}$ y la mortalidad por causas cardiovasculares y cáncer de pulmón. Se reportó que un incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la concentración ambiental de $PM_{2.5}$, se asoció como un factor de riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón del 8% (Pope et al., 2002).

Las partículas suspendidas son consideradas un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón (Andreau et al., 2012; IARC, 2013; Raaschou-Nielsen et al., 2013; Cui et al., 2014; Lovera-Leroux et al., 2015). En octubre del 2013, 24 expertos de 11 países se reunieron en la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), en Lyon, Francia, para evaluar la carcinogenicidad de la contaminación del aire y se concluyó que las

partículas son un agente carcinogénico para el ser humano (IARC, 2013; Loomis et al., 2013).

La IARC clasificó a las partículas dentro del grupo I, lo cual indica que las partículas son cancerígenas para los seres humanos. Esta categoría se utiliza cuando hay evidencia suficiente de carcinogenicidad en humanos y esta determinación se basó en la recopilación de evidencias relacionadas con $PM_{2.5}$ y PM_{10} y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Loomis et al., 2013). La evaluación de la IARC, mostró que existe un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón con el aumento de los niveles de exposición a las partículas y la contaminación atmosférica. Aunque la composición de la contaminación del aire y los niveles de exposición pueden variar de un lugar a otro, las conclusiones del grupo de trabajo se aplican a todas las regiones del mundo (IARC, 2013). La IARC basó sus conclusiones en una revisión de más de 1,000 artículos científicos realizados en los 5 continentes en el que se analizó el riesgo de desarrollar cáncer causado por diversos contaminantes presentes en la atmósfera, especialmente las partículas suspendidas (WHO, 2013).

2.2 PM_{10} y sus efectos a nivel celular

Si bien las PM_{10} son consideradas factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón, poco se conoce sobre los mecanismos implicados en ello. El efecto pro-inflamatorio es una respuesta en fase aguda provocada por la alteración en la homeostasis del sistema y se ha identificado que las PM_{10} ocasionan tal impacto. La secreción de interleucina-6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF\alpha$), se utilizaron en un estudio como indicadores de procesos inflamatorios en monocitos de ratón (células J774A.1) expuestas a PM_{10} (Alfaro-Moreno et al., 2002; Osornio-Vargas et al., 2003). Los resultados mostraron que las partículas colectadas en el centro de la Ciudad de México provocaron mayor secreción de estos indicadores en comparación con las del norte y sur. La IL-6 es una citocina que su principal papel es mediar la inflamación de vías aéreas asociada con infección o a un insulto tóxico

(Schirilo et al., 2010). Se ha reportado una inducción importante de IL-6 cuando células epiteliales de pulmón humano A549 son expuestas con el extracto orgánico y acuoso de PM₁₀ colectadas en Torino, Italia, aunque no hay diferencia en la producción de IL-6 entre el extracto acuoso y orgánico expuestos a la células. Sin embargo, las PM₁₀ colectadas durante invierno provocaron una mayor inducción de la IL-6 con respecto a las partículas de verano (Schirilo et al., 2010). A través de modelación factorial, se estimó que la concentración de partículas, su composición así como los efectos biológicos inducidos por éstas varían de acuerdo al tiempo/espacio donde el material particulado es colectado (Rosas et al., 2007).

Se ha observado que los mecanismos que median la toxicidad de las partículas podría deberse a su capacidad para inducir estrés oxidante y mediadores inflamatorios (Chow et al., 2006; Pope y Dockery, 2006). Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son generadas como productos intracelulares del metabolismo del oxígeno y se asocian con la regulación de diversos procesos como la proliferación celular, senescencia, diferenciación, muerte celular y cáncer (Shackelford et al., 2000; Valko et al., 2006). Se ha reportado que las PM₁₀ poseen potencial oxidante a través de la generación de ROS (Donaldson et al., 1996; Møller et al., 2008; Sánchez-Pérez et al., 2009; Chirino et al., 2010; Shang et al., 2013).

Se ha reportado que las células tumorales, comparadas con células normales, presentan mayores niveles de ROS y son capaces de sobrevivir y proliferar, indicando que las ROS, pueden jugar un papel importante en la estimulación de la proliferación celular. Los cambios intracelulares del estado redox a un ambiente más oxidado debido al H₂O₂ producido en células tumorales, pueden inducir fosforilación y activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que inicia la activación de diversas cascadas de señales celulares relacionadas con el ciclo celular. Por otra parte, se ha reportado que existen diversas vías de señalización intracelulares activadas por ROS que pueden estimular la proliferación celular a través de los receptores de tirosina cinasas que podría activar río abajo a las MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos), que fosforilan diversos factores de

transcripción e inducen la expresión de muchos genes relacionados con el ciclo celular (Shackelford et al., 2000; Boonstra and Post, 2004; Valko et al., 2006).

Se ha identificado que componentes de las PM₁₀, como los metales, poseen potencial oxidante. El estrés oxidante ha sido evaluado en células epiteliales de pulmón humano A549 expuestas a PM₁₀ a través de la medición de diferentes indicadores como la generación de ROS y productos de la oxidación de biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA, efectos que se ven disminuidos cuando las células son protegidas con un antioxidante (Sánchez-Pérez et al., 2009; Chirino et al., 2010; Møller et al, 2010).

Por otra parte, se ha evaluado la capacidad mutagénica de partículas en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, encontrando que las PM₁₀, en comparación con las partículas suspendidas totales (PST), mostraron mayor actividad mutagénica asociado al contenido de compuestos orgánicos en las partículas (Villalobos-Pietrini et al., 1995).

Los resultados en diversos estudios *in vitro* realizados en células A549, de epitelio bronquial humano (BEAS-2B), de monocitos y fibroblastos de ratón (J774A.1 y Balb/c, respectivamente), han mostrado que las PM₁₀ induce daño en el DNA (Alfaro-Moreno et al., 2002; García-Cuellar et al., 2002; De Vizcaya-Ruiz et al., 2006; Soberanes et al., 2006; Sánchez-Pérez et al., 2009; Gualtieri et al., 2011; Shang et al., 2013). Sin embargo, a pesar del daño en el DNA no encontraron cambios en las fases del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis fue menor al 3% (Sánchez-Pérez et al., 2009; Gualtieri et al., 2011; Sánchez-Pérez et al., 2014), por lo que se ha sugerido que el daño al DNA podría ser el mecanismo por el cual el material particulado aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Sánchez-Pérez et al., 2009).

Cuando hay daño en el DNA se activa una serie de mecanismos para la detención ciclo celular, acción mediada por p53. La proteína p53 es un regulador transcripcional de p21^{Waf1/Cip1}, proteína clave en el detención del ciclo celular y además es efector de señales anti-proliferativas (Abbas and Dutta, 2009).

2.3 Ciclo celular y su regulación

Las células se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular y es una sucesión de crecimiento y divisiones celulares; su duración varía de un tipo celular a otro. La función del ciclo celular no es solamente originar nuevas células, sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. El ciclo celular se divide en dos fases: la interfase y la mitosis (figura 1).

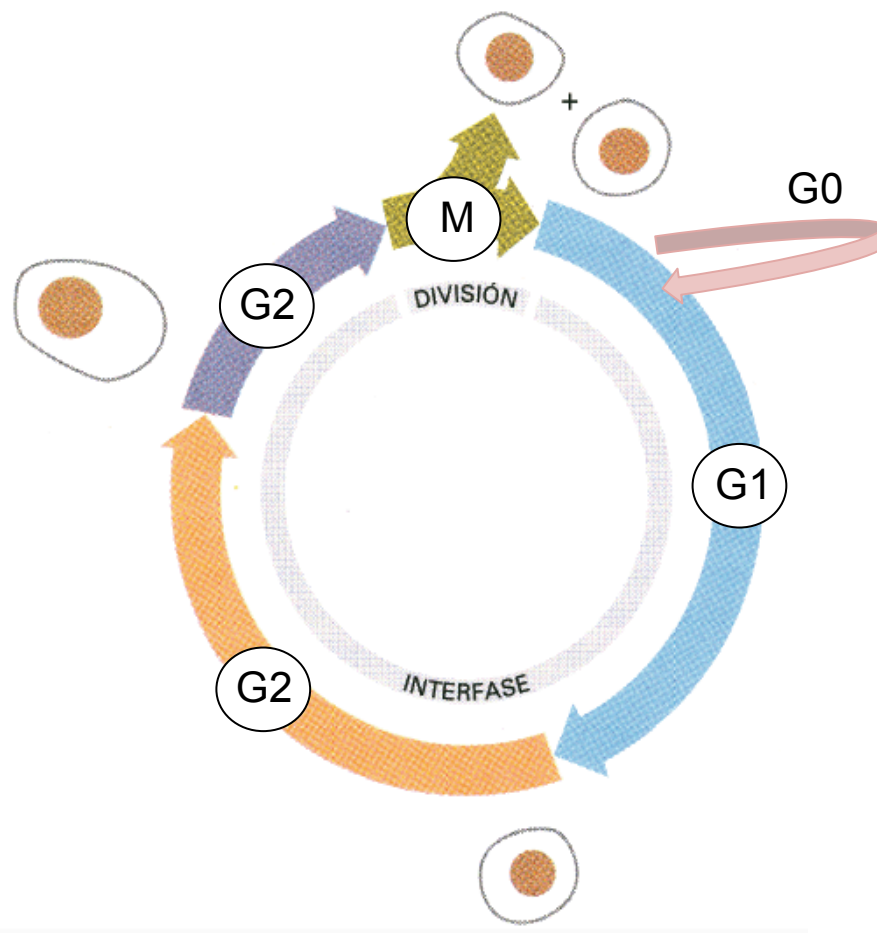


Figura 1. Las fases sucesivas del ciclo celular.

M: Mitosis; G1: preparación de la célula para la síntesis de DNA; S: fase de síntesis de DNA; G2: fase de preparación para la división celular; G0: fase de latencia.

Fuente: Modificado de Alberts et al., 2002.

Durante la interfase la célula crece y durante la fase de mitosis (M) se divide. La interfase se divide en tres fases: 1) G1 (Gap, intervalo 1): aumenta la actividad de las enzimas necesarias para la síntesis del DNA; 2) S: (síntesis) se lleva a cabo la replicación del DNA; 3) G2: es el tiempo que transcurre entre la fase S y el inicio de la mitosis. Cuando ya no se requieren más células, éstas entran en un estado denominado G0, en el cual abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de latencia, más no en reposo, ya que son metabólicamente activas y si reciben el estímulo adecuado abandonan el estado G0 y entran a G1 (Alberts et al., 2002).

La progresión del ciclo celular a través de las fases G1, S, G2 y M, está bajo el control de una familia de proteínas cinasas de residuos de serina/treonina. Estas cinasas son heterodímeros que consisten de una subunidad catalítica es decir, la cinasa dependiente de ciclina (CDK, por su siglas en inglés) y la ciclina que es la subunidad reguladora. Las CDKs se activan cuando forman complejos con las ciclinas. Las CDK 1, 2, 4 y 6 y las ciclinas A, B, D y E son identificados como los principales reguladores del ciclo celular (Bretones et al., 2015).

La proteína p21^{Waf1/Cip1}, es un inhibidor de CDKs, promoviendo la detención del ciclo celular en respuesta a un estímulo y su función es efector de múltiples señales anti-proliferativas (Abbas and Dutta, 2009). Cuando existe daño en el DNA el ciclo celular se detiene y esta respuesta es mediada por la acción de p53. p53 es un un modulator transcripcional y entre los genes que activa se encuentra el de p21^{Waf1/cip1}.

Se conoce que el papel principal de p21^{Waf1/cip1} es bloquear la proliferación a través de prevenir la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) y la transcripción de proteínas pro-proliferativas que regulan el ciclo celular (Abbas and Dutta, 2009). La proteína p21^{Waf1/cip1} se une a los complejos de ciclina-CDK2 y 4 no permitiendo su función como cinasas. En turno, estas cinasas no pueden fosforilar a Rb, por lo que permanece unida a E2F bloqueando su función ya que E2F es un factor de transcripción responsable de proliferación. La actividad de p21^{Waf1/cip1} directamente guía a la detención del ciclo celular y la pérdida de p21^{Waf1/cip1} podría promover la actividad de E2F llevando al aumento de la síntesis de DNA (Arthur and Heber-Katz, 2011).

Uno de los motores que lleva a la transformación celular, es la pérdida del control del ciclo celular. Si bien, la función de p21^{Waf1/cip1} es la detención del ciclo celular cuando hay daño en el DNA, existen evidencias que demuestran que esta proteína también puede tener un papel importante en favorecer la proliferación celular, siendo su localización subcelular la que determina esta función (Denicourt and Dowdy, 2004; Xia et al., 2004; Dutto, et al., 2015).

La localización subcelular de p21^{Waf1/cip1} puede ser influenciada por modificaciones post-traduccionales principalmente determinadas por fosforilaciones que podrían prevenir que p21^{Waf1/cip1} ingrese al núcleo e interaccione con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, por su siglas en inglés) y los complejos CDK/ciclinas resultando en la inhibición de la detención del ciclo celular (Piccolo and Crispi, 2012). A p21^{Waf1/cip1} se le ha relacionado con la promoción de carcinogénesis y progresión tumoral (Roninson, 2002) y se ha observado que la expresión citoplasmática de esta proteína es un marcador de pobre pronóstico en carcinomas, como el cáncer de mama (Xia et al., 2004; Abukhdeir and Park, 2008).

2.4 PM₁₀ y su efecto en el ciclo celular

Se ha reportado que células A549 expuestas a PM₁₀, inducen la respuesta ante daño al DNA sin cambios en las diferentes fases del ciclo celular y con niveles de apoptosis menor al 0.1% (Sánchez-Pérez et al., 2009). Se consideró que p21^{Waf1/Cip1} podría estar involucrada en esta respuesta, ya que se ha reportado que la localización subcelular de p21^{Waf1/Cip1} determina su función a través de la fosforilación en los residuos de treonina 145 (Thr145) y en serina 146 (Ser146), lo cual induce su estabilización en citoplasma y tiene una consecuencia funcional ya que previene la detención del ciclo celular (Zhou et al., 2001; Héliez et al., 2003).

Recientemente se reportó que las PM₁₀ inducen la estabilización de p21^{Waf1/Cip1}, principalmente en el citoplasma, en células A549. Además, p21^{Waf1/Cip1} se encontró fosforilada en Thr145 y Ser146, sugiriendo que esta alteración inducida por las PM₁₀ evita la traslocación a núcleo previniendo la detención del ciclo celular, lo cual podría

favorecer un proceso proliferativo (Sánchez-Pérez et al., 2014). Sin embargo no se conoce el mecanismo por el que $p21^{Waf1/Cip1}$ es inducida por PM_{10} . Se sabe que el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3 por sus siglas en inglés) es una proteína que participa en la regulación del ciclo celular, y se ha reportado que la expresión y actividad de $p21^{Waf1/Cip1}$ es regulada a través de STAT3 (Hawthorne et al., 2009; Dutto et al., 2015), por lo que es importante evaluar su participación en la regulación de $p21^{Waf1/Cip1}$.

2.5 Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3)

El transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) pertenece a la familia de las proteínas STAT que consiste de 7 miembros, los cuales son codificados por distintos genes: STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B y 6. Las proteínas STAT no solamente transmiten señales de la superficie celular al núcleo, sino también participan en la regulación génica como factores de transcripción (Bowman et al., 2000; Yu et al., 2009).

El análisis de fenotipos de ratones que carecen de uno o más genes de STAT, ha mostrado fenotipos relativamente discretos, sin embargo, con STAT3 no es así. La actividad de STAT3 es detectada durante el desarrollo del ratón, sugiriendo que juega un papel importante durante la embriogénesis temprana. De hecho una deficiencia de STAT3 causa letalidad embrionaria en modelo murino (Akira, 1999; Bromberg, 2001). Por otra parte, STAT3 puede ser activada por una amplia variedad de citocinas y factores de crecimiento, lo que implica que podría ser más inducida en comparación con los demás miembros de su familia, lo que lleva a sugerir que STAT3 es una proteína primordial (Levy and Lee, 2002).

La estructura de la proteína STAT3 (figura 2) consiste de diversos dominios (Darnell, 1997; Benekli et al., 2003; Qi and Yang, 2014).

a) *Dominio N-terminal* (ND) que contiene el NH_2 terminal (125 aminoácidos) y que media la interacción dímero-dímero, que lleva a la translocación nuclear y

conduce a la unión con el DNA. Este dominio está involucrado en el reconocimiento del receptor.

b) *Dominio hélice súper enrollada* (coiled coil, DCC), aminoácidos del 135 al 315; es esencial para el reclutamiento de STAT3 estimulada por factores de crecimiento y citocinas, para formación del dímero, y para la traslocación nuclear y unión al DNA. Provee una superficie extensiva para interactuar con otras proteínas.

c) *Dominio de unión al DNA* (DBD), aminoácidos del 320 al 480; reconoce miembros de la familia GAS (secuencia activada por interferón gamma (IFN γ)).

d) *Dominio enlazador* (linker), aminoácidos del 480 a 575; asegura la apropiada estructura del motivo de unión al DNA.

e) *Dominio Src homólogo 2* (SH2D), aminoácidos del 575 al 680; motivo altamente conservado. Es un sitio de acoplamiento que promueve la dimerización.

f) *Dominio de activación transcripcional* (TAD) en C-terminal, aminoácidos del 688 al 770. Contiene los sitios de fosforilación necesarios para su activación, los cuales controlan su activación a través del sitio tirosina 705 (Tyr705 ó Y705), así como su unión al DNA en serina 727 (Ser727 ó S727).

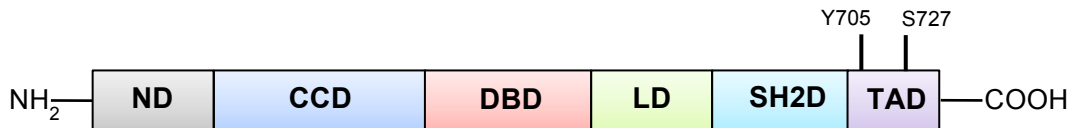


Figura 2. Estructura y dominios funcionales de STAT3.

ND, dominio N terminal; CCD, dominio súper hélice enrollada; DBD, dominio de unión al DNA; LD, dominio enlazador; SH2D, dominio Src homólogo 2; TAD, dominio de activación transcripcional.

La función de STAT3 ha sido extensamente estudiada en cultivos celulares y se ha encontrado que tiene distintas respuestas en diferentes células, en las que se incluye la estimulación de la proliferación, activación de la diferenciación, el mantenimiento de la pluripotencialidad en células madre embrionarias e inducción de

la respuesta en fase aguda. Debido al hallazgo de que STAT3 está involucrada en estas funciones tan distintas, se ha sugerido que STAT3 es el principal transductor de señales en comparación con los otros miembros de la familia STAT (Levy and Lee, 2002).

STAT3 es una proteína de respuesta en fase aguda, lo cual induce un proceso inflamatorio (Duan and Simpson-Haidaris, 2006). La inflamación es un foco de atención debido a su relación en la iniciación de tumores y la progresión maligna, provocada por la generación del microambiente óptimo para la iniciación de un proceso cancerígeno (Yu et al., 2009). Se ha observado que la activación constitutiva de STAT3 conduce a la desregulación de genes relacionados con el ciclo celular y apoptosis, y de genes que promueven la invasión, metástasis, angiogénesis, así como la evasión del sistema inmune y todos estos cambios moleculares contribuyen a la oncogénesis (Al Zaid Siddiquee and Turkson, 2008).

STAT3 es un factor de transcripción latente en citoplasma que puede ser activado inicialmente por receptores y no receptores con actividad de cinasas de tirosina. Citocinas como IL-6 y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (EGFR y PDGF, respectivamente) pueden inducir la activación de STAT3 (Bromberg, 2001; O'Shea et al., 2002), así como por la generación de ROS (Duan and Simpson-Haidaris, 2006; Cao, et. al., 2007).

2.6 Mecanismo de activación de STAT3

La vía de señalización de STAT3 (figura 3) implica la actividad tirosina cinasa de: (a) receptores de citocinas que reclutan miembros de Janus cinasa (JAK) y que actúan como intermediarios en la fosforilación de STAT3, (b) receptores de factores de crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que puede fosforilar a STAT3 o inducirla a través de la activación de cinasas intermediarias de las familias Src y JAK, y (c) tirosina cinasas no receptores como

Src y Abl que se localizan en el citoplasma y fosforilan a STAT3 (Bowman et al., 2000).

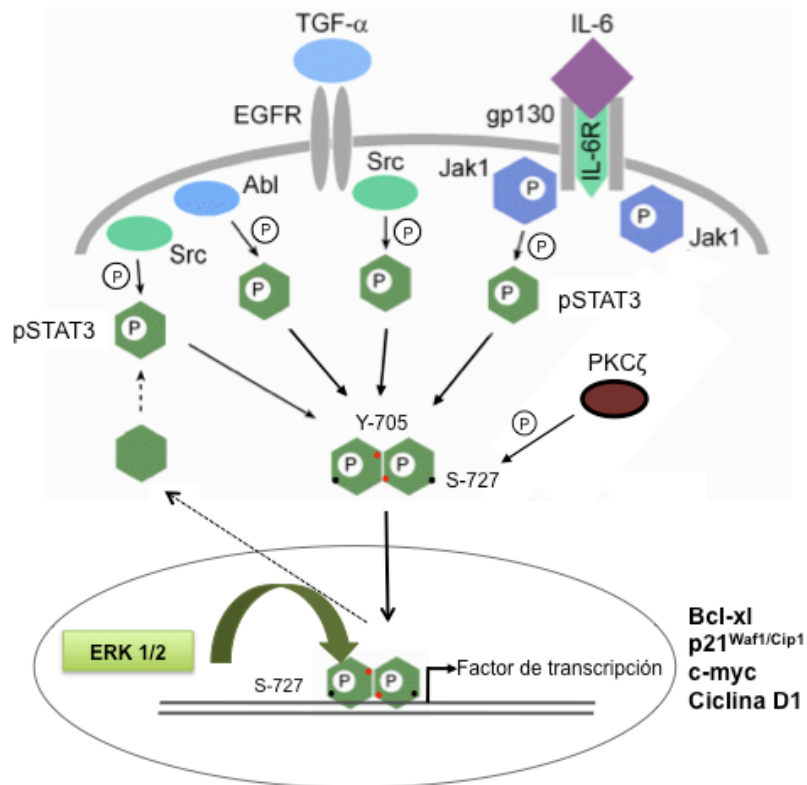


Figura 3. Mecanismo de activación del factor de transcripción STAT3.

TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa; EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; IL-6: Interleucina-6; gp130: Glicoproteína 130; Abl: Cinasa de tirosina Abelson; Src: Cinasa de tirosina Src; Jak1: Cinasa de tirosina Janus1; PKC ζ : Proteína cinasa C isoforma zeta; pSTAT3: fosfo-STAT3; ERK1/2: Cinasa1/2 de serina regulada por señales extracelulares; Y-705: fosforilación de tirosina 705 de STAT3; S727: fosforilación de serina 727 de STAT3; Bcl-xl: proteína de linfoma de células B (proteína anti-apoptótica); p21^{Waf1/Cip1}: proteína 21; c-myc: proteína relacionada con la mielocitomatosis en aves; Ciclina D1: ciclina D tipo1.

Fuente: Modificado de Eferl, 2016.

El mecanismo de activación de STAT3 sucede por la fosforilación en el residuo de tirosina 705 (Y705), lo que permite formar un dímero el cual trasloca a núcleo. Para alcanzar su actividad transcripcional, se requiere la fosforilación en serina 727 (S727) mediante la Thr/Ser cinasa ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinases) (Chung et al., 1997; Bowman et al., 2000; Aggarwal et al., 2009). Sin embargo, se ha reportado que la proteína cinasa C en su isoforma zeta (PKC ζ), también tiene la capacidad de fosforilar a STAT3 en S727 en citoplasma, con la subsecuente disociación de PKC ζ , para ingresar de forma activa al núcleo (Mattagajasingh et al., 2012, Butler et al., 2013). Se ha reportado que la fosforilación en S727 está relacionada con su actividad transcripcional, ya que la mutación de STAT3 en S727 por el residuo alanina, redujo la actividad del factor de transcripción de manera importante (Decker and Kovarik, 2000). Por otra parte, se ha observado que en la hepatocarcinogenesis inducida químicamente en modelo murino, la fosforilación en S727 es importante para la traslocación y acumulación nuclear de STAT3, evento relacionado con la sobrevivencia celular (Miyakoshi et al., 2014).

Una vez en el núcleo, STAT3 se une a los elementos de respuesta del DNA específico para STAT3, denominado originalmente como elemento GAS (secuencia activada por interferón gamma, por sus siglas en inglés) en el promotor de genes blancos y así activar el proceso transcripcional (Levy and Darnell, 2002; Timofeeva et al., 2012). STAT3 es factor de transcripción de diversos genes relacionados con el ciclo celular como cMyc, ciclina D1 (Bowman et al., 2000) y p21^{Waf1/Cip1} (Roninson, 2002; Hawthorne et al., 2009). En el caso particular de p21^{Waf1/Cip1}, el factor de transcripción STAT3 interactúa con el promotor de p21^{Waf1/Cip1} en el elemento sis-inducible (SIE, por siglas en inglés) (Bellido et al., 1998; Hawthorne et al., 2009).

Se ha reportado que la fosforilación persistente de STAT3, es decir su activación, incrementa la proliferación, angiogénesis y metástasis (Levy and Darnell, 2002; Yu et al., 2009) y su inhibición reduce sobrevivencia, invasión y crecimiento tumoral (Butler et al., 2013). En cáncer de próstata, se ha observado que la abrogación de la función de STAT3 a través de diversas estrategias conduce a la apoptosis o inhibición de la proliferación celular, lo que sugiere que STAT3 puede

jugar un papel crítico en la sobrevivencia celular (Mora et al., 2002). Por otra parte, se ha reportado que STAT3 se requiere para el desarrollo de novo de los tumores de piel y es esencial para el mantenimiento de la proliferación y sobrevivencia de las células tumorales de piel (Chan et al., 2004). La activación constitutiva de STAT3 representa un evento temprano en la carcinogénesis de cabeza y cuello y la señalización de STAT3 mediado por EGFR es una vía crítica para la progresión tumoral y la desregulación apoptótica (Grandis et al., 2000). El factor STAT3 ha emergido como un blanco crucial en la terapia del cáncer, ya que se ha observado que el bloqueo de STAT3 puede aumentar el efecto antitumoral, por lo que sus inhibidores se encuentran en desarrollo (Bromberg, 2001; Yu et al., 2009; Yu et al., 2014).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Existe información limitada referente a STAT3 y contaminación atmosférica, específicamente con material particulado. No obstante, se ha reportado que en células de epitelio bronquial humano (BEAS-2B) expuestas a PM_{2.5} provenientes del valle de Cache en Utah, mostraron ser ligeramente citotóxicas y sobrerregularon diversos genes asociados con una respuesta inflamatoria, así como el incremento en la activación de STAT3 (Watterson et al., 2007). Por otra parte, en células epiteliales de vías respiratorias humanas (HAEC) expuestas a DEPs, se determinó que se induce al factor STAT3 a través de las cinasas EGFR y Src como un mecanismo asociado a inflamación y mediado por estrés oxidante (Cao et al., 2007).

STAT3 es una proteína marcadora de sobrevivencia celular (Butler et al., 2013) y su mecanismo de activación es clave en la regulación de genes relacionados con el ciclo celular como p21^{Waf1/Cip1} (Coqueret and Gascan, 2000; Roninson, 2002; Hawthorne et al., 2009), proteína clave en la detención del ciclo celular en respuesta al daño en el DNA (Dutto et al., 2015).

Debido a que las PM₁₀ inducen daño en el DNA, sin inducir cambios en las fases del ciclo celular (Sánchez-Pérez et al., 2009), así como sobreexpresión y estabilización de p21^{Waf1/Cip1} reflejándose en bajos niveles de apoptosis de 3% (Sánchez-Pérez et al., 2014), resulta importante evaluar si el mecanismo inducido por la exposición con las PM₁₀ se lleva a cabo a través de la vía de activación del factor STAT3 impactando a nivel del ciclo celular, apoptosis y sobrevivencia en células epiteliales de pulmón A549.

Por lo anterior surge la siguiente pregunta de investigación:

¿STAT3 participará en la regulación de los niveles de p21^{Waf1/Cip1}, del ciclo celular y apoptosis en células A549 expuestas a PM₁₀?

4 HIPÓTESIS

Las células epiteliales de pulmón A549 expuestas a PM₁₀, inducirán la activación de STAT3, mediado por las cinasas de tirosina y serina/treonina, mecanismo que regulará los niveles y la estabilización de la proteína p21^{Waf1/Cip1} y promoverá alteraciones en la progresión del ciclo celular y sobrevivencia.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar si la exposición de PM₁₀ en células epiteliales de pulmón, regula los niveles de p21^{Waf1/Cip1} e induce la detención del ciclo celular y evasión de apoptosis a través de la activación de STAT3.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de células epiteliales de pulmón A549 expuestas a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/cm² de PM₁₀.
- Determinar la fosforilación en los residuos Y705 y S727 del factor de transcripción STAT3 en células A549 expuestas a diferentes tiempos de exposición con PM₁₀.
- Evaluar la participación del factor de transcripción STAT3 en el ciclo celular y en la apoptosis en células A549 expuestas a PM₁₀.
- Determinar el efecto de las PM₁₀ en el patrón de fosforilación de las proteínas implicadas en la regulación del factor STAT3 en células A549.
- Estudiar la participación y la interacción entre las proteínas implicadas en la fosforilación del factor STAT3 en células A549 expuestas a PM₁₀.
- Evaluar si la vía de activación de STAT3 regula a p21^{Waf1/Cip1} y su localización subcelular en células expuestas a PM₁₀.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Muestreo de PM₁₀

Es importante resaltar, que en este proyecto se utilizaron PM₁₀ previamente colectadas y caracterizadas para HAPs (Salcido-Neyoy et al., 2015), metales y endotoxina (Chirino et al., 2015), de una zona urbana con uso de suelo principalmente residencial, con influencia de tránsito vehicular, localizada en la zona sur de la Ciudad de México. Las PM₁₀ fueron colectadas en filtros de nitrocelulosa de tamaño de poro de 3 µm, con un muestreador de grandes volúmenes (figura 4), a un flujo de 1.13 m³/min (GMW model 1200 VFC HVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA).



Figura 4. Muestreador de grandes volúmenes que se utilizó para colectar PM₁₀.

Una vez que fueron colectadas las PM₁₀, los filtros se mantuvieron en un desecador a 4°C y en la oscuridad antes de remover las partículas de los filtros. Como se ha descrito previamente (Sánchez-Pérez et al., 2009; Alfaro-Moreno, et al., 2009; Chirino et al., 2015), el proceso de remoción consistió en separar primero las

partículas a través del cepillado del filtro de manera delicada. Las partículas sueltas se recuperaron con un bisturí y se colocaron en viales de vidrio libre de endotoxinas, mantenidos en la oscuridad a 4°C, hasta su uso.

6.2 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular A549, derivada de células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano, obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Este modelo de estudio, ha sido ampliamente usado para evaluar diversos efectos tóxicos de contaminantes ambientales (Foster et al., 1998; Alessandria et al., 2014).

Las células se cultivaron en botellas para cultivo celular de 75 cm² (Corning, 430641) con medio F12 Kaighn's (Gibco, 21127-022) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco, 16000-044) y mantenidas a 37°C con una atmósfera de CO₂ de 5%. Los experimentos de exposición con PM₁₀ se realizaron con una confluencia celular de 80% y con medio de cultivo libre de suero, para evitar que la albúmina contenida en el suero actúe como un quelante de metales y enmascare el efecto real de las PM₁₀ que contienen metales (Sánchez-Pérez et al., 2009).

6.3 Ensayo de viabilidad

Para evaluar si las PM₁₀ ejercieron un efecto tóxico sobre las células A549, se determinó la viabilidad celular por la técnica de Cristal Violeta (Hycel, 292) cuyo nombre químico es hexametil-p-rosanilina. Es un método sensible y esta técnica se ha descrito en células en cultivo distribuidas en monocapa y fijadas en la placa (Kueng et al., 1989). Posterior a la fijación de las células y considerando que las células adheridas a la placa son células vivas, éstas se tiñen con la solución de cristal violeta. El exceso del colorante es lavado y el cristal violeta que fue absorbido por las células, es extraído con ácido acético al 33% para evaluar la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Existe una relación lineal

entre la densidad óptica del CV de los extractos nucleares y el número de células (Kueng et al., 1989).

Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 1×10^4 células/pozo en placas de 96 pozos (Costar, 3599) y después de alcanzar el 80% de confluencia celular, se evaluó el efecto de las concentraciones 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} durante 24 h de exposición sobre la adherencia celular a la superficie de la placa. Transcurrido el tiempo las células fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM y KH_2PO_4 1.5 mM, pH 7.4) y fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS por 24 h a 4°C. Se agregaron 100 μl de cristal violeta al 0.1% en cada pozo y la placa se mantuvo durante 10 min en agitación suave a temperatura ambiente. Después, la placa se lavó 3 veces por inmersión en agua desionizada y la placa se secó. Posteriormente se agregaron 50 μl de ácido acético al 33% durante 10 min en agitación suave para solubilizar el colorante. La placa fue leída en el lector de placas (Tecan GENios Plus) a 570 nm. El resultado de la viabilidad celular se calculó comparando la absorbancia de las células expuestas con PM_{10} contra su respectivo control de células no tratadas (Ct) y son expresados en porcentaje.

6.4 Diseño experimental para la exposición de A549 con PM_{10}

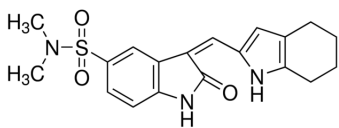
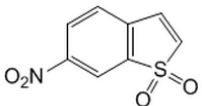
Para determinar la respuesta celular a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , se realizó una evaluación de la fosforilación de STAT3 y las cinasas implicadas en su activación. La evaluación se llevó a cabo a diferentes tiempos de exposición con las PM_{10} y fueron los siguientes: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h. Para ello, se sembraron células A549 (7.5×10^5 células/pozo) en placas de 6 pozos (Costar, 3516) y después de alcanzar el 80% de confluencia se procedió a la exposición con PM_{10} .

Para evaluar la vía de STAT3 en la inducción de $\text{p}21^{\text{Waf1/Cip1}}$, los cultivos celulares fueron preincubados con inhibidores farmacológicos (tabla 2). Es importante destacar que la exposición de cultivos celulares con PM_{10} induce una respuesta rápida como consecuencia de los efectos inmediatos que tienen algunos

de los componentes de PM_{10} . Por esta razón, en este trabajo utilizamos inhibidores farmacológicos que causan una inhibición después de, al menos, 30 min de pretratamiento (Gayen et al., 2009; Spitzner et al., 2014b). La principal preocupación del diseño experimental del proyecto es que la utilización de cualquier silenciamiento molecular necesita al menos 24 h de incubación antes del experimento (Liu et al., 2009) lo que significaría que el cultivo celular podría tener un ciclo celular entero con un déficit en STAT3 y ello podría sobreestimar el efecto de las exposiciones de PM_{10} .

El pretratamiento de las células A549 con los inhibidores farmacológicos consistió en lo siguiente: los inhibidores SU6656 y el Stattic V fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO), de acuerdo a las especificaciones del fabricante y el inhibidor de PKC ζ (I-PKC ζ) se disolvió con PBS. Las soluciones de trabajo de cada inhibidor fueron (a) SU6656, 10 mM, (b) Stattic V, 10 mM y (c) I-PKC ζ , 100 μ M. Una vez que los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia celular, las células se lavaron con PBS y se agregó el inhibidor correspondiente en medio libre de suero (MLS) de acuerdo a la concentración y el tiempo indicado en la tabla 2. Cabe destacar que en el caso de SU6656 y de Stattic V que se disolvieron en el DMSO, la cantidad de este compuesto agregado al cultivo no rebasó el 0.01%, garantizando que el DMSO no afectó al cultivo celular. Transcurrido el tiempo del pretratamiento, se agregó el contenido de partículas a una concentración de 10 μ g/cm². Después del tiempo de exposición con las PM_{10} , los cultivos se lavaron 3 veces con PBS para eliminar cualquier residuo del tratamiento.

Tabla 2. Inhibidores farmacológicos utilizados para evaluar la inducción de p21^{Waf1/Cip1} a través de la vía de STAT3.

Inhibidor (Marca, No. de catálogo)	Nombre del compuesto	Mecanismo de inhibición	Concentración utilizada
SU6656 (Sigma Aldrich, S9692)	2-oxo-3-(4,5,6,7- tetrahydro-1H-indol-2- ylmethylene)-2,3- dihydro-1H-indole-5- sulfonic acid dimethylamide	Inhibidor competitivo por el sitio de unión al ATP de la proteína blanco.	10 µM (30 min de pretratamiento)
			
Stattic V (Calbiochem, 573099)	6- Nitrobenzo[b]thiophene- 1,1-dioxide	Inhibidor que no permite la unión con el dominio SH2 de STAT3 y previene su asociación con otras proteínas rio abajo.	40 µM (1 h de pretratamiento)
			
Inhibidor de PKCζ (Santa Cruz Biotechnology, sc-3098)	Secuencia de la molécula inhibitoria: H-Ser-Ile-Tyr-Arg-Arg- Gly-Ala-Arg-Arg-Trp- Arg-Lys-Leu-OH	La molécula inhibe el sitio catalítico de PKCζ, evitando su activación.	0.5 µM (30 min de pretratamiento)

6.5 Lisis celular y extracción de proteína total

Transcurrido el tiempo de los tratamientos, se llevó a cabo la lisis celular para obtener la proteína total que se utilizó en las técnicas de Western blot y de

inmunoprecipitación de proteínas. Las células A549 fueron lavadas 3 veces con PBS y la lisis celular se realizó a través de un buffer de lisis que contiene Tris 20 mM pH 8.0, detergente no iónico IGEPAL al 1% y cloruro de sodio 150 mM, suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Roche Applied Science, #11697498001) y fosfatasas (PhosStop, Roche Applied Science, #04906845001). Se agregaron 80 μ l del buffer de lisis a cada pozo durante 10 min, 4°C y en agitación suave. Posteriormente la suspensión se recuperó en microtubos de 1.5 ml (Axygen, 22363204) y se centrifugaron a 13,000 rpm, 4°C por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y la concentración de proteína se cuantificó con la técnica del ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés) (Smith et al. 1985).

La cuantificación de proteínas por BCA combina dos aspectos: (1) la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) al ión cuproso (Cu^{1+}) por las proteínas en un medio alcalino y (2) la detección colorimétrica del Cu^{1+} por el ácido bicinconínico. La primera etapa es la quelación del cobre con la proteína en un medio alcalino para formar un complejo azul. En esta reacción las proteínas forman un complejo coloreado con los iones de cobre. En la segunda etapa en la que se desarrolla el color, el BCA reacciona con el Cu^{1+} (formado en la primera etapa) y genera un producto color púrpura intenso que resulta de la quelación de dos moléculas de BCA con una de Cu^{1+} . El color producido en esta reacción es estable, el complejo BCA- Cu^{1+} es soluble en agua y proporciona una absorbancia lineal a 570 nm conforme se va aumentando la concentración de proteína (Smith et al. 1985). Para este proyecto se utilizó una curva de albúmina sérica bovina de 1.25-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y las muestras fueron leídas en un lector de placas (Tecan GENios Plus).

6.6 Determinación de STAT3, EGFR, ERK1/2, PKC ζ y p21^{Waf1/Cip1} por Western blot

A través de la técnica del Western blot (WB) se caracterizó la vía de fosforilación de STAT3 y su relación con p21^{Waf1/Cip1} en células A549 expuestas a diferentes tiempos con PM₁₀. El ensayo se realizó de acuerdo con el método descrito

por Towbin et al., (1979). La técnica del WB permite la identificación de proteínas específicas en una muestra dada después de su separación por electroforesis, utilizando un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico que se conoce como SDS-PAGE (acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Después las proteínas son transferidas del gel a un soporte sólido como una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF). Después la membrana es bloqueada para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. La membrana que contiene las proteínas inmovilizadas es incubada con los anticuerpos específicos. El inmunocomplejo es identificado por reacciones de quimioluminiscencia.

Se utilizaron 30 µg de proteína total y se le adicionó buffer de muestra 2x (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, 161-0737) y β-mercaptoetanol en una proporción 1:20. Una vez preparadas las muestras se calentaron a 90°C por 10 min. Posteriormente se colocó la muestra en el gel al 12% de poliacrilamida y se dejó correr en una cámara de electroforesis (mini-Protean, Bio-Rad) con buffer de corrida (Bio-Rad, 161-0772) que contiene Tris-Base 25 mM, glicina 250 mM y SDS al 0.1% a 150 voltios por 90 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare, 10600023) utilizando un buffer de transferencia formado por Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) a 12 Volts por 1.5 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se sumergió en una solución de leche comercial en polvo baja en grasa al 5% (Svelty) disuelta en buffer TBS-Tween 20 (TBS-T) al 0.1 % durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave, esto con el fin de bloquear sitios inespecíficos de unión de la membrana. Una vez bloqueada, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para cada proteína problema a 4°C durante toda la noche en agitación suave. En la tabla 3 se listan los anticuerpos utilizados, la dilución así como la marca de cada uno de ellos. Transcurrido el tiempo, la membrana se lava 3 veces durante 10 min con TBS-T.

Para detectar al anticuerpo primario la membrana se incubó con el anticuerpo secundario que está conjugado a una peroxidasa (tabla 3) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Se utilizó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. La inmunoreacción se visualizó con el kit de detección del sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Millipore, WBKLS0100) y se capturó la imagen con el equipo Gel Logic 1500 Imaging System. Las bandas se cuantificaron por densitometría con el programa Kodak Molecular Imaging, Standard Edition, versión 5.0.1.30.

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en el Western blot.

Anticuerpo	Marca (número de catálogo)	Dilución
<i>Anticuerpos primarios</i>		
anti-pSrc-Y418	Invitrogen (44660G)	1:1000
anti-Src	Invitrogen (44656G)	1:1000
anti-pPKCζ-T410	Cell Signaling (9378)	1:1000
anti-PKCζ	Cell Signaling (9368)	1:1000
anti-pSTAT3-Y705	Cell Signaling (4113)	1:1000
anti-pSTAT3-S727	Cell Signaling (9134)	1:1000
anti-STAT3	Santa Cruz Biotechnology (sc-483)	1:1000
anti-pEGFR-Y845	Enzo Life Sciences (BML-SA344)	1:500
anti-EGFR	Cell Signaling (2232)	1:1000
anti-p21 ^{Waf1/Cip1}	Millipore (05-345)	1:1000
anti-pERK1/2-T202	Millipore (05-797)	1:1000
anti-ERK	Millipore (06-182)	1:1000
anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology (32233)	1:3000
<i>Anticuerpos secundarios</i>		
Anti-ratón conjugado con peroxidasa	Amersham (NA931V)	1:5000
Anti-conejo conjugado con peroxidasa	Amersham (NA934V)	1:5000

Los anticuerpos fueron diluidos en una solución de leche comercial en polvo baja en grasa al 5% (Svelty) disuelta en buffer TBS-Tween 20 (TBS-T) al 0.1 %.

6.7 Evaluación de la interacción entre cinasa y su proteína blanco por inmunoprecipitación de proteínas

La inmunoprecipitación es un método que permite la purificación de una proteína o complejo de proteínas. Las proteínas son físicamente aisladas de una muestra biológica y así determinar las interacciones proteína-proteína. En este ensayo un anticuerpo dirigido a la proteína (antígeno) de interés se incubó con el extracto celular que permite al anticuerpo unirse a la proteína en solución. El complejo anticuerpo-proteína se precipita utilizando perlas de agarosa acopladas a proteína A/G, el cual permite aislar físicamente la proteína de interés del resto de la muestra. Posteriormente la muestra puede separarse por SDS-PAGE y analizarse por Western blot.

Se utilizó 1 mg de proteína de lisados celulares no tratados y los expuestos a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de las PM_{10} . Para eliminar los componentes potencialmente reactivos y reducir las uniones no específicas a las de perlas agarosa, los lisados se incubaron con Preclearing Matrix A-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 4°C en rotación constante y suave. Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y se trabajó con el sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante de cada muestra se incubó con el anticuerpo de la proteína de interés a una dilución 1:100, es decir con anti-Src y anti-PKC ζ y se agregaron 20 μl de perlas de agarosa acopladas a proteína A/G (Protein A/GPlus-Agarose bead, Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4°C en rotación constante y suave. En el ensayo se utilizó un anticuerpo inespecífico como blanco Normal Goat IgG Control (R&D systems, #Cat. AB-108C). Transcurrido el tiempo, el inmunocomplejo se colectó por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y se lavó 3 veces con buffer de lisis bajo las mismas condiciones de centrifugación. Después del último lavado, se eliminó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 20 μl de buffer de carga 2x. Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y se llevó a cabo el Western blot. Una vez obtenidas las membranas, éstas se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación suave con anticuerpos anti-pSTAT3-Y705 (Cell Signaling, 4113) y

anti-pSTAT3-S727 (Cell Signaling, 9134). El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa fue anti-conejo (Amersham, NA934V) y la inmunoreacción se visualizó como quedó descrito en el ensayo de Western blot.

6.8 Evaluación del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo

Para evaluar las diferentes fases del ciclo celular y apoptosis se utilizó la técnica de citometría de flujo que es un método automatizado, multiparamétrico y cuantitativo. El principio en el que se basa esta técnica es el siguiente: células en suspensión pasan a una velocidad constante de manera alineada, de una en una por la fuente de excitación (laser) y la información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Barrera et al., 2004).

Para llevar a cabo los ensayos de ciclo celular y apoptosis, se sembraron células A549 (7.5×10^5 células/pozo) en placas de 6 pozos y una vez que se alcanzó el 80% de confluencia celular se expusieron con PM₁₀ por 24 h. Para evaluar la participación de STAT3 en estos procesos, se inhibió el factor STAT3 utilizando el inhibidor Stattic V (40 μ M, pretratamiento por 1 h).

Ciclo celular. Las diferentes fases del ciclo celular se evaluaron por la tinción del DNA con yoduro de propidio (IP), molécula que se intercala entre el DNA. EL IP es un agente fluorescente cuya energía máxima de excitación es de 535 nm con una emisión de 617 nm.

Transcurrido el tiempo del tratamiento, se obtuvo la suspensión celular a través de la disociación mecánica utilizando PBS-EDTA 1 mM, pH 8. Las células se colectaron por centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. El botón celular se lavó 2 veces con PBS bajo las mismas condiciones de centrifugación. Después las células fueron fijadas con etanol al 70% durante 18 h a -20°C. Transcurrido el tiempo, las células se

lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. Se adicionó RNasa (Sigma, T-9253; 5.5 µg/ml) libre de DNasa durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células se incubaron con 80 µl de yoduro de propidio (IP, 150 µg/ml), por 15 min a 4°C y protegidas de la luz. Finalmente las fases del ciclo celular fueron analizadas con la lectura de 20,000 células (eventos) con el citómetro BD FACS Canto II, marca Becton Dickinson a través del programa de adquisición FACSDiva, versión 6.1.3. El análisis de los datos del ciclo celular se realizó con el programa ModFit LT, versión 2.0.

Apoptosis. Durante el proceso de apoptosis ocurren cambios a nivel de la membrana celular. Una de las alteraciones es la translocación de fosfatidilserina (FS), que se encuentra en la cara interna de la membrana, hacia la cara externa de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} con alta afinidad por la FS por lo que puede utilizarse como una sonda sensible para detectar células apoptóticas. Los niveles de apoptosis fueron evaluados con el kit de tinción de Anexina-V-fluoresceína y yoduro de propidio (Roche Diagnostics). La anexina V está acoplada a la fluoresceína, fluorocromo cuya energía máxima de excitación es de 488 nm con una emisión de 518 nm.

Posterior al tratamiento de las células A549 con PM_{10} y Stattic V (40 µM, 1 hora de pretratamiento), las células fueron colectadas a través de la disociación mecánica utilizando PBS-EDTA 1 mM, pH 8. Las células se colectaron por centrifugación a 1200 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS bajo las mismas condiciones de centrifugación. El botón celular fue resuspendido en 100 µl de la solución de tinción que contiene 2 µl de Anexina V y 2 µl de yoduro de propidio durante 15 min a temperatura ambiente. La suspensión celular se evaluó con el citómetro BD FACS Canto II, Becton Dickinson, con la lectura de 20,000 eventos a través del programa de adquisición y análisis FACSDiva, versión 6.1.3.

6.9 Localización subcelular de p21^{Waf1/Cip1} por inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que se basa en el reconocimiento de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas (Hernández-Ramírez y Cabiedes, 2010). En esta técnica es necesario promover la formación de un complejo inmune incubando el tejido o cultivo celular bajo investigación con un anticuerpo primario. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo para revelar el inmunocomplejo. Los fluorocromos son colorantes que emiten luz a una longitud de onda específica cuando son estimulados con radiación ultravioleta (Rao et al., 2012). De los colorantes más usados se tiene a la fluoresceína cuyo color es verde. Los resultados del reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos, se evalúan en un microscopio de epifluorescencia.

Para evaluar la localización subcelular de p21^{Waf1/Cip1} se sembraron células A549 (2.2×10^4 células/pozo) en laminillas de 8 pozos (Lab-Tek Chamber Slide, Thermo Scientific # 177402). Una vez que se alcanzó el 80% de confluencia celular, las células se preincubaron con Stattic V (40 μ M, 1 h) antes de la exposición con PM₁₀ por 6 y 24 h, tiempos que representaron los incrementos significativos de p21^{Waf1/Cip1} después de la exposición con PM₁₀. Las células no expuestas con PM₁₀ se utilizaron como control. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS para posteriormente fijarse con paraformaldehído al 4% en PBS a 37°C durante 1 h. Transcurrido el tiempo las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en buffer TBS (TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). Para reducir la autofluorescencia, se utilizó borohidruro de sodio al 0.1% en TBS por 5 min a temperatura ambiente. En cada etapa, las células se lavaron con TBS por 5 min. Con el fin de bloquear sitios inespecíficos de unión, se utilizó suero de caballo al 10% (GIBCO, 16050) y albúmina sérica de bovino (Sigma, A9647) al 1% en TBS, por 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron con TBS por 5 min y se incubaron con el anticuerpo primario anti-p21^{Waf1/Cip1} (Millipore, 05-345) a 4°C toda la noche. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces por 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por su

siglas en inglés, Jackson Immuno Research, 115-095-146) durante 1 h a temperatura ambiente y cubiertas de la luz. Después de lavar las laminillas 3 veces durante 5 min, los cubreobjetos se montaron sobre las laminillas utilizando el compuesto 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés, Molecular Probes, 36935). El DAPI es un marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas de las bases adenina y timina del DNA, por lo que se utiliza para identificar el núcleo celular, tiñéndose de azul. Las imágenes fueron visualizadas y capturadas con el microscopio Axio Imager.D2 (Carl Zeiss).

6.10 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos representan las media \pm la desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Se aplicó el análisis de varianza con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con el Programa Prisma versión 5 (GraphPad Software, Inc). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

7 RESULTADOS

7.1 La viabilidad de las células A549 no fue afectada después de la exposición con PM₁₀

En la tabla 4 se muestra el resultado del ensayo de viabilidad evaluado a través del método del cristal violeta. Se observó que las células A549 expuestas a 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ durante 24 h no indujeron cambios en el porcentaje de células adherentes con respecto a las células que no fueron tratadas. A partir de este resultado se determinó utilizar la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ como una concentración intermedia en la cual la viabilidad no se ve afectada, como previamente se ha reportado (Sánchez-Pérez, et al., 2009; Chirino, et al., 2010, Ferecatu et al., 2010; Sánchez- Pérez, et al., 2014). Además, a esta concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se ha evaluado que no produce daño evidente, pero si es capaz de provocar una respuesta celular (Sánchez-Pérez, et al., 2009).

Tabla 4. Cuantificación de células epiteliales A549 expuestas a PM₁₀.

Ct	PM ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		
	5	10	20
100	102.9 \pm 5.54	102.8 \pm 5.94	103.7 \pm 5.07

PM₁₀: Partículas con diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$. Células control (Ct). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.

7.2 Las PM₁₀ inducen la fosforilación en Y705 y S727 de STAT3

Para investigar si los cambios inducidos por PM₁₀ estuvieron relacionados con los niveles de expresión proteica de STAT3, se evaluó a través de la técnica de Western blot el estado fosforilado de STAT3 en los residuos de tirosina 705 (pSTAT3-Y705) y serina 727 (pSTAT3-S27) en células A549 expuestas con 10 µg/cm² de PM₁₀ a diferentes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h.

La figura 5 muestra los resultados de la fosforilación de STAT3 en Y705. Se observó que durante la primera hora de exposición con las PM₁₀, se presentó un patrón de desfosforilación de pSTAT3-Y705. En la media hora se encontró el mayor decremento de los niveles pSTAT3-Y705 de 0.9 veces respecto al control (p<0.0001 vs Ct). A partir de la segunda hora este efecto se revirtió, ya que se encontró un incremento significativo de fosforilación de STAT3 en Y705 de 2.2 veces respecto a las células control (p<0.05 vs. Ct) que se mantuvo hasta las 24 h de exposición a PM₁₀ (p<0.05 vs. Ct).

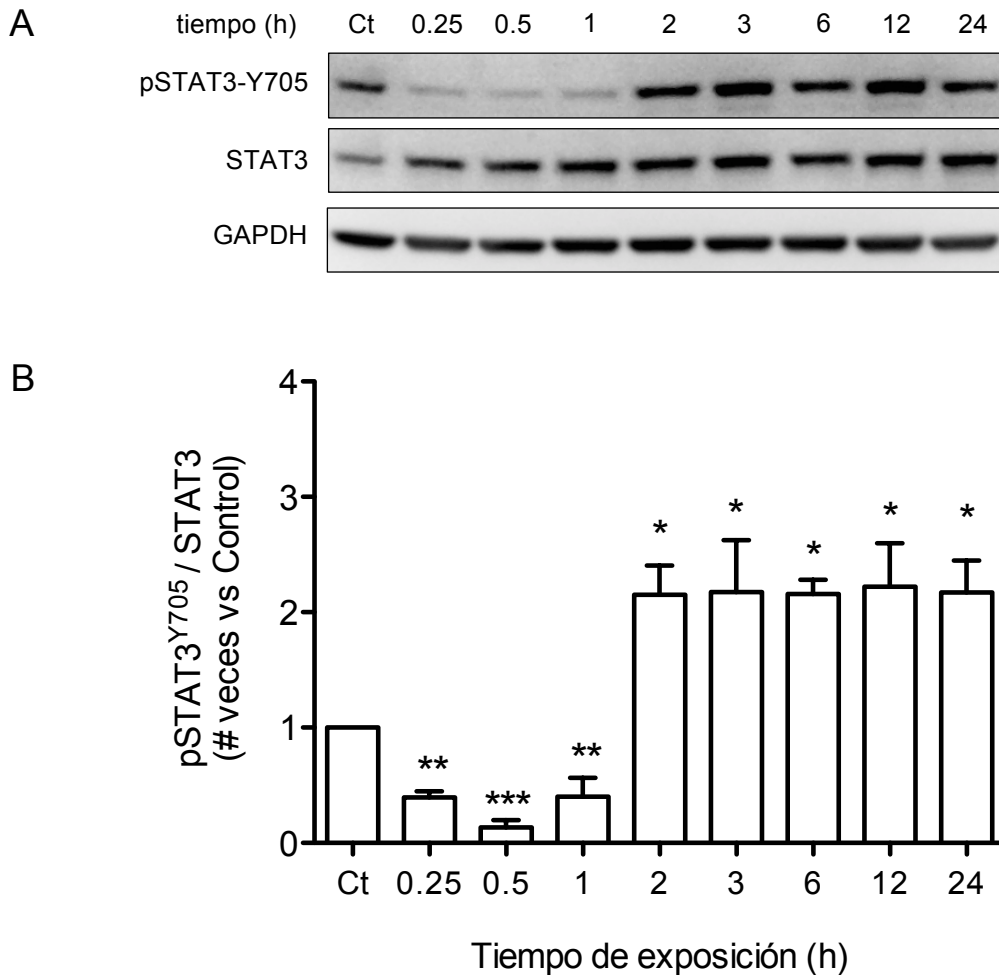


Figura 5. Evaluación de la fosforilación de STAT3 en el residuo Y705 inducido por las PM₁₀. Se expusieron células A549 con 10 µg/cm² de PM₁₀ a diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio ± DE de tres experimentos independientes (*p<0.05 vs. Ct, **p<0.001 vs. Ct, ***p<0.0001 vs. Ct).

Una vez que STAT3 es fosforilada en Y705, se forma el dímero que puede ingresar al núcleo y para funcionar como factor de transcripción, STAT3 debe de ser fosforilada en S727.

La figura 6 muestra los resultados de la fosforilación de pSTAT3-S727 y se encontró que durante las primeras 2 horas de exposición con las PM₁₀ se mantuvo en niveles basales. A partir de las 3 horas, la fosforilación en S727 se incrementó gradualmente de 2 veces ($p < 0.05$ vs. Ct) hasta 2.3 veces a las 24 h ($p < 0.001$ vs. Ct).

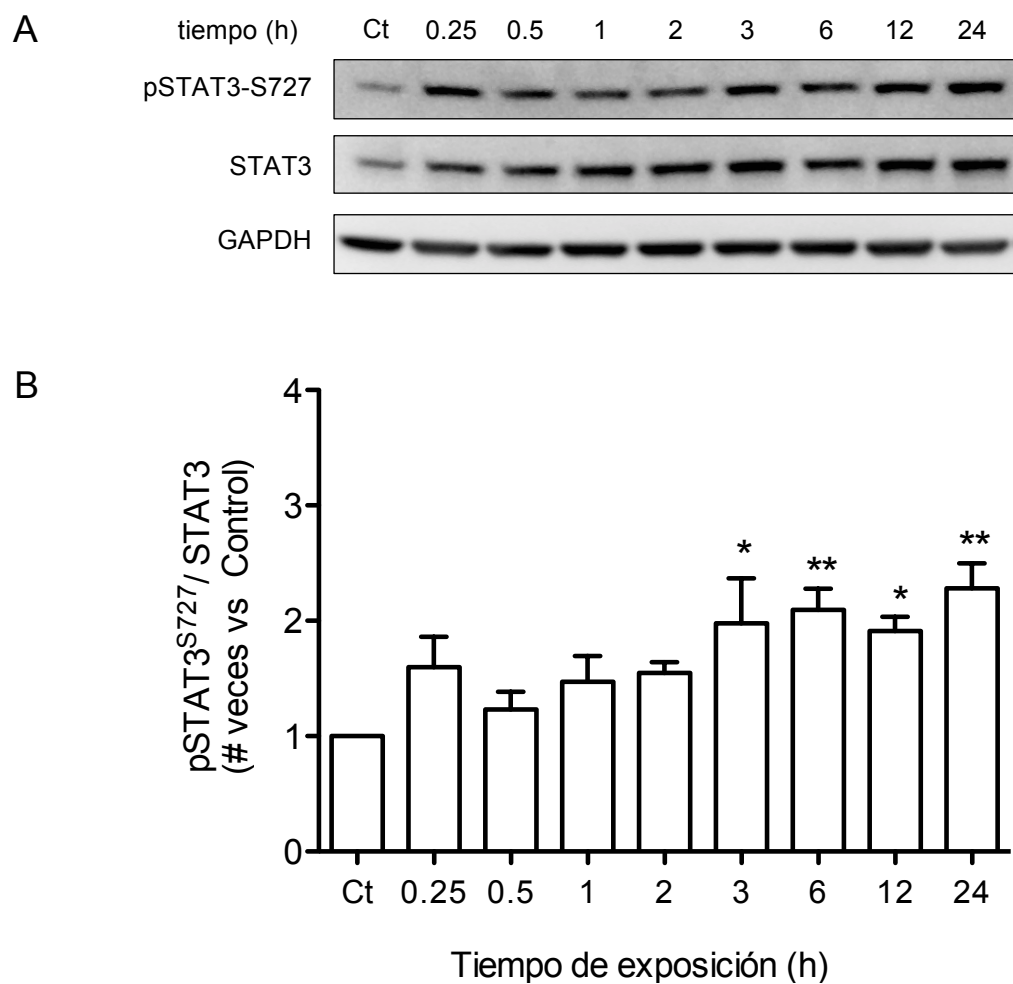


Figura 6. Evaluación del estado de fosforilación de STAT3 en el residuo S727 inducido por las PM₁₀. Las células A549 se expusieron con 10 µg/cm² de PM₁₀ a diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio ± DE de tres experimentos independientes (*p<0.05 vs. Ct, **p<0.001 vs. Ct).

7.3 El receptor de EGF no es inducido por las PM₁₀

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína transmembranal con actividad de tirosina-cinasa y se sabe que es uno de los activadores de pSTAT3 en Y705 (Bowman et al., 2000). Se evaluó la fosforilación de EGFR en Y845 en presencia de 10 µg/cm² of PM₁₀ a diferentes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h. En la figura 7 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de pEGFR-Y845, y como se puede observar no fueron significativamente diferentes de las células no expuestas a PM₁₀.

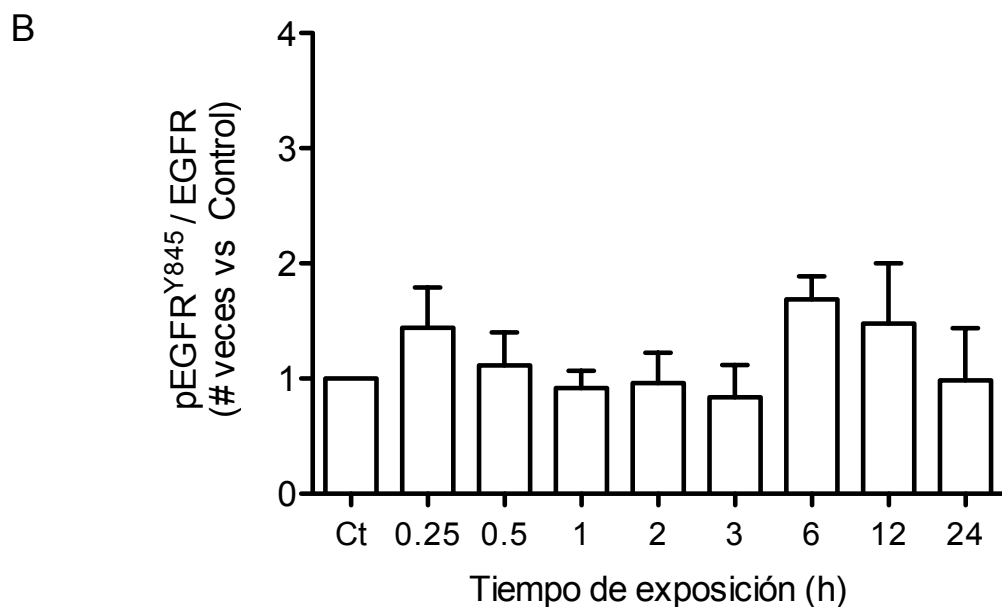
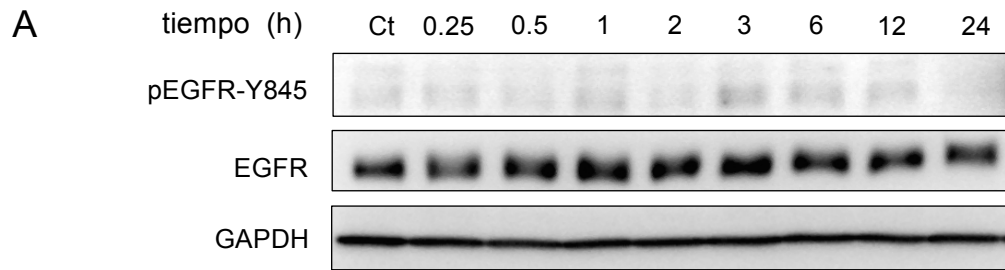


Figura 7. Evaluación de la fosforilación de EGFR en el residuo Y845. Células A549 fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} en diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes.

7.4 La cinasa Src es inducida por las PM₁₀ y participa en la fosforilación de STAT3 en el residuo Y705

Debido a que las PM₁₀ no indujeron la fosforilación de EGFR, se evaluó a Src ya que se ha reportado que Src es una de las cinasas que participa en la fosforilación de STAT3 en Y705 (Schreiner, et al., 2002).

Se evaluaron los niveles de Src fosforilada en el residuo Y418 en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ a diferentes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h.

En la figura 8 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de pSrc-Y418, y se puede observar que la fosforilación de Src cinasa se presentó desde los 15 minutos de exposición con PM₁₀ con un incremento de 2 veces, en comparación con las células control (p<0.05 vs. Ct). El mayor incremento se registró a las 3 h (3.2 veces, p<0.0001 vs. PM₁₀). El estado de fosforilación de Src se mantuvo hasta las 24 h de exposición (p<0.0001 vs. Ct).

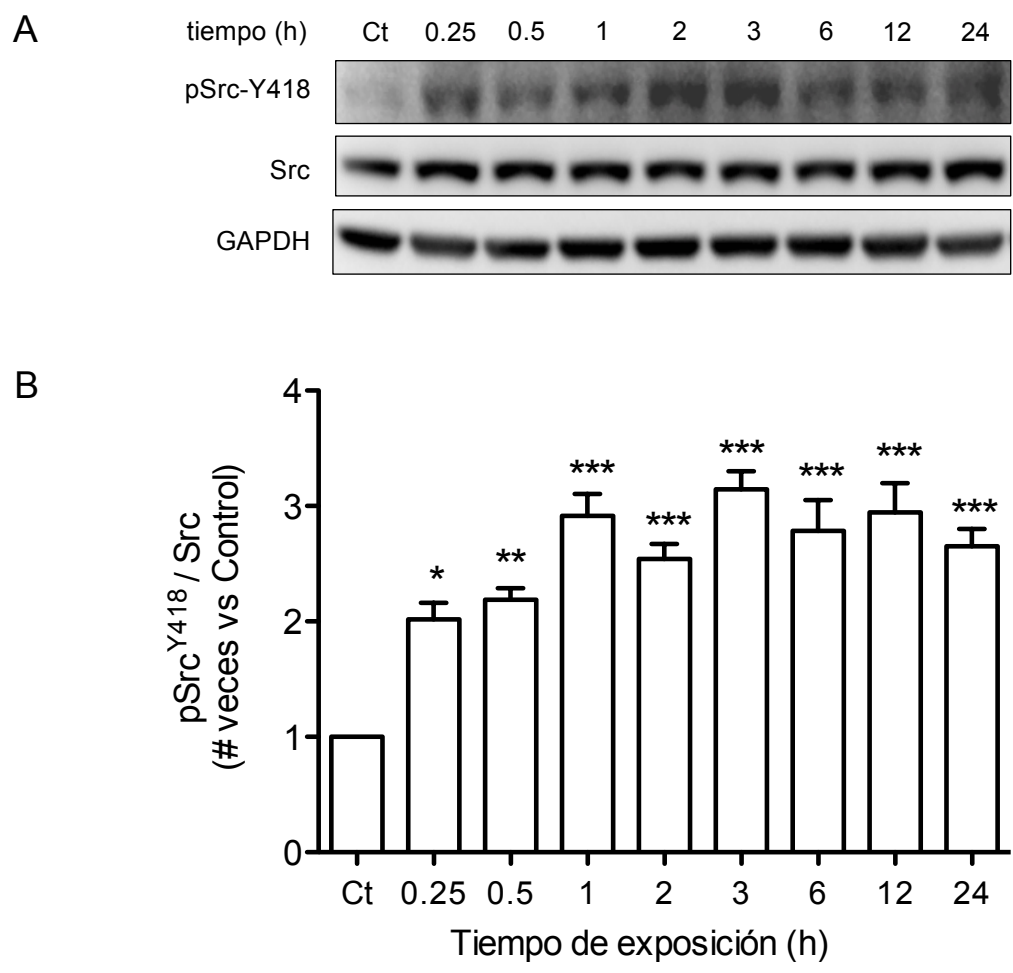


Figura 8. Evaluación de la fosforilación de Src en el residuo Y418. Células A549 fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} en diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs. Ct, ** $p < 0.001$ vs. Ct, *** $p < 0.0001$ vs. Ct).

Se evaluó si la cinasa Src está relacionada con la fosforilación de pSTAT3-Y705, por lo que los cultivos celulares se preincubaron por 30 min con el inhibidor de Src (SU6656, 10 μ M) antes de la exposición de 2 h con las PM₁₀. Se seleccionó ese tiempo porque la fosforilación de STAT3 en Y705 se presentó a partir de las 2 h de exposición con las PM₁₀ (ver figura 5), de esta manera se evaluó el efecto de la inhibición de la activación de Src donde comienza la activación de STAT3. En la figura 9 se muestran los resultados de la inhibición de la fosforilación de Src cinasa, la cual previno la fosforilación de STAT3-Y705 inducida por la exposición de las PM₁₀ ($p < 0.0001$ vs. PM₁₀).

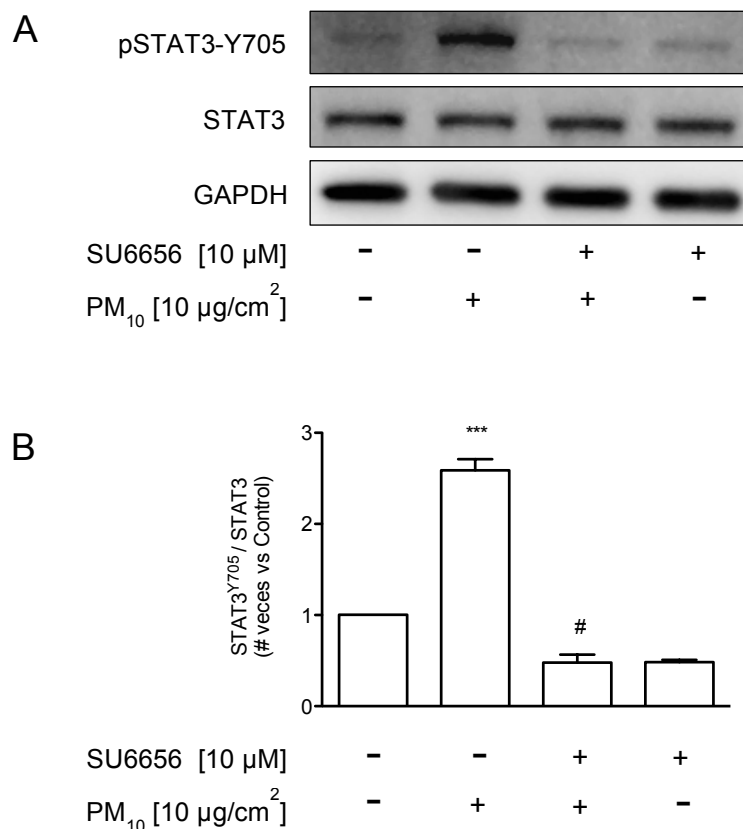


Figura 9. Efecto de la inhibición de Src cinasa en la fosforilación de STAT3 en el residuo Y705. Las células A549 fueron preincubadas por 30 min con 10 μM del inhibidor para Src (SU6656), previo a la exposición de 2 h con PM₁₀. Western blot representativo de los niveles de pSTAT3-Y705 (A) y su análisis densitométrico (B), expresado como el número de veces respecto al control (Ct, sin tratamiento) o a las PM₁₀. Los datos son presentados como el promedio ± DE de tres experimentos independientes (***) $p < 0.0001$ vs. Ct, # $p < 0.0001$ vs. PM₁₀).

Para confirmar la relación de la Src cinasa con la fosforilación de STAT3-Y705, se realizó una inmunoprecipitación de proteínas, para evaluar la interacción entre Src y STAT3-Y705. Este ensayo se llevó a cabo con 2 h de exposición con PM₁₀. La figura 10 muestra los resultados de la interacción entre estas proteínas, lo que sugiere fuertemente que Src está implicada en la fosforilación del residuo Y705 de STAT3.

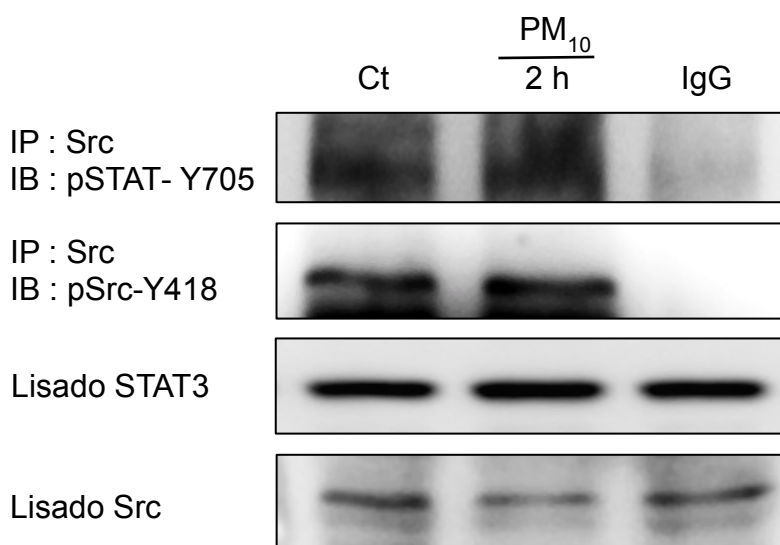


Figura 10. Evaluación de la relación entre la cinasa Src en la fosforilación de STAT3 en Y705 en células expuestas a PM₁₀. Para evaluar la interacción directa de Src con el factor STAT3 a nivel de tirosina, las células A549 se expusieron con 10 µg/cm² de PM₁₀ durante 2 h y posteriormente se realizó la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico para Src y del de STAT3-Y705 para el inmunoblot. Western blot representativo de tres experimentos independientes. IP: Inmunoprecipitación; IB: Inmunoblot.

7.5 Las PM₁₀ inducen a ERK1/2 y PKCζ, pero PKCζ es la relacionada con la fosforilación de STAT3 en S727

Para demostrar el mecanismo de fosforilación de pSTAT3 en S727 inducido por las PM₁₀, se evaluó la fosforilación de ERK1/2 en el residuo T202, ya que se sabe, es la Thr/Ser cinasa que convencionalmente fosforila a pSTAT3-S727 (Bowman et al., 2000, Aggarwal et al., 2009).

Se evaluó la fosforilación de pERK1/2-T202 a diferentes tiempos de exposición (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h) con 10 µg/cm² de PM₁₀. En la figura 11 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de pERK1/2-T202. Después de los 15 minutos de exposición, las PM₁₀ indujeron un rápido incremento de 3.8 veces de pERK1/2-T202 (p<0.0001 vs Ct), el cual disminuyó a niveles basales después de 30 min de exposición con las PM₁₀ y se prolongó hasta las 6 h. A las 12 h de nuevo se observó un incremento de 2.2 veces respecto al control, que se sostuvo hasta las 24 de exposición (p<0.05 vs. Ct).

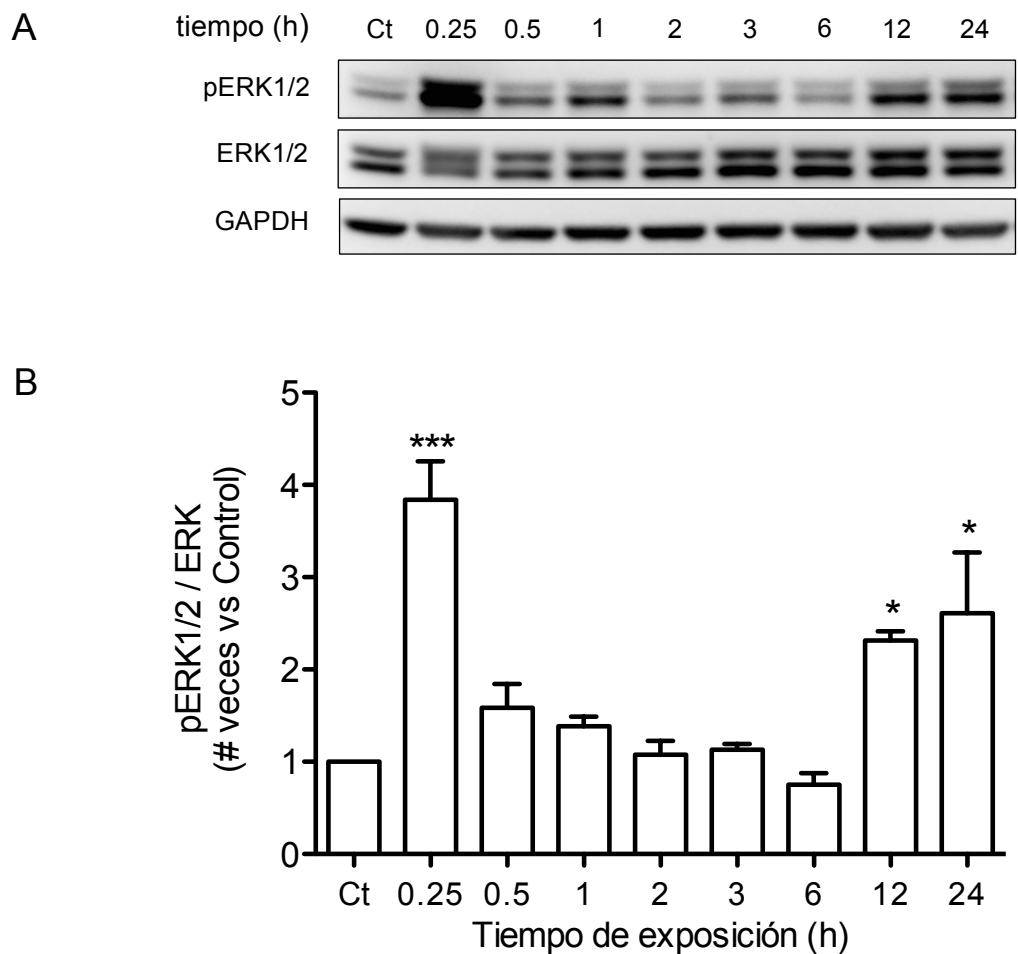


Figura 11. Evaluación de la fosforilación de ERK1/2 en el residuo T202. Células A549 fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} a diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs. Ct, *** $p < 0.0001$ vs. Ct).

De acuerdo con este resultado se consideró que la cinasa ERK1/2 no participó en la fosforilación de STAT3 en S727, debido a que la fosforilación de este residuo ocurrió a partir de las 3 h de exposición con PM₁₀ (ver figura 6). Por esta razón es que se evaluó PKCζ, que es una Thr/Ser cinasa que se ha reportado fosforila a STAT3 en S727 (Mattagajasingh et al., 2012).

Se evaluó si las PM₁₀ podrían inducir la fosforilación de PKCζ en el residuo de T410, por lo que se evaluó su fosforilación.

En la figura 12 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de pPKCζ-T410. Desde los 5 minutos de exposición, las PM₁₀ indujeron un rápido incremento de 3.3 veces de pPKCζ-T410 ($p < 0.05$ vs. Ct) que se mantuvo hasta las 24 h de exposición con PM₁₀ ($p < 0.05$ vs. Ct).

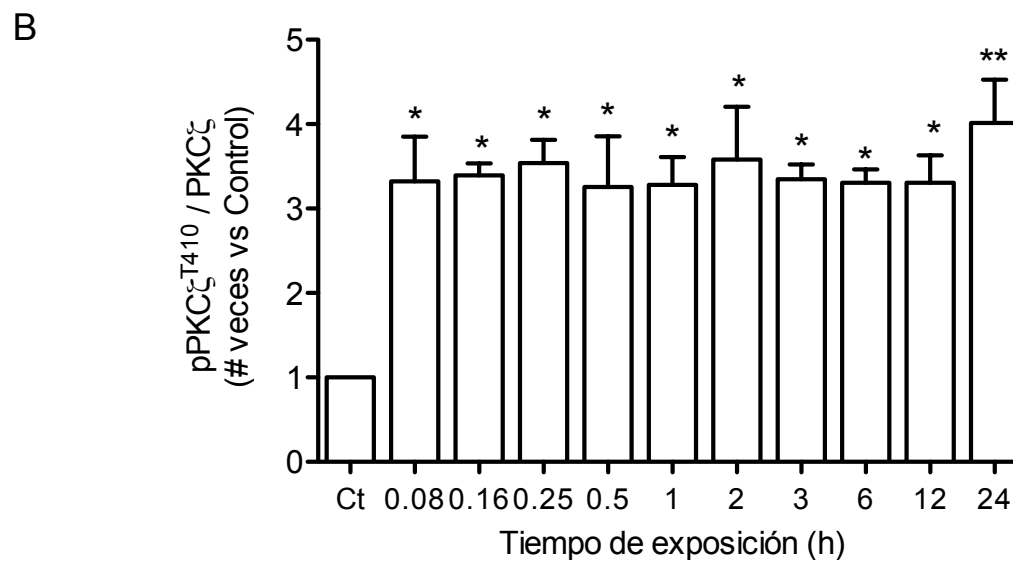
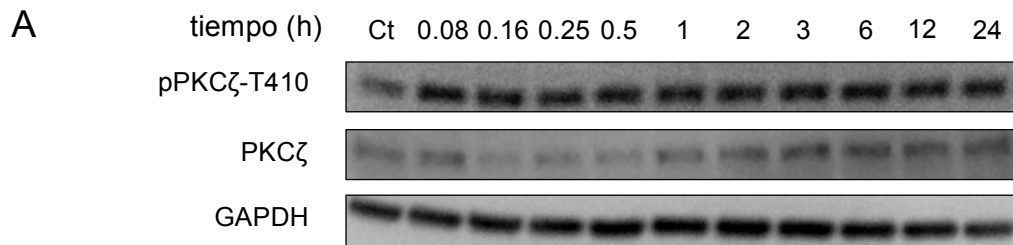


Figura 12. Evaluación de la fosforilación de PKC ζ en el residuo T410. Las células A549 fueron expuestas a $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} a diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs. Ct).

Una vez que se determinó que las PM₁₀ indujeron a pPKCζ-T410, se evaluó si esta cinasa estuvo implicada en la fosforilación de STAT3-S727. Para ello, se utilizó el inhibidor de PKCζ (I-PKCζ, 0.5 μM) que fue preincubado en los cultivos celulares durante 30 min, previo a la exposición de 3 horas con las PM₁₀. Se seleccionó este tiempo porque la fosforilación de STAT3-S727 se presentó en ese tiempo (ver figura 6).

En la figura 13 se muestran los resultados de la inhibición de la fosforilación de la cinasa PKCζ, la cual previno la fosforilación de STAT3-727 inducida por la exposición de las PM₁₀ (p<0.0001 vs. PM₁₀).

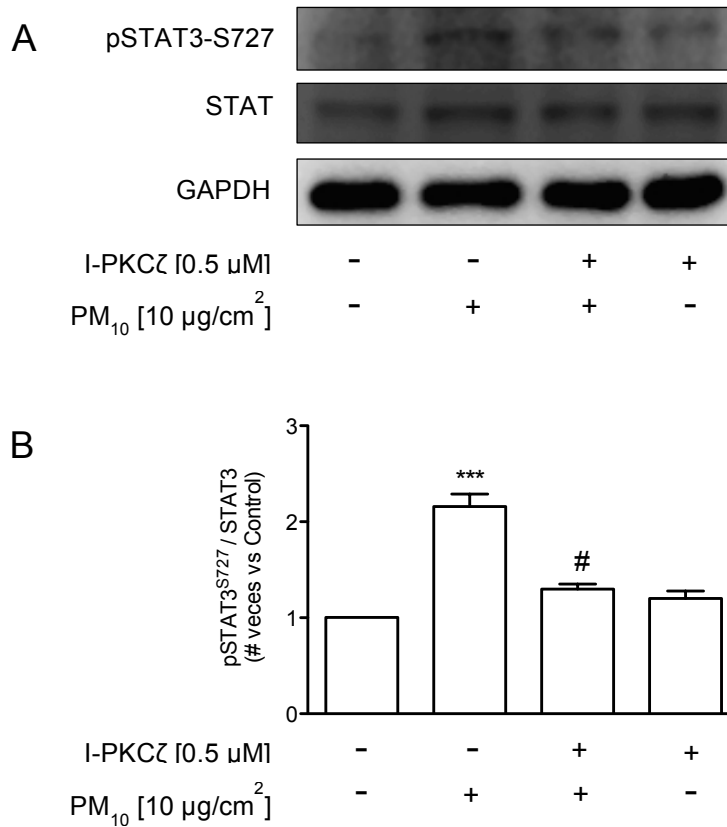


Figura 13. Efecto de la inhibición de PKCζ cinasa en la fosforilación de STAT3 en el residuo S727. Las células A549 fueron preincubadas por 30 min con 0.5 μM del inhibidor de PKCζ (I-PKCζ), previo a la exposición de 3 h con PM₁₀. Western blot representativo de los niveles de pSTAT3-S727 (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct, sin tratamiento) o las PM₁₀. Los datos son presentados como el promedio ± DE de tres experimentos independientes (**p<0.0001 vs. Ct, #p<0.0001 vs. PM₁₀).

La figura 14 muestra los resultados de la interacción entre la cinasa PKC ζ y pSTAT3-S727 mediante el ensayo de inmunoprecipitación, después de 3 h de exposición con las PM₁₀.

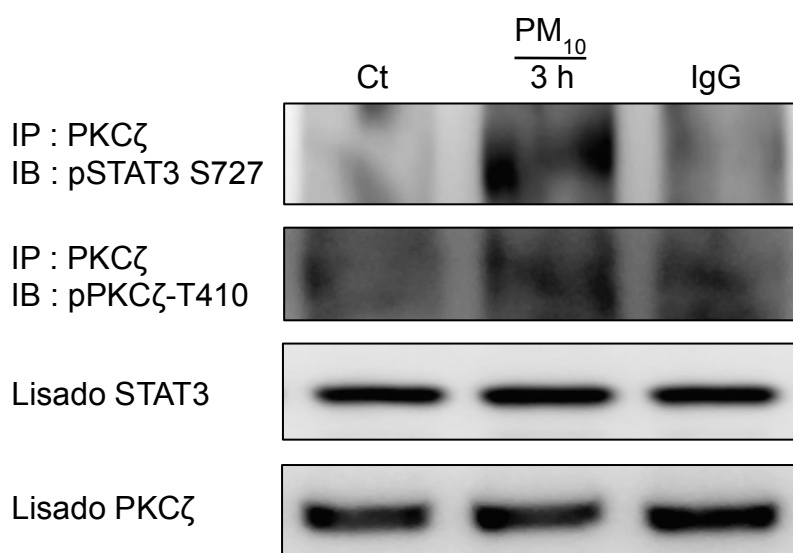


Figura 14. Evaluación de la relación entre la cinasa PKC ζ en la fosforilación de STAT3 en S727 en células expuestas a PM₁₀. Para evaluar la interacción directa de PKC ζ con el factor STAT3 a nivel de serina, las células A549 se expusieron con 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ durante 3 h y posteriormente se realizó la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico para PKC ζ y del de STAT3-S727 para el inmunoblot. Western blot representativo de tres experimentos independientes. IP: Inmunoprecipitación; IB: Inmunoblot.

7.6 Las PM₁₀ inducen un incremento de p21^{Waf1/Cip1} mediado por la fosforilación de STAT3 a través de las cinasas Src y PKC ζ

STAT3 es un factor de transcripción que participa en la regulación de proteínas relacionadas con el ciclo celular como p21^{Waf1/Cip1} (Hawthorne et al., 2009). Se determinó el nivel de la proteína p21^{Waf1/Cip1} con 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ en células A549 evaluado a diferentes tiempos de exposición de 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 h.

En la figura 15 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de p21^{Waf1/Cip1}, y como se puede observar, a las 6 h se presentó un incremento de 2 veces después de la exposición con PM₁₀, con respecto a las células control ($p < 0.05$ vs. Ct) y esta sobre regulación se mantuvo hasta las 24 h de exposición ($p < 0.001$ vs. Ct).

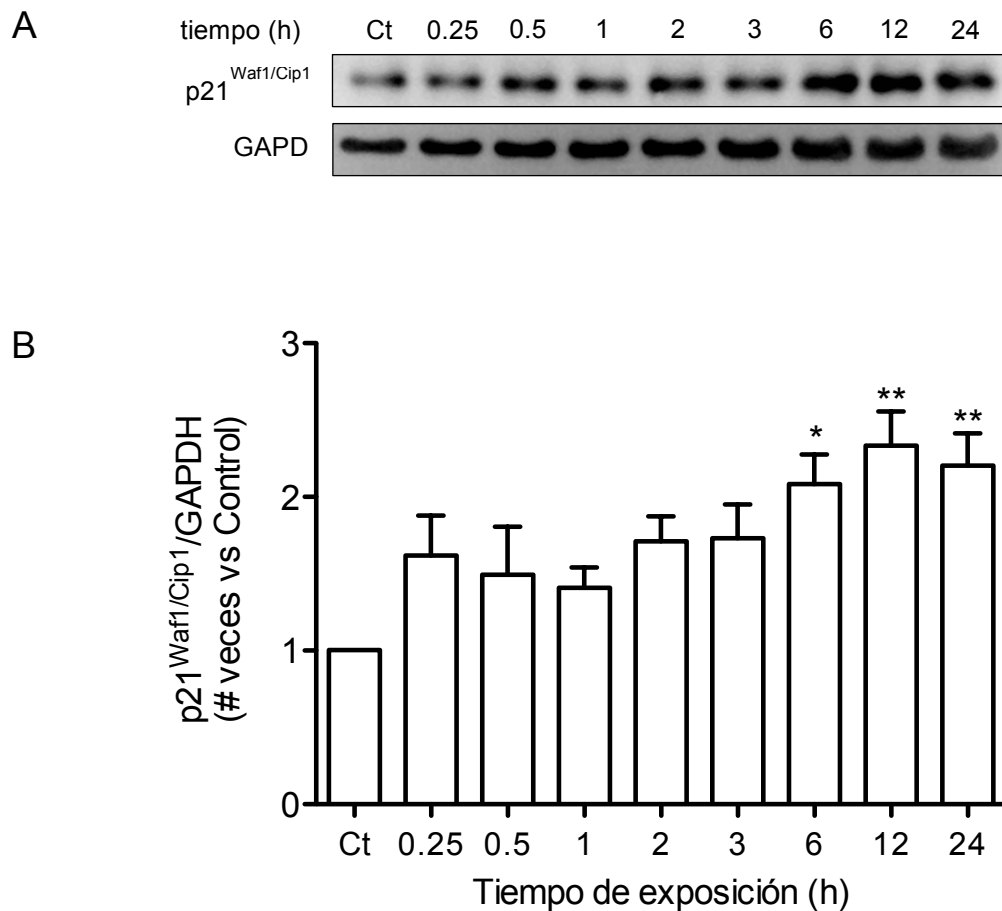


Figura 15. Evaluación de los niveles de p21^{Waf1/Cip1}. Células A549 fueron expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} a diferentes tiempos. Western blot representativo (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct). Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs. Ct, ** $p < 0.001$ vs. Ct).

Para determinar si los niveles de expresión de p21^{Waf1/Cip1} están relacionados con la fosforilación de STAT3, se utilizaron diferentes inhibidores, los cuales fueron preincubados en el cultivo celular de A549 previo a la exposición con 10 µg/cm² de PM₁₀ durante 24 horas.

Se evaluó si la inhibición de la fosforilación de STAT3 en Y705 inducida por PM₁₀ tuvo influencia sobre p21^{Waf1/Cip1}. Para ello se utilizó el inhibidor Stattic V. En la figura 16 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de p21^{Waf1/Cip1}, y como se puede observar, la inhibición de STAT3-Y705 previno la inducción de los niveles de p21^{Waf1/Cip1} (p<0.05 vs. PM₁₀).

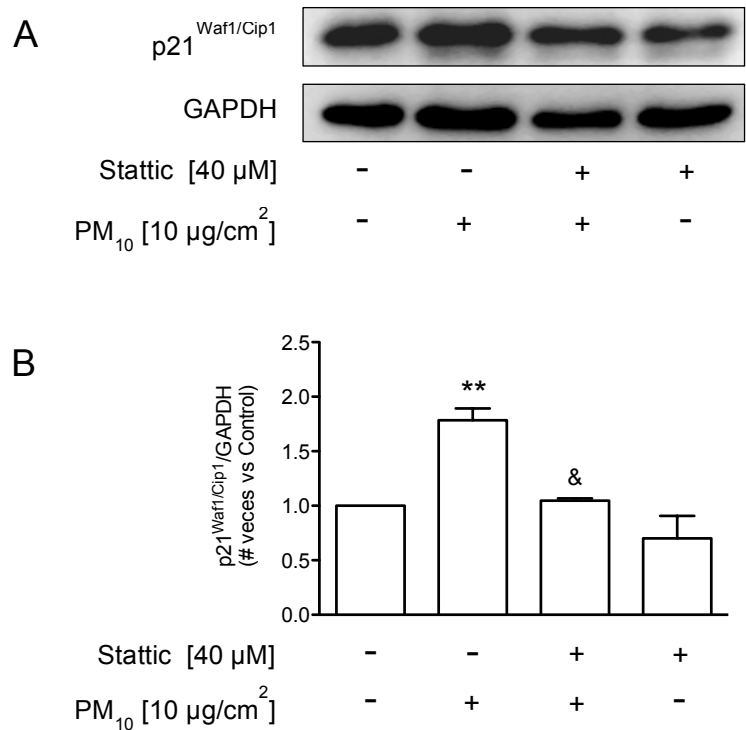


Figura 16. Efecto de la inhibición de la fosforilación de STA3-Y705 en los niveles de p21^{Waf1/Cip1}. Las células A549 fueron preincubadas por 1 h con 40 μM del inhibidor Stattic V (Stattic) previo a la exposición de 24 h con PM₁₀. Western blot representativo de los niveles de p21^{Waf1/Cip1} (A) y su análisis densitométrico (B) expresado como el número de veces respecto al control (Ct, sin tratamiento) o las PM₁₀. Los datos son presentados como el promedio ± DE de tres experimentos independientes (**p<0.001 vs. Ct, &p<0.05 vs. PM₁₀).

Para determinar si la fosforilación de pSrc-Y418, implicada en la fosforilación de STAT3-Y705, podría influir en los niveles de $p21^{Waf1/Cip1}$, se utilizó el inhibidor SU6656. En la figura 17 se muestran los resultados de la evaluación de los niveles de $p21^{Waf1/Cip1}$, y como se puede observar, la inhibición de la fosforilación de Src en Y418 previno la inducción de los niveles de $p21^{Waf1/Cip1}$ ($\&p < 0.05$ vs. PM_{10} , figura 17).

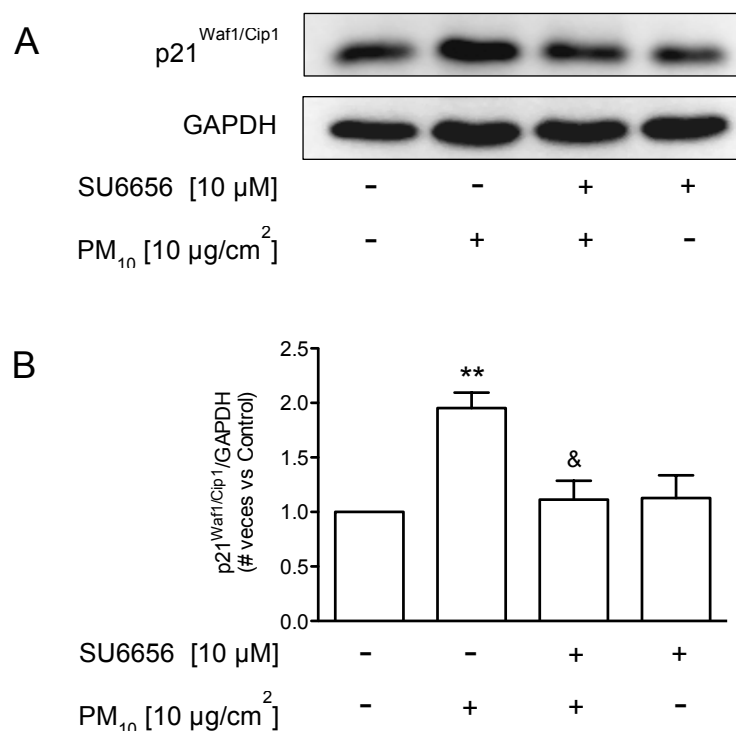


Figura 17. Efecto de la inhibición de la fosforilación de Src cinasa en los niveles de $p21^{Waf1/Cip1}$. Las células A549 fueron preincubadas por 30 min con 10 μ M del inhibidor SU6656 previo a la exposición de 24 h con PM_{10} . Western blot representativo de los niveles de $p21^{Waf1/Cip1}$ (A) y su análisis densitométrico (B), expresado como el número de veces respecto al control (Ct, sin tratamiento) o las PM_{10} . Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (** $p < 0.001$ vs. Ct, $\&p < 0.05$ vs. PM_{10}).

Además, el inhibidor de PKC ζ previno la actividad cinasa PKC ζ cinasa responsable de la fosforilación de STAT3-S727. La figura 18 muestra que los niveles de p21^{Waf1/Cip1} asociados con la expresión de PM₁₀, fueron prevenidos cuando la actividad de PKC ζ se inhibe (p<0.0001 vs. PM₁₀).

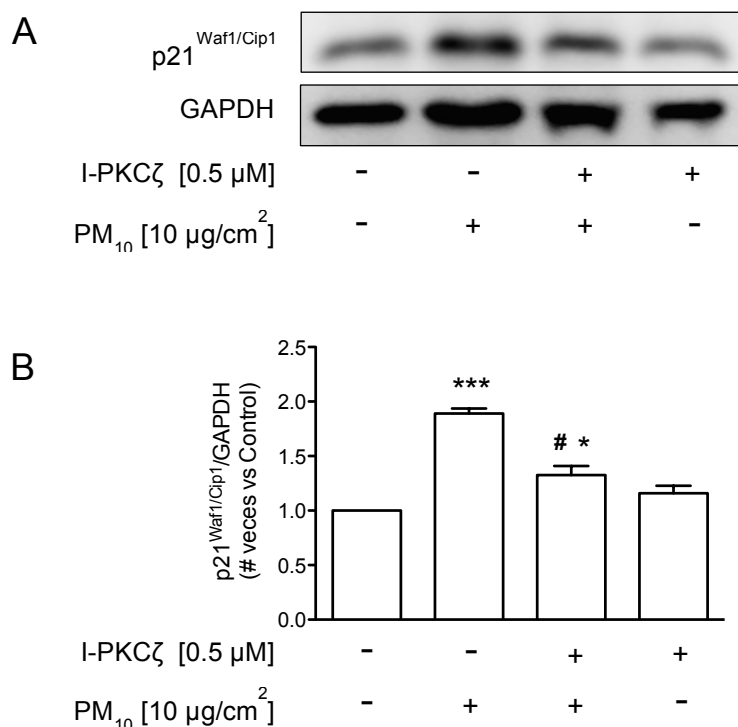


Figura 18. Efecto de la inhibición de la fosforilación de PKC ζ cinasa en los niveles de p21^{Waf1/Cip1}. Las células A549 fueron preincubadas por 30 min con 0.5 μ M del inhibidor de PKC ζ (I-PKC ζ) previo a la exposición de 24 h con PM₁₀. Western blot representativo de los niveles de p21^{Waf1/Cip1} (A) y su análisis densitométrico (B), expresado como el número de veces respecto al control (Ct, sin tratamiento) o las PM₁₀. Los datos son presentados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (***)p<0.0001 vs. Ct, #p<0.0001 vs. PM₁₀, *p<0.05 vs. Ct).

7.7 Las PM₁₀ inducen la estabilización en citoplasma de p21^{Waf1/Cip1} y este efecto es dependiente de STAT3

Debido a que se ha reportado que PM₁₀ inducen la estabilización de p21^{Waf1/Cip1}, principalmente en el citoplasma, se avalúo si el factor STAT3 está relacionado con su localización subcelular. En la figura 19 se muestran los resultados de la evaluación de la localización de p21^{Waf1/Cip1} en células A549 expuestas con PM₁₀ durante a) 6 h y b) 24 h. Se puede observar que en las células control de 6 h y 24 h, p21^{Waf1/Cip1} tiene una localización principalmente en núcleo. Cuando las A549 son expuestas con PM₁₀ la presencia de p21^{Waf1/Cip1} en núcleo disminuye y es mayor en citoplasma en las mismas horas evaluadas, aunque el efecto se ve mayor en las 6 h. Para evaluar el efecto que tendría la inhibición de la fosforilación de STAT3 sobre la localización de p21^{Waf1/Cip1}, las células se incubaron con Stattic V y se encontró que STAT3 previene la traslocación de p21^{Waf1/Cip1} al citoplasma.

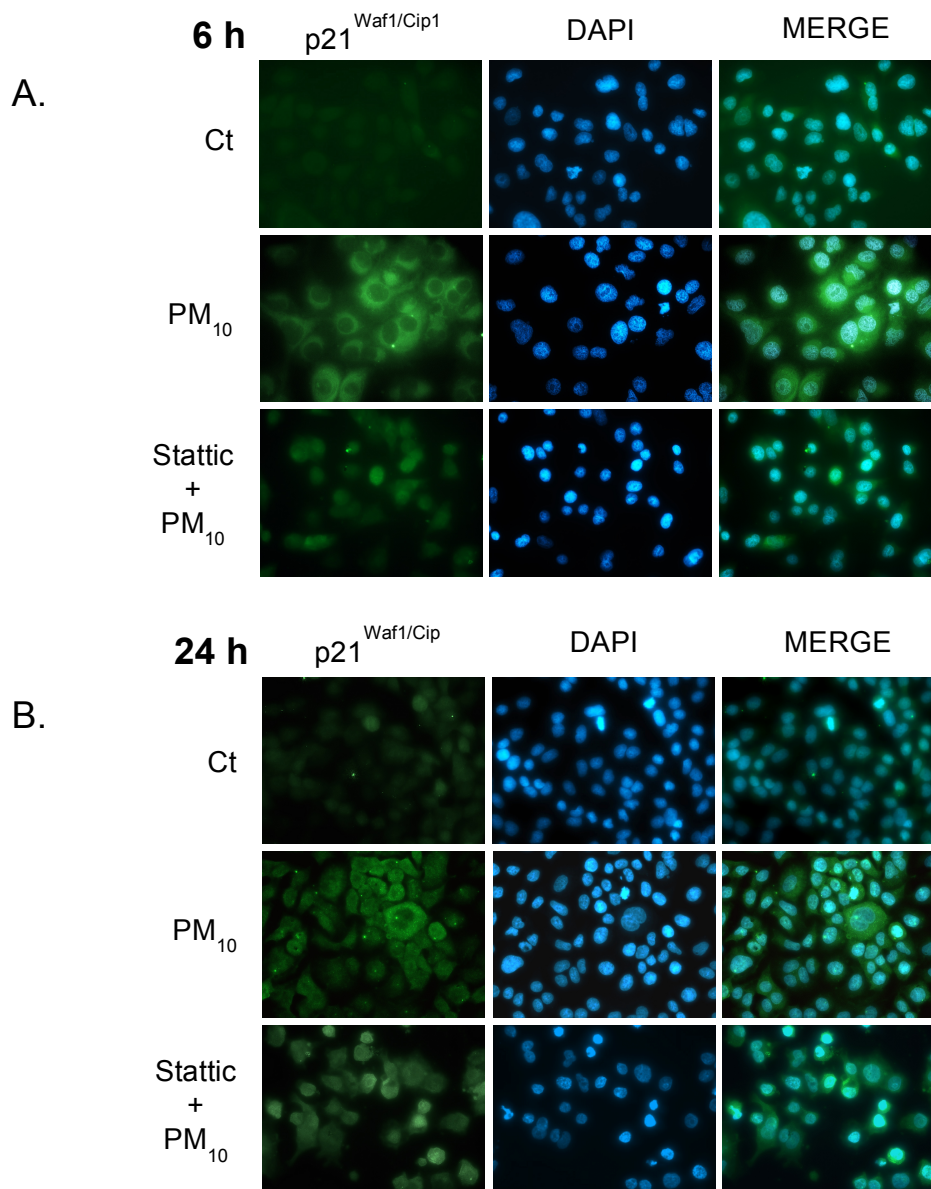


Figura 19. Las PM₁₀ indujeron la estabilización de p21^{Waf1/Cip1} en el citoplasma en células epiteliales A549. La localización subcelular de p21^{Waf1/Cip1} fue evaluada por inmunofluorescencia a las A) 6 h y B) 24 h después de la exposición con PM₁₀. En paralelo, los cultivos celulares fueron preincubados por 1 h con Stattic V (Stattic, 40 μM) antes de la exposición con PM₁₀. p21^{Waf1/Cip1} fue teñido en verde y los núcleos fueron visualizados utilizando DAPI. Las imágenes se capturaron con el microscopio Axio Imager.D2 (Carl Zeiss). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Ct: células control.

7.8 Las PM₁₀ inducen la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 y STAT3 previno la apoptosis

Debido a que p21^{Waf1/Cip1} es una proteína relacionada con el ciclo celular y que sus niveles son inducidos por las PM₁₀ mediados por la activación de STAT3, se evaluaron las diferentes fases del ciclo celular y apoptosis de células A549 expuestas con 10 µg/cm² de PM₁₀ durante 24 h. Para determinar si la fosforilación de STAT3 se asocia con el ciclo celular, en paralelo se preincubaron células con el inhibidor Stattic V (Stattic, 40 µM) antes de la exposición con PM₁₀.

En la figura 20 se presentan los resultados de la distribución de las diferentes fases del ciclo celular y como se puede observar, las PM₁₀ indujeron la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 ya que se registró un incremento significativo de 7.4% con respecto a las células no expuestas a PM₁₀ (p<0.05 vs. Ct).

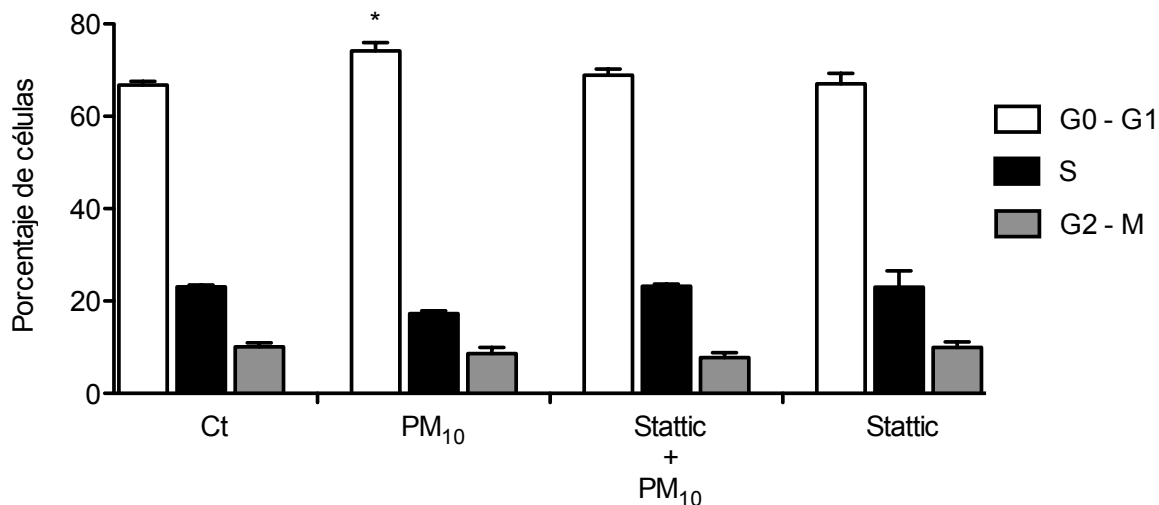


Figura 20. Distribución del ciclo celular en células A549 expuestas a PM₁₀ con y sin la inhibición de la fosforilación de STAT3. Células A549 se expusieron por 24 horas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ con o sin inhibidor Stattic V (Stattic, 40 μM , pretratamiento 1 h). El ciclo celular se llevó a cabo con el ensayo de yoduro de propidio y se analizó por citometría de flujo. Los valores representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs. Ct). Por otra parte, las PM₁₀ y a la inhibición de la fosforilación de STAT3 no indujeron cambios en las demás fases del ciclo celular.

En la figura 21 se muestran los resultados de los niveles de apoptosis en células A549 expuestas con PM₁₀ con y sin la inhibición de la fosforilación de STAT3-Y705.

Las PM₁₀ no inducen muerte celular de manera significativa con respecto a las células control, sin embargo, cuando se inhibe la fosforilación de STAT3 se registró 28.8% de apoptosis ($p < 0.0001$ vs. Ct).

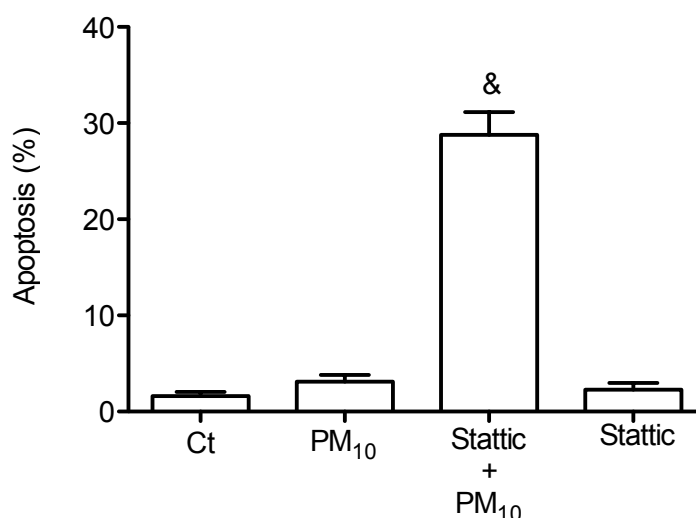


Figura 21. Niveles de apoptosis en células A549 expuestas a PM₁₀ con y sin la inhibición de la fosforilación de STAT3. Células A549 se expusieron por 24 h a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ con o sin inhibidor Stattic V (Stattic, 40 μM , pretratamiento 1 h). La apoptosis se evaluó con Anexina V-Fluoresceína y se analizó por citometría de flujo. Los valores representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes ($^{\&}p < 0.0001$ vs. Ct).

8 DISCUSIÓN

El material particulado es un carcinógeno para los humanos de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2013; Loomis et al., 2013) y es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón (Cui et al., 2014) y otras neoplasias (Iwai, et al., 2005). Además existen evidencias toxicológicas que apoyan el papel genotóxico, mutagénico y carcinogénico de las partículas (Knaapen et al., 2004; Shi et al., 2006). Aunque los procesos carcinogénicos inducidos por la exposición a PM₁₀ no están completamente entendidos, trabajos realizados *in vitro* sugieren que concentraciones entre 10 a 160 µg/cm² no tienen impacto sobre la viabilidad celular (Alfaro-Moreno et al., 2002; Sánchez-Pérez et al., 2014), pero a esas concentraciones sí se induce daño en el DNA (Topinka et al., 2000; Soberanes et al., 2006; Sevastyanova et al., 2008; Sánchez-Pérez et al., 2009) y estrés oxidante a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (Li et al., 1996; Prahalad et al., 2001; MacNee and Donaldson, 2003; Chirino et al., 2010).

En este estudio se utilizó una concentración de 10 µg/cm² de PM₁₀ que puede ser comparado a una exposición durante 5 días (Li et al., 2003; Ferecatu et al., 2010), lo cual sugiere que la exposición humana a PM₁₀, podría desarrollar alteraciones sin evidente toxicidad. Los hallazgos *in vitro* de que las PM₁₀ inducen daño a DNA sin citotoxicidad, alteraciones en la progresión del ciclo celular o apoptosis necesitan dirigirse para esclarecer si las PM₁₀ modulan estas respuestas en células expuestas, ya que son procesos clave y su alteración podría llevar a un fenotipo anormal. Además, si las PM₁₀ inducen daño en el DNA, como se ha demostrado en diversos estudios (Soberanes et al., 2006; Sevastyanova et al., 2008), las células expuestas a este contaminante podrían evadir la apoptosis aun cuando el DNA dañado no ha sido reparado adecuadamente. La proteína p21^{Waf1/Cip1} es clave en la detención del ciclo celular después de daño a DNA (Dutto et al., 2015) y se ha encontrado sobrerregulada en diversos tumores (Roninson, 2002; Hawthorne et al., 2009). Debido a que se ha demostrado que las PM₁₀ inducen la sobreexpresión de

p21^{Waf1/Cip1} (Sánchez-Pérez et al., 2014) y que STAT3 es factor de transcripción de p21^{Waf1/Cip1} (Bowman et al., 2000; Coqueret and Gascan, 2000; Hawthorne et al., 2009; Cao et al., 2010), en este trabajo se evaluó si las PM₁₀ inducen a p21^{Waf1/Cip1} a través de STAT3 en células A549.

En este trabajo se utilizó la línea celular A549, modelo de estudio ampliamente usado y aceptado para estudios toxicológicos de PM₁₀ (Foster et al., 1998; Upadhyay et al., 2003; Gualtieri et al., 2010; Soberanes et al., 2006; Alessandria et al., 2014), y su uso representa a las células epiteliales de pulmón humano. El perfil genético de esta línea celular, p53 no está mutado (Blanco et al., 2009) lo que ha permitido evaluar la vía de señalización inducida cuando las PM₁₀ producen daño en el DNA (Sánchez-Pérez et al., 2009). Por otra parte, se ha observado el mismo comportamiento de respuesta que con otras líneas celulares normales. Se ha reportado que células epiteliales bronquiales normales como las BEAS-2B y A549 tienen prácticamente la misma respuesta cuando se evaluó la expresión de marcadores epiteliales inducidos por el extracto de humo de cigarro (Eurlings et al., 2014).

En el presente trabajo, se encontró que las células A549 expuestas a PM₁₀ indujeron la fosforilación de STAT3 en los residuos Y705 y S727 la cual está relacionada en la inducción de p21^{Waf1/Cip1} así como a su estabilización en citoplasma. Estos resultados sugieren que las células expuestas a PM₁₀ causaron daño en el DNA, lo cual correlacionó con la detención del ciclo celular en la fase G₀-G₁. Sin embargo, a pesar de la detención del ciclo celular no se observaron cambios significativos en los niveles de apoptosis. Cuando se incubaron las células A549 con el inhibidor de STAT3 y se expusieron a las PM₁₀, se observó un incremento en los niveles de apoptosis, lo cual sugiere que la activación de STAT3 le confiere sobrevivencia a las células, como ha sido reportado previamente (Bowman et al., 2000; Yu et al., 2009; Spitzner et al., 2014a). Además, existen evidencias que apuntan a que STAT3 es requerida en la etapa de iniciación y promoción de la carcinogénesis (Kim et al., 2007). En el modelo murino de carcinogénesis de piel inducida químicamente, se ha reportado que STAT3 mantiene la sobrevivencia de las

células con daño en el DNA, evento requerido para la etapa de iniciación y promoción del proceso carcinogénico (Chan et al., 2004).

En este trabajo, se reporta que las PM_{10} indujeron un incremento en la fase G0-G1, evento que no se había encontrado en estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Sánchez-Pérez et al., 2014). Sin embargo, trabajos como en el de Zhang et al., (2007a) observaron detención del ciclo celular en la fase G0-G1 en células A549 expuestas a $PM_{2.5}$, sin disminución en la sobrevivencia celular, resultados similares a los encontrados en este trabajo. Por otro lado, es importante destacar que las PM_{10} utilizadas en el presente estudio fueron colectadas en años posteriores a las utilizadas en trabajos previamente reportados en nuestro grupo de trabajo. Debido a que los efectos de las PM_{10} son directamente atribuidos a su composición, se sugiere que las PM_{10} usadas en este trabajo, tienen una diferente concentración de componentes que estén induciendo un efecto mayor, capaz de producir un discreto incremento, pero significativo en la acumulación de la fase G0-G1. En este sentido, es importante mencionar que la composición de las PM_{10} colectadas cada año, llega a ser diferentes debido a que derivan de diversas actividades antropogénicas de su lugar de origen, como es el caso de las PM_{10} colectadas de diferentes ciudades en Korea mostraron un contenido más alto de metales en 22 años (Kim et al., 2016). De forma similar, se observó que las PM_{10} colectadas en el año 2006 y en el 2009 en la Ciudad de México también mostraron un contenido mayor de metales como Fe y Cu (Mugica et al., 2009; Guerra et al., 2013).

Se ha estimado, que la concentración de partículas, su composición así como los efectos biológicos inducidos por éstas varían de acuerdo al tiempo/espacio donde el material particulado es colectado (Rosas et al., 2007). Por ejemplo, en Holanda, las PM_{10} de una estación de tren subterráneo y las que provienen del tránsito vehicular, tienen un impacto diferencial en los efectos celulares en macrófagos, evaluados a través de la viabilidad celular y la secreción de mediadores proinflamatorios como $TNF\alpha$, IL-6 y MIP-2 (Steenhof et al., 2011). La cantidad de metales como cobre, hierro, níquel, vanadio y zinc y de PAHs en las PM_{10} de la estación de tren fueron 90, 19, 5, 2, 240 y 4.5 veces más altos comparados con las

del sitio del tránsito vehicular, respectivamente. Las partículas que provienen de la estación del tren indujeron en los macrófagos disminución de la viabilidad y una mayor secreción de TNF α , IL-6 y MIP-2, sugiriendo un alto potencial proinflamatorio.

Debido a que STAT3 es una proteína que participa en procesos inflamatorios como respuesta ante un estímulo celular (Duan and Simpson-Haidaris, 2006) en este trabajo se evaluó la vía de activación de STAT3 inducida por las PM₁₀. La fosforilación de STAT3 puede ser llevada a cabo a través de EGFR, sin embargo, en este trabajo se encontró que EGFR no participa en la vía de activación de STAT3 después de la exposición con PM₁₀. Se exploró la fosforilación de EGFR debido a que partículas derivadas de la combustión de Diésel (DEPs) inducen la activación de STAT3 a través de EGFR (Cao et al., 2007). Aunque las PM₁₀ contienen DEPs (Kafoury and Kelley, 2005), los resultados sugieren que la cantidad de DEPs contenida en las PM₁₀ no es suficiente para inducir la fosforilación de EGFR, por lo que en este trabajo se decidió evaluar la cinasa Src, debido a que esta proteína está implicada en la fosforilación de STAT3 en Y705, (Bowman et al., 2000).

Los resultados mostraron que la cinasa Src se encontró fosforilada desde tiempos tempranos después de la exposición con PM₁₀ y se observó una prevención completa de la inducción de pSTAT3-Y705 cuando se inhibió la fosforilación de Src, sugiriendo que Src es responsable de la fosforilación de STAT3-Y705, inducida después de la exposición con PM₁₀. Src es una cinasa expresada ubicuamente en diversos tejidos y se relaciona en diversas funciones, como proliferación y sobrevivencia celular, mantenimiento de contacto intercelulares, motilidad y migración, por lo que la perturbación en su regulación podría generar un proceso carcinogénico (Giannoni et al., 2010).

En este trabajo se observó un patrón de desfosforilación de STAT3-Y705. Este evento puede estar asociado con la activación de diversas fosfatasa de tirosina como PTPRT (protein tyrosine phosphatase receptor T, también conocida como PTPp), SHP1 y SHP2 (SH2 domain-containing phosphatase1 y phosphatase2, respectivamente) ya que se conoce que pSTAT-Y705 es sustrato preferencial de

estas fosfatasa cuando hay estrés celular (Zhang et al., 2007b; Kim, 2010; He et al., 2014).

Otra de las proteínas que de manera convencional participa en la fosforilación de STAT3 en S727 es la cinasa ERK1/2 (Aggarwal et al., 2009). En este trabajo no se encontró que pERK1/2-T202 participe en la activación de STAT3-S727, ya que la proteína fue fosforilada en tiempos tempranos y después reprimida hasta las 12 h, donde de nuevo se indujo su actividad y se mantuvo hasta las 24 h de exposición con las PM₁₀. Esta rápida inducción seguida por la menor actividad ha sido previamente descrito para ERK1/2 (Meloche and Pouyssegur, 2007). La desfosforilación de ERK1/2 también puede estar asociada con la actividad de fosfatasa de treonina/serina como PP2A (Kawahara et al., 2013). PP2A juega un papel importante en procesos de proliferación celular y en el control del ciclo celular (Kawahara et al., 2013) y también se ha considerado como supresor de tumores (Perroti and Neviani, 2013).

La disminución y aumento en la fosforilación inducida por PM₁₀ en pSTAT-Y705 and pERK1/2-T202 sugiere que las fosfatasa podrían activarse como una respuesta inmediata contra las PM₁₀ y posteriormente inhibirse, lo cual sugiere que algunos elementos de las PM₁₀ podrían regular la actividad de las fosfatasa. En este sentido, algunos metales como vanadio y cadmio inhiben la actividad de fosfatasa de tirosina y serina/treonina (Samet et al., 1997; Pan et al., 2013), y esos metales están contenidos en PM₁₀ (Englert, 2004; Guastadisegni et al., 2010) y se han reportado en las PM₁₀ de la Ciudad de México (Manzano-León et al., 2013).

Debido a que ERK1/2 no participó en la fosforilación de STAT3-S727, se evaluó a PKC ζ ya que esta cinasa tiene la capacidad de fosforilar a STAT3 en el residuo S727 en citoplasma e ingresar de forma activa al núcleo (Mattagajasingh et al., 2012, Butler et al., 2013). PKC ζ se fosforiló rápidamente y sostiene su actividad a partir de 5 min hasta 24 h de exposición con PM₁₀. En este trabajo se determinó que la cinasa PKC ζ , es la responsable de fosforilar a STAT3 en S727 ya que se evaluó la interacción entre estas dos proteínas con un ensayo de inmunoprecipitación. La inmediata activación de PKC ζ puede tener un impacto importante en células

expuestas a PM_{10} , porque esta cinasa modula vías de inflamación y sobrevivencia celular, diferenciación, desarrollo y progresión tumoral (Berra, et al., 1993; Lerner-Marmarosh, et al., 2007). Además de esos efectos, a PKC ζ se le ha implicado en la desorganización de la barrera epitelial de pulmón en respuesta a un proceso inflamatorio en un modelo de ratón expuesto a DEPs (Caraballo et al., 2013). PKC ζ puede ser activada por diversas citocinas como TNF α y radicales libres (Lerner-Marmarosh et al., 2007; Diaz-Meco and Moscat, 2012). En este sentido, es bien conocido que la inflamación es una respuesta inducida por las PM_{10} (Li et al., 1996; Pope and Dockery, 2006; Alfaro-Moreno et al., 2009; Andreau et al., 2012; Manzano-León et al., 2013; Salcido-Neyoy et al., 2015), lo cual podría explicar en parte, la activación de PKC ζ .

Las PM_{10} son consideradas como un contaminante que tiene un importante papel en diversos efectos a la salud. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a partículas suspendidas, incrementa el riesgo de cáncer de pulmón. Debido a que la activación de STAT3 contribuye a la progresión del cáncer, los resultados de este estudio advierten que la vía de señalización de STAT3 inducida por la exposición con PM_{10} en células epiteliales de pulmón, lleva a la sobrevivencia celular, y su activación podría ser una vía que contribuye como factor de riesgo asociado al potencial carcinogénico de la exposición a las PM_{10} .

En resumen, en este estudio se encontró que las PM_{10} inducen la fosforilación de STAT3 en los residuos Y705 y S727 a través de la actividad de las cinasas Src y PKC ζ , respectivamente (figura 22). La activación de STAT3 esta relacionado con los niveles de p21^{Waf1/Cip1}, induciendo la detención del ciclo celular en la fase G0-G1 y previniendo la apoptosis, y este evento parece estar asociado a la retención de p21^{Waf1/Cip1} en citoplasma. En este sentido, STAT3 juega un importante papel anti-apoptótico lo que le confiere sobrevivencia a las células expuestas a PM_{10} . Por otra parte, la sobrerregulación de p21^{Waf1/Cip1} sugiere una respuesta ante el daño en el DNA, por lo que las células expuestas a PM_{10} podrían evadir la apoptosis aún cuando el DNA dañado no ha sido reparado adecuadamente. Los resultados de este trabajo podrían explicar alguno de los mecanismos por los cuales las PM_{10} podrían

potencialmente relacionarse con procesos carcinogénicos, debido a su participación en una vía de señalización asociada con la proliferación y la supervivencia celular.

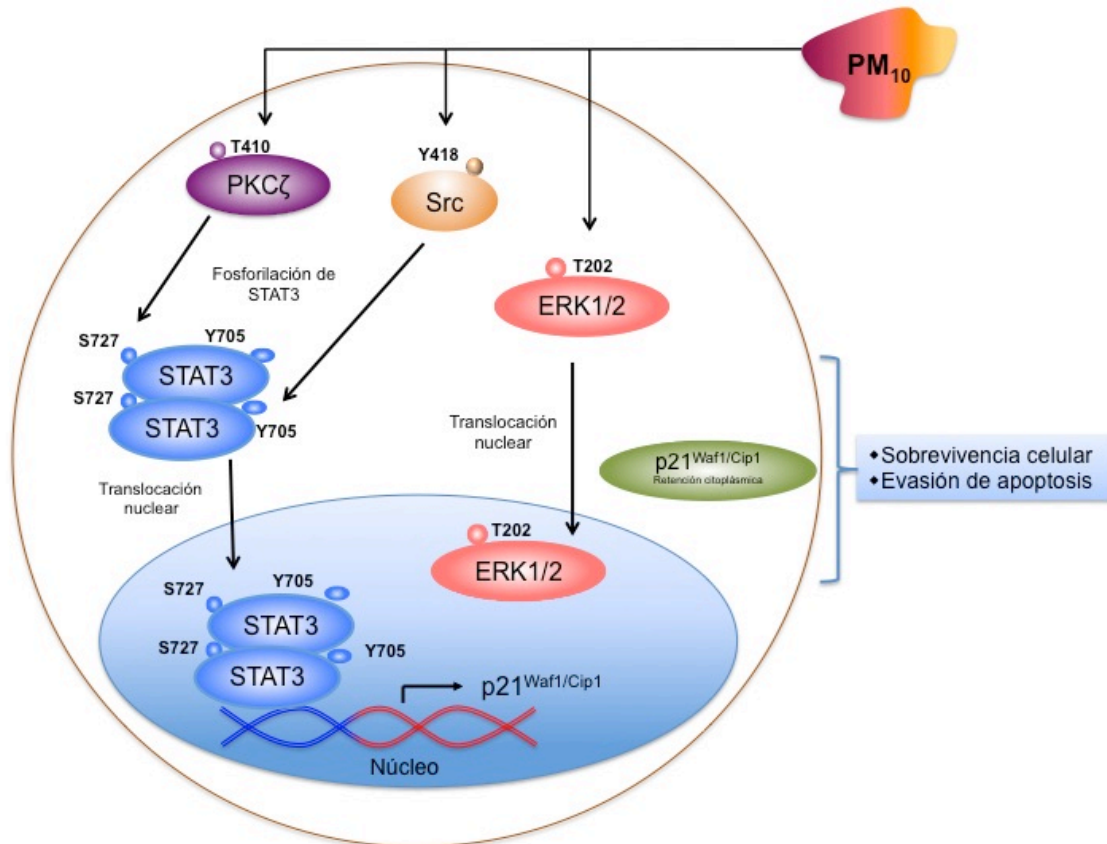


Figura 22. Mecanismo de señalización propuesto para la fosforilación de STAT3 inducido por la exposición de PM_{10} en células epiteliales de pulmón humano. Las PM_{10} indujeron la activación de las cinasas Src y PKC ζ , las cuales fosforilaron los residuos específicos de activación de STAT3 que son Y705 y S727, respectivamente. La cinasa ERK1/2 se induce por las PM_{10} , sin embargo no está involucrada en la fosforilación de STAT3 en S727. La sobreexpresión de p21^{Waf1/Cip1} y su estabilización en citoplasma está asociado con la activación de STAT3. Se demostró que la fosforilación de STAT3 previene la apoptosis confiriéndole supervivencia celular como fue demostrado a través de la inhibición de la fosforilación de STAT3.

9 CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que la proteína p21^{Waf1/Cip1} y su retención en citoplasma fueron inducidos en células epiteliales de pulmón A549 expuestas a PM₁₀. La actividad de p21^{Waf1/Cip1} es regulada por la fosforilación de los residuos Y705 y S727 de STAT3 a través de la actividad de las cinasas Src y PKCζ, y estos eventos están asociados con la detención del ciclo celular en la fase G0-G1, así como con la prevención de la apoptosis.

10 PERSPECTIVAS

Las células A549 tienen una limitación puesto que es una línea celular hipotriploide, lo cual es diferente de un epitelio normal de pulmón humano. En este sentido, células epiteliales derivadas de epitelio bronquial humano como BEAS-2B podría ser de utilidad para diseñar estudios posteriores.

En este estudio se demostraron algunos efectos asociados a la exposición de PM_{10} a corto plazo, sin embargo la exposición a largo plazo bajo condiciones no citotóxicas podría ser de ayuda para analizar el impacto de las PM_{10} en el daño al DNA. Un ensayo clonogénico permitirá evaluar la capacidad de las células expuestas a PM_{10} de someterse a divisiones celulares ilimitadas.

Los resultados mostraron un patrón de desfosforilación de Y705 de STAT3 y de la cinasa ERK1/2, por lo que es importante evaluar el mecanismo de regulación de las fosfatasa inducido por las PM_{10} . Los resultados obtenidos complementará la vía de señalización derivada de los efectos del material particulado.

En este trabajo se evaluó que STAT3 regula a $p21^{Waf1/Cip1}$. Sin embargo, es importante esclarecer el mecanismo por el que $p21^{Waf1/Cip1}$ se estabiliza en citoplasma después de la exposición con las PM_{10} . Se ha reportado que la fosforilación de $p21^{Waf1/Cip1}$ se puede llevar a cabo a través de cinasas como AKT/PKB, Pim-2, PKC ζ , por lo que su evaluación sería una aportación importante para conocer el potencial carcinogénico del material particulado.

11 REFERENCIAS

- Abbas T., Dutta A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer.* 9(6):400-414.
- Abukhdeir AM., Park BH. (2008). p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev. Mol. Med.* 10:e19.
- Aggarwal BB., Kunnumakka AB., Harikumar KB., Gupta SR., Tharakan ST., Koca C., Dey S., Sung B., (2009). Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. NY. Acad. Sci.* 1171:59-76.
- Akira S. (1999). Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. *Stem Cells.* 17:138-146.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (2002). *Biología Molecular de la Célula.* Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 925-928.
- Alessandria L., Schilirò T., Degan R., Traversi D., Gilli G. (2014). Cytotoxic response in human lung epithelial cells and ion characteristics of urban-air particles from Torino, a northern Italian city. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21(8):5554-5564.
- Alfaro-Moreno E., Torres V., Miranda J., Martínez L., García-Cuellar C., Nawrot TS., Vanaudenaerde B., Hoet P., Ramírez-López P., Rosas I., Nemery B., Osornio-Vargas, AR. (2009). Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ. Res.* 109:528-535.
- Alfaro-Moreno E., Martinez L., García-Cuellar C., Bonner JC., Murray JC. Rosas I., Ponce de León RS., Osornio-Vargas AR. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ. Health Perspect.* 110:715-720.
- Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. (2008). STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res.* 18(2):254-267.
- Andreau K., Leroux M., Bouharrou A. (2012). Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity. *Biochem. Res. Int.* 493894.
- Arthur LM, Heber-Katz E. (2011). The role of p21 in regulating mammalian regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* 2(3):30.
- Barrera RLM., Drago SME., Pérez RJ., Zamora AC., Gómez AF., Sainz ETR., Mendoza PF. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 17(1):42-55.
- Bellido T., O'Brien CA., Roberson PK., Manolagas SC. (1998). Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 273(33):21137-21144.
- Benekli M., Baer MR., Baumann H., Wetzler M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood.* 101(8):2940-2954.
- Berra E., Diaz-Meco MT., Dominguez I., Municio MM., Sanz L., Lozano J., Chapkin RS., Moscat J. (1993). Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic

- signal transduction. *Cell*. 74(3):555-563.
- Blanco R., Iwakawa R., Tang M., Kohno T., Angulo B., Pio R., Montuenga LM., Minna JD., Yokota J., Sanchez-Cespedes M. (2009). A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Hum. Mutat.* 30(8):1199-1206.
- Boonstra J., Post JA. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 337:1-13.
- Borja-Aburto, VH., Castillejos, M., Gold, DR., Bierzwinski, S., Loomis, DP. (1998). Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ. Health Perspect.* 106:849-855.
- Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19(21):2474-2488.
- Bretones G., Delgado MD., León J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta*. 1849(5):506-516.
- Bromberg JF. (2001). Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*. 23(2):161-169.
- Butler AM., Scotti Buzhardt ML., Li S., Smith KE., Fields AP., Murray NR. (2013). Protein kinase C zeta regulates human pancreatic cancer cell transformed growth and invasion through a STAT3-dependent mechanism. *PLoS One*. 8(8):e72061.
- Cao D., Bromberg PA., Samet JM. (2010). Diesel particle-induced transcriptional expression of p21 involves activation of EGFR, Src, and Stat3. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42(1):88-95.
- Cao D., Tal TL., Graves LM., Gilmour I., Linak W., Reed W., Bromberg PA., Samet, JM. (2007). Diesel exhaust particulate-induced activation of STAT3 requires activities of EGFR and SCR in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292:L422-L429.
- Caraballo JC., Borchering J., Thorne PS., Comellas AP. (2013). Protein kinase C- ζ mediates lung injury induced by diesel exhaust particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48(3):306-313.
- Chan KS., Sano S., Kiguchi K., Anders J., Komazawa N., Takeda J., DiGiovanni J. (2004). Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 114(5):720-728.
- Chirino YI., Sánchez-Pérez Y., Osornio-Vargas AR., Rosas I., García-Cuellar CM. (2015). Sampling and composition of airborne particulate matter (PM10) from two locations of Mexico City. *Data Brief*. 4:353-356.
- Chirino YI., Sánchez-Pérez Y., Osornio-Vargas AR., Morales-Bárceñas R., Gutiérrez-Ruíz MC., Segura-García Y., Rosas I., Pedraza-Chaverri J., García-Cuellar CM. (2010). PM10 impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol. Lett.* 193:209-216.
- Chow JC., Watson JG., Mauderly JL., Costa DL., Wyzga RE., Vedal S., Hidy GM., Altshuler SL., Marrack D., Heuss JM., Wolff GT., Pope CA 3rd., Dockery DW. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 56(10):1368-1380.
- Chung J., Uchida E., Grammer TC., Blenis J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its

- tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 17:6508-6516.
- Coqueret O., Gascan H. (2000). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J. Biol. Chem.* 275(25):18794-18800.
- Cui P., Huang Y., Han J., Song F., Chen K. (2014). Ambient particulate matter and lung cancer incidence and mortality: a meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Public Health.* 25(2):324-329.
- Darnell JE. (1997). STATs and gene regulation. *Science.* 277:1630-1635.
- Decker T., Kovarik P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene.* 19(21):2628-2637.
- Denicourt C., Dowdy SF. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* 18(8):851-855.
- De Vizcaya-Ruiz A., Gutiérrez-Castillo M., Uribe-Ramírez M., Cebrián ME., Mugica-Alvarez V., Sepúlveda J., Rosas I., Salinas E., García-Cuellar C., Martínez F., Alfaro-Moreno E., Torres-Flores V., Osornio-Vargas A., Sioutas C., Fine PM., Singh M., Geller MD., Kuhn T., Miguel AH., Eiguren-Fernandez A., Schiestl RH., Reliene R., Froines J. (2006). Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. *Atmos. Environ.* 40:S583-S592.
- Diaz-Meco MT., Moscat J. (2012). The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond. *Immunol. Rev.* 246:154-167.
- Dockery DW. (2009). Health effects of particulate air pollution. *Ann. Epidemiol.* 19(4):257-263.
- Dockery DW., Pope CA. (1994). Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health.* 15:107-132.
- Donaldson K., Beswick PH., Gilmour PS. (1996). Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol. Lett.* 88:293-298.
- Duan HO., Simpson-Haidaris PJ. (2006). Cell type-specific differential induction of the human γ -Fibrinogen promoter by interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 28:12451-12457.
- Dutto I., Tillhon M., Cazzalini O., Stivala LA., Prospero E. (2015). Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch. Toxicol.* 89:155-178.
- Eferl R. (2016). Ludwig Boltzmann Institute for Cancer Research (LBI-CR) & Institute for Cancer Research (ICR) <http://lbicr.lbg.ac.at/en/robert-eferl>
Fecha de consulta: 25/04/16.
- Englert N. (2004). Fine particles and human health--a review of epidemiological studies. *Toxicol. Lett.* 149:235-242.
- EPA: US. Environmental Protection Agency. (1997). Exposure factors handbook. National Center for Environmental Assessment. Washington Office. Chapter 5: Inhalation. p. 217-218.
- Eurlings IM., Reynaert NL., van den Beucken T., Gosker HR., de Theije CC., Verhamme FM., Bracke KR., Wouters EF., Dentener MA. (2014). Cigarette smoke extract induces a phenotypic shift in epithelial cells; involvement of HIF1 α in mesenchymal transition. *PLoS One.* 9(10):e107757.

- Farina F., Sancini G., Battaglia C., Tinaglia V., Mantecca P., Camatini M., Palestini P. (2013). Milano summer particulate matter (PM10) triggers lung inflammation and extra pulmonary adverse events in mice. *PLoS One*. 8(2):e56636.
- Ferecatu I., Borot MC., Bossard C., Leroux M., Boggetto N., Marano F., Baeza-Squiban A., Andreau K. (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. *Part. Fibre Toxicol.* 7:18.
- Flagan RC., Seinfeld JH. (1988). *Fundamentals of air pollution engineering*. Chapter 5: Aerosols. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. p 307.
- Foster KA., Oster CG., Mayer MM., Avery ML., Audus KL. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp. Cell Res.* 243:359-366.
- García-Cuellar C., Alfaro-Moreno, E., Martínez-Romero F., Ponce de León RS., Rosas I., Pérez CE., Osornio-Vargas AR. (2002). DNA damage induced by PM10 from different zones of Mexico City. *Ann. Occup. Hyg.* 46(Suppl 1):425-428.
- Gayen JR., Saberi M., Schenk S., Biswas N., Vaingankar SM., Cheung WW., Najjar SM., O'Connor DT., Bandyopadhyay G., Mahata SK. (2009). A novel pathway of insulin sensitivity in chromogranin A null mice: a crucial role for pancreastatin in glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 284:28498-28509.
- Ghio AJ., Carraway MS., Madden MC. (2012). Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15:1-21.
- Giannoni E., Taddei ML., Chiarugi P. (2010). Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic. Biol. Med.* 49(4):516-527.
- Grandis JR., Drenning SD., Zeng Q., Watkins SC., Melhem MF., Endo S., Johnson DE., Huang L., He Y., Kim JD. (2000). Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(8):4227-4232.
- Gualtieri M., Ovrevik J., Mollerup S., Asare N., Longhin E., Dahlman HJ., Camatini M., Holme JA. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* 713:18-31.
- Gualtieri M., Ovrevik J., Holme JA., Perrone MG., Bolzacchini E., Schwarze PE., Camatini M. (2010). Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol. In Vitro.* 24:29-39.
- Guastadisegni C., Kelly FJ., Cassee FR., Gerlofs-Nijland ME., Janssen NA., Pozzi R., Brunekreef B., Sandstrom T., Mudway I. (2010). Determinants of the proinflammatory action of ambient particulate matter in immortalized murine macrophages. *Environ. Health Perspect.* 118:1728-1734.
- Guerra R., Vera-Aguilar E., Uribe-Ramirez M., Gookin G., Camacho J., Osornio-Vargas AR., Mugica-Alvarez V., Angulo-Olais R., Campbell A., Froines J., Kleinman TM., De Vizcaya-Ruiz A. (2013). Exposure to inhaled particulate

- matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum. *Toxicol. Lett.* 222:146-154.
- Hawley B., Schaeffer J., Poole JA., Dooley GP., Reynolds S., Volckens J. (2015). Differential response of human nasal and bronchial epithelial cells upon exposure to size-fractionated dairy dust. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 78(9):583-594.
- Hawthorne VS., Huang WC., Neal CL., Tseng LM., Hung MC., Yu D. (2009). ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 7(4):592-600.
- He RJ., Yu ZH., Zhang RY., Zhang ZY. (2014). Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol. Sin.* 35(10):1227-1246.
- Héliéz C., Baricault L., Barboule N., Valette A. (2003). Paclitaxel increases p21 synthesis and accumulation of its AKT-phosphorylated form in the cytoplasm of cancer cells. *Oncogene.* 22(21):3260-3268.
- Hernández-Ramírez DF., Cabiedes J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatol. Clin.* 6(3):173-177.
- Hueglin C., Gehriga R., Baltensperger U., Gyselc M., Monnd C., Vonmonta H. (2005). Chemical characterisation of PM2.5, PM10 and coarse particles at urban, near-city and rural sites in Switzerland. *Atmos. Environ.* 39:637–651.
- IARC. (2013). International Agency for Research on Cancer. Scientific Publication No. 161. Air Pollution and Cancer. Editors: Kurt Straif, Aaron Cohen, and Jonathan Samet. <http://www.iarc.fr/en/publications/books/sp161/index.php>.
- Iwai K., Mizuno S., Miyasaka Y., Mori T. (2005). Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: Cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan. *Environ. Res.* 99:106-117.
- Jacobson MZ. (2002). Atmospheric pollution. History, science, and regulation. Cambridge University Press, New York. pp. 62-70.
- Kafoury RM., Kelley J. (2005). Ozone enhances diesel exhaust particles (DEP)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression in human airway epithelial cells through activation of nuclear factors- kappaB (NF-kappaB) and IL-6 (NF-IL6). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2:403-410.
- Kawahara E., Maenaka S., Shimada E., Nishimura Y., Sakurai H. (2013). Dynamic regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by protein phosphatase 2A regulatory subunit B56γ1 in nuclei induces cell migration. *PLoS One.* 8(5):e63729.
- Kelly FJ., Fussell JC. (2012). Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos. Environ.* 60:504-526.
- Kim KH., Hong YJ., Szulejko JE., Kang CH., Chambers S., Feng X., Deep A., Kim YH. (2016). Airborne iron across major urban centers in South Korea between 1991 and 2012. *Sci. Total Environ.* 550:309-320.
- Kim DJ., Tremblay ML., Digiovanni J. (2010). Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation. *PLoS One.* 5(4):e10290.

- Kim DJ., Chan KS., Sano S., Digiovanni J. (2007). Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 46(8):725-731.
- Knaapen AM., Borm PJ., Albrecht C., Schins RP. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer.* 109(6):799-809.
- Kueng W., Silber E., Eppenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 182(1):16-19.
- Lerner-Marmarosh N., Miralem T., Gibbs PE., Maines MD. (2007). Regulation of TNF-alpha-activated PKC-zeta signaling by the human biliverdin reductase: identification of activating and inhibitory domains of the reductase. *FASEB J.* 21:3949-3962.
- Levy DE., Darnell JE. (2002). STATS: Transcriptional control and biological impact. *Nature.* 3:651-662.
- Levy DE., Lee CK. (2002). What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* 109(9):1143-1148.
- Li N., Hao M., Phalen RF., Hinds WC., Nel AE. (2003). Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin. Immunol.* 109:250-265.
- Li XY., Gilmour PS., Donaldson K., MacNee W. (1996). Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax.* 51:1216-1222.
- Ling SH., van Eeden SF. (2009). Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 4:233-423.
- Liu Y., Wang B., Wang J., Wan W., Sun R., Zhao Y., Zhang N. (2009). Downregulation of PKCzeta expression inhibits chemotaxis signal transduction in human lung cancer cells. *Lung Cancer.* 63:210-218.
- Loomis D., Grosse Y., Lauby-Secretan B., Ghissassi FE., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Baan R., Mattock H., Straif K. (2013). International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. *Lancet Oncol.* 14(13):1262-1263.
- Lovera-Leroux M., Crobeddu B., Kassis N., Petit PX., Janel N., Baeza-Squiban A., Andreau K. (2015). The iron component of particulate matter is antiapoptotic: A clue to the development of lung cancer after exposure to atmospheric pollutants? *Biochimie.* 118:195-206.
- MacNee W., Donaldson K. (2003). Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur. Respir. J.* 40:47s-51s.
- Manzano-León N., Quintana R., Sánchez B., Serrano J., Vega E., Vázquez-López I., Rojas-Bracho L., López-Villegas T., O'Neill MS., Vadillo-Ortega F., De Vizcaya-Ruiz A., Rosas I., Osornio-Vargas AR. (2013). Variation in the composition and in vitro proinflammatory effect of urban particulate matter from different sites. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 27:87-97.
- Marr LC., Dzepina K., Jimenez JL., Reisen F., Bethel HL., Arey J., Gaffney JS., Marley NA., Molina LT., Molina MJ. (2006). Sources and transformations of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico City. *Atmos. Chem. Phys.* 6:1733-1745.
- Mattagajasingh SN., Yang XP., Irani K., Mattagajasingh I., Becker LC. (2012).

- Activation of Stat3 in endothelial cells following hypoxia-reoxygenation is mediated by Rac1 and protein Kinase C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823(5):997-1006.
- Meloche S., Pouyssegur J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 26:3227-3239.
- Miyakoshi M., Yamamoto M., Tanaka H., Ogawa K. (2014). Serine 727 phosphorylation of STAT3: an early change in mouse hepatocarcinogenesis induced by neonatal treatment with diethylnitrosamine. *Mol. Carcinog.* 53(1):67-76.
- Molina LT. y Molina MJ. (2005). La calidad del aire en la megaciudad de México. Un enfoque integral. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 27-29.
- Møller P., Jacobsen NR., Folkmann JK., Danielsen PH., Mikkelsen L., Hemmingsen JG., Vesterdal LK., Forchhammer L., Wallin H., Loft S. (2010). Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic. Res.* 44(1):1-46.
- Møller P., Folkmann JK., Forchhammer L., Bräuner EV., Danielsen PH., Risom L., Loft S. (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 266(1):84-97.
- Mora LB., Buettner R, Seigne J., Diaz J., Ahmad N., Garcia R., Bowman T., Falcone R., Fairclough R., Cantor A., Muro-Cacho C., Livingston S., Karras J., Pow-Sang J., Jove R. (2002). Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62(22):6659-6666.
- Mugica V., Ortiz E., Molina L., De Vizcaya-Ruiz A., Nebot A., Quintana R., Aguilar J., Alcántara E. (2009). PM composition and source reconciliation in Mexico City. *Atmos. Environ.* 43:5068-5074.
- O'Shea JJ., Gadina M., Schreiber RD. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 109:S121-S131.
- Osornio-Vargas AR., Bonner JC., Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Ponce-de-León RS., Miranda J., Rosas I. (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent of particle size and composition. *Environ. Health Perspect.* 111:1289-1293.
- Pan C., Liu HD., Gong Z., Yu X., Hou XB., Xie DD., Zhu XB., Li HW., Tang JY., Xu YF., Yu JQ., Zhang LY., Fang H., Xiao KH., Chen YG., Wang JY., Pang Q., Chen W., Sun JP. (2013). Cadmium is a potent inhibitor of PPM phosphatases and targets the M1 binding site. *Sci. Rep.* 3:2333.
- Peavy HS., Rowe DR., Tchobanoglous G. (1986). *Environmental Engineering.* McGraw-Hill International Editions. p. 417, 419.
- Perrotti D., Neviani P. (2013). Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol.* 14(6):e229-238.
- Phalen RF., Oldham MJ., Nel AE. (2006). Tracheobronchial particle dose considerations for in vitro toxicology studies. *Toxicol Sci.* 92(1):126-32.
- Phalen RF. (2004). The particulate air pollution controversy. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 2(4):259-292.
- Phalen RF., Oldham MJ., Kleinman MT., Crocker TT. (1988). Tracheobronchial

- deposition predictions for infants, children and adolescents. *Ann. Occup. Hyg.* 32:(Suppl 1):11-21.
- Piccolo MT., Crispi S. (2012). The Dual Role Played by p21 May Influence the Apoptotic or Anti-Apoptotic Fate in Cancer. *J. Cancer Res. Updates* 1(2):189-202.
- Pope CA. (2007). Mortality effects of longer term exposures to fine particulate air pollution: review of recent epidemiological evidence. *Inhal. Toxicol.* 19(Suppl 1):33-38.
- Pope CA., Dockery DW. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 56:709–742.
- Pope CA., Burnett RT., Thun MJ., Calle EE., Krewski D., Ito K., Thurston GD. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 287:1132-1141.
- Pöschl U. (2005). Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:7520-7540.
- Prahalad AK., Inmon J., Dailey LA., Madden MC., Ghio AJ., Gallagher JE. (2001). Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 14:879-887.
- Qi QR., Yang ZM. (2014). Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World J. Biol. Chem.* 5(2):231-239.
- Querol X., Alastuey A., Rodriguez S., Plana F., Ruiza CR., Cots N., Guillem Massague G., Puig O. (2001). PM10 and PM2.5 source apportionment in the Barcelona Metropolitan area, Catalonia, Spain. *Atmos. Environ.* 35:6407-6419.
- Raaschou-Nielsen O., Andersen ZJ., Beelen R., Samoli E., Stafoggia M., Weinmayr G., Hoffmann B., Fischer P., Nieuwenhuijsen MJ., Brunekreef B., Xun WW., Katsouyanni K., Dimakopoulou K., Sommar J., Forsberg B., Modig L., Oudin A., Oftedal B., Schwarze PE., Nafstad P., De Faire U., Pedersen NL., Ostenson CG., Fratiglioni L., Penell J., Korek M., Pershagen G., Eriksen KT., Sørensen M., Tjønneland A., Ellermann T., Eeftens M., Peeters PH., Meliefste K., Wang M., Bueno-de-Mesquita B., Key TJ., de Hoogh K., Concini H., Nagel G., Vilier A., Grioni S., Krogh V., Tsai MY., Ricceri F., Sacerdote C., Galassi C., Migliore E., Ranzi A., Cesaroni G., Badaloni C., Forastiere F., Tamayo I., Amiano P., Dorronsoro M., Trichopoulou A., Bamia C., Vineis P., Hoek G. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14(9):813-822.
- Rao R., Mellerio J., Bhogal BS., Groves R. (2012). Immunofluorescence antigen mapping for hereditary epidermolysis bullosa. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 78(6):692-697.
- Riojas-Rodríguez H., Álamo-Hernández U., Texcalac-Sangrador JL., Romieu I. (2014). Health impact assessment of decreases in PM10 and ozone concentrations in the Mexico City Metropolitan Area. A basis for a new air quality management program. *Salud Pública de México.* 56(6):579-591.
- Rohr AC., Wyzga RE. (2012). Attributing health effects to individual particulate matter

- constituents. *Atmos. Environ.* 62:130-152.
- Roninson IB. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* 179:1-14.
- Rosas PI., Serrano J., Alfaro-Moreno E., Baumgardner D., García-Cuellar C., Miranda J., Raga GB., Castillejos M., Drucker CR., Osornio VAR. (2007). Relations between PM10 composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. *Chemosphere* 67:1218-1228.
- Salcido-Neyoy ME., Sanchez-Perez Y., Osornio-Vargas AR., Gonsebatt ME., Melendez-Zajgla J., Morales-Barcenas R., Petrosyan P., Molina-Servin ED., Vega E., Manzano-Leon N., Garcia-Cuellar CM. (2015). Induction of c-Jun by air particulate matter (PM10) of Mexico City: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Pollut.* 203:175-182.
- Samet JM., Stonehuerner J., Reed W., Devlin RB., Dailey LA., Kennedy TP., Bromberg PA., Ghio AJ. (1997). Disruption of protein tyrosine phosphate homeostasis in bronchial epithelial cells exposed to oil fly ash. *Am. J. Physiol.* 272:L426-L432.
- Sánchez-Pérez Y., Chirino YI., Osornio-Vargas AR., Herrera LA., Morales-Bárcenas R., López-Saavedra A., González-Ramírez I., Miranda J., García-Cuellar CM. (2014). Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter PM10 exposure in lung cells. *Toxicol Lett.* 225(1):12-19.
- Sanchez-Pérez Y., Chirino YI., Osornio-Vargas AR., Morales-Bárcenas R., Gutiérrez-Ruiz C., Vázquez-López I., García-Cuellar CM. (2009). DNA damage response of A549 cell treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett.* 278:192-200.
- Santos-Burgoa C., Rojas-Bracho L., Rosas-Pérez I., Ramírez-Sánchez A., Sánchez-Rico G. y Hernández-Mejía S. (1995). Modelaje de exposición a partículas en población general y riesgo de enfermedad respiratoria. *Gac. Méd. Méx.* 134:407-417.
- Schilirò T., Alessandria L., Degan R., Traversi D., Gilli G. (2010). Chemical characterisation and cytotoxic effects in A549 cells of urban-air PM10 collected in Torino, Italy. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 29(2):150-157.
- Schreiner SJ., Schiavone AP., Smithgall TE. (2002). Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. *J. Biol. Chem.* 277(47):45680-45687.
- Sellers M. (2007). Dirty Air: An Ancient and Deadly Problem. In: *Epidemic Proportions. Johns Hopkins Undergraduate Public Health Journal* 4(1):19-20.
- Sevastyanova O., Novakova Z., Hanzalova K., Binkova B., Sram RJ., Topinka J., (2008). Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat. Res.* 649:179-186.
- Shackelford RE., Kaufmann WK., Paules RS. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28(9):1387-1404.
- Shang Y., Fan L., Feng J., Lv S., Wu M., Li B., Zang YS. (2013). Genotoxic and inflammatory effects of organic extracts from traffic-related particulate matter in

- human lung epithelial A549 cells: the role of quinones. *Toxicol. In Vitro*. 27(2):922-931.
- Shi T., Duffin R., Borm PJ., Li H., Weishaupt C., Schins RP. (2006). Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ. Res.* 101:18-24.
- SIMAT. (2015). Sistema de Monitoreo Atmosférico. Secretaría del Medio Ambiente, Gobierno del Distrito Federal. Monitoreo de Calidad del Aire/Normatividad. <http://www.aire.df.gob.mx/default.php?opc=%27ZaBhnml=&dc=%27Yw==>
- Smith PK., Krohn RI., Hermanson GT., Mallia AK., Gartner FH., Provenzano MD., Fujimoto EK., Goeke NM., Olson BJ., Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1):76-85.
- Soberanes S., Panduri V., Mutlu GM., Ghio A., Bundinger GR., Kamp DW. (2006). p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174:1229-1238.
- Spitzner M., Ebner, R., Wolff HA., Ghadimi BM., Wienands J., Grade M. (2014a). STAT3: A Novel Molecular Mediator of Resistance to Chemoradiotherapy. *Cancers*. 6:1986-2011.
- Spitzner M., Roesler B., Bielfeld C., Emons G., Gaedcke J., Wolff HA., Rave-Frank M., Kramer F., Beissbarth T., Kitz J., Wienands J., Ghadimi BM., Ebner, R., Ried, T., Grade, M. (2014b). STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer*. 134:997-1007.
- Steenhof M., Gosens I., Strak M., Godri KJ., Hoek G., Cassee FR., Mudway IS., Kelly FJ., Harrison RM., Lebret E., Brunekreef B., Janssen NA., Pieters RH. (2011). In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential-the RAPTES project. *Part. Fibre Toxicol.* 8:26.
- Timofeeva OA., Chasovskikh S., Lonskaya I., Tarasova NI., Khavrutskii L., Tarasov SG., Zhang X., Korostyshevskiy VR., Cheema A., Zhang L., Dakshanamurthy S., Brown ML., Dritschilo A. (2012). Mechanisms of unphosphorylated Stat3 transcription factor binding to DNA. *J. Biol. Chem.* 287:14192-14200.
- Tiwari S., Srivastava AK., Bisht DS., Bano T., Singh S., Behura S., Srivastava MK., Chate DM., Padmanabhamurty B. (2009). Black carbon and chemical characteristics of PM10 and PM2.5 at an urban site of North India. *J. Atmos. Chem.* 62:193-209.
- Topinka J., Schwarz LR., Wiebel FJ., Cerná M., Wolff T. (2000). Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat. Res.* 469(1):83-93.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(9):4350-4354.
- Upadhyay D., Panduri V., Ghio A., Kamp DW., (2003). Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:180-187.
- US-EPA. (1997). Exposure Factors Handbook. US. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/P-95/002F a-c.

- Valavanidis A., Fiotakis K., Vlachogianni T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health, part C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 26(4):339-362.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160(1):1-40.
- Vega E., Lowenthal D., Ruiz E., Reyes E., Watson JG., Chow JC., Viana M., Querol X., Alastuey A. (2009). Fine Particle Receptor Modeling in the Atmosphere of Mexico City. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 59(12):1417-1428.
- Vega E., Reyes E., Ruiz H., García J., Sánchez G., Martínez-Villa G., González U., Chow JC., Watson JG. (2004). Analysis of PM_{2.5} and PM₁₀ in the atmosphere of Mexico City during 2000-2002. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 54(7):786-798.
- Vega E., García I., Apam D., Ruíz ME., Barbiaux M. (1997). Application of a Chemical Mass Balance Receptor Model to Respirable Particulate Matter in Mexico City. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 47:524-529.
- Villalobos-Pietrini R., Blanco S., Gómez-Arroyo S. (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmos. Environ.* 29:517-524.
- Wang J., Hu Z., Chen Y., Chen Z., Xu S. (2013). Contamination characteristics and possible sources of PM₁₀ and PM_{2.5} in different functional areas of Shanghai, China. *Atmos. Environ.* 68:221-229.
- Wang X., Bi X., Sheng G., Fu J. (2006). Chemical composition and sources of pm₁₀ and PM_{2.5} Aerosols in Guangzhou, China. *Environ. Monitor. Assess.* 119:425-439.
- Watterson TL., Sorensen J., Martin R., Coulombe RA. (2007). Effects of PM_{2.5} collected from Cache Valley Utah on genes associated with the inflammatory response in human lung cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 70(20):1731-1744.
- WHO. (2014). World Health Organization. Ambient (outdoor) air quality and health. Fact sheet N°313. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>
- WHO. (2013). World Health Organization/ American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/news/world-health-organization-outdoor-air-pollution-causes-cancer>
- Xia W., Chen JS., Zhou X., Sun PR., Lee DF., Liao Y., Zhou BP., Hung MC. (2004). Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 10(11):3815-3824.
- Yu H., Lee H., Herrmann A., Buettner R., Jove R., (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* 14:736-746.
- Yu H., Pardoll D., Jove R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature.* 9:798-809.
- Zhang J., Ghio AJ., Gao M., Wei K., Rosen GD., Upadhyay D. (2007a). Ambient particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest: role of G1 cyclins. *FEBS Lett.* 581(27):5315-5320.
- Zhang X., Guo A., Yu J., Possemato A., Chen Y., Zheng W., Polakiewicz RD., Kinzler

- KW., Vogelstein B., Velculescu VE., Wang ZJ. (2007b). Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(10):4060-4064.
- Zhou M., He G., Liu Y., Yin P., Li Y., Kan H., Fan M., Xue A., Fan M. (2015). The associations between ambient air pollution and adult respiratory mortality in 32 major Chinese cities, 2006-2010. *Environ. Res.* 137:278-286.
- Zhou BP., Liao Y., Xia W., Spohn B., Lee MH., Hung MC. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3(3):245-252.



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Atmospheric particulate matter (PM₁₀) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKC ζ and Src kinases in lung cells[☆]



Elizabeth Reyes-Zárate^{b, c}, Yesennia Sánchez-Pérez^a, María Concepción Gutiérrez-Ruiz^c, Yolanda I. Chirino^d, Álvaro Román Osornio-Vargas^e, Rocío Morales-Bárceñas^a, Verónica Souza-Arroyo^{c, **, *}, Claudia María García-Cuellar^{a, *}

^a Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, San Fernando No. 22, Tlalpan, 14080, México DF, Mexico

^b Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

^c Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340, México DF, Mexico

^d Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, 54059, Estado de México, Mexico

^e Department of Pediatrics, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 1C9, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2016

Received in revised form

18 April 2016

Accepted 19 April 2016

Keywords:

Atmospheric particulate matter (PM₁₀)

STAT3

p21^{Waf1/Cip1}

Src kinase

PKC ζ kinase

ABSTRACT

Atmospheric particulate matter with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM₁₀) is a risk factor for the development of lung cancer, but cellular pathways are not completely understood. STAT3 is a p21^{Waf1/Cip1} transcription factor and is associated with proliferation and cell survival and is upregulated in lung cancer. PM₁₀ exposure induces p21^{Waf1/Cip1} expression, which could be related to STAT3 activation. The aims of this work were to investigate whether STAT3 was activated on lung epithelial cells after PM₁₀ exposure and to determine whether or not STAT3 could have an impact on cell cycle distribution and cell survival. Our results showed that PM₁₀ induced STAT3 activation through Src and PKC ζ kinases, and it is partially responsible for the p21^{Waf1/Cip1} induction that was also observed. Moreover, PM₁₀ induced G1-G0 cell cycle arrest. The inhibition of STAT3 phosphorylation prevented cell cycle arrest and triggered apoptosis. These results suggest that PM₁₀ exposure might activate a survival pathway related to STAT3 activation, similar to what has been described as part of the immune system and apoptosis evasion during tumor promotion and development.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Atmospheric particulate matter (PM) with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM₁₀) is considered a risk factor for the development of several diseases in human. PM₁₀ is derived from natural sources and anthropogenic activities (Ghio et al., 2012; Pöschl, 2005), and its composition represents a complex mixture of compounds, including transition metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and endotoxin (Alfaro-Moreno et al., 2002; Bonner et al., 1998; Callén et al., 2011; Harrison and Yin, 2000).

Epidemiologic studies have shown that PM₁₀ has a direct impact on human health due to its association with increased mortality rates and the development of cardiovascular and respiratory diseases, lung cancer, and other neoplasias (Englert, 2004; Pope and Dockery, 2006; Raaschou-Nielsen et al., 2013). Recently, the International Agency for Research on Cancer (IARC) declared that air pollution in general, and also particles present in polluted air, are carcinogenic, representing a risk factor for lung cancer development (Hamra et al., 2014; IARC, 2013; Loomis et al., 2013). However, the exact cellular and molecular mechanisms are not completely understood. Inflammation, oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity are among the potential mechanisms associated with PM₁₀ carcinogenic effects (Alfaro-Moreno et al., 2002; Chirino et al., 2010; Donaldson et al., 1996; García-Cuellar et al., 2002; Risom et al., 2005; Sanchez-Perez et al., 2009). We have previously reported that PM₁₀ exposure induces DNA damage with no alteration

[☆] This paper has been recommended for acceptance by David Carpenter.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: veso@xanum.uam.mx (V. Souza-Arroyo), claudia.garcia@salud.gob.mx, garcue57@gmail.com (C.M. García-Cuellar).

of the cell cycle in A549 lung epithelial cells (Sanchez-Perez et al., 2009), suggesting that the cell cycle progresses even in the presence of DNA damage. This brought our attention to the study of p21^{Waf1/Cip1}, which is a critical protein in the cell cycle arrest (G0–G1 phase) after DNA damage (Dutto et al., 2015), and we identified that p21^{Waf1/Cip1} is improperly activated in response to DNA damage after PM₁₀ exposure in A549 lung epithelial cells (Sanchez-Perez et al., 2014). However, the molecular mechanisms involved in the PM₁₀ induction of p21^{Waf1/Cip1} remained elusive.

Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is a protein that integrates numerous extracellular signals to regulate cell cycle-related genes such as p21^{Waf1/Cip1} (Hawthorne et al., 2009), and it is activated by reactive oxygen species (ROS) and inflammation (Cao et al., 2007; Duan and Simpson-Haidaris, 2006).

For instance, STAT3 is constitutively active, increasing proliferation, angiogenesis, and metastasis during the carcinogenic process (Levy and Darnell, 2002; Yu et al., 2009). In contrast, STAT3 inhibition reduces cell survival, invasion, and tumor growth (Bowman et al., 2000; Yu et al., 2009). STAT3 activation occurs by the initial phosphorylation of the tyrosine residue at position 705 (Y705). The epidermal growth factor receptor (EGFR) and Src, a non-receptor protein-tyrosine kinase, are some of the kinases involved in this initial STAT3 phosphorylation. After phosphorylated STAT3 in Y705 induces its dimerization with the subsequent nucleus translocation, (and to achieve maximum transcriptional activity), phosphorylation of serine 727 (S727) is also required. ERK1/2 Thr/Ser kinase (Aggarwal et al., 2009; Bowman et al., 2000) and, most recently identified, PKC ζ (Butler et al., 2013; Mattagajasingh et al., 2012) also participate in the STAT3-S727 phosphorylation. After optimal phosphorylation, STAT3 binds to the DNA of target genes, such as those related to the cell cycle, including p21^{Waf1/Cip1} (Bowman et al., 2000; Coqueret and Gascan, 2000; Hawthorne et al., 2009). The aims of this work were to investigate whether STAT3 was activated on lung epithelial cells after PM₁₀ exposure and to determine its impact on cell cycle distribution and cell survival. Based on the above information, we hypothesized that PM₁₀ exposure in lung epithelial cells induces STAT3 activation, which promotes alterations in the progression of the cell cycle and cell survival. In addition, because STAT3 activation is triggered by phosphorylation, we investigated the role of EGFR, Src kinase, ERK1/2, and PKC ζ kinase in STAT3 phosphorylation and as mediators of p21^{Waf1/Cip1} induction.

In this paper, we demonstrate that PM₁₀ exposure induces G0–G1 cell cycle arrest by promoting p21^{Waf1/Cip1} expression through STAT3 phosphorylation, which is responsible for preventing apoptosis in lung epithelial cells. The STAT3 phosphorylation was carried out by Src kinase and PKC ζ kinase participation in this event.

2. Materials and methods

2.1. PM₁₀ sampling method

PM₁₀ were collected on nitrocellulose filters with pore size 3 μ m using a high-volume sampler at a constant flow of 1.13 m³/min (GMW model 1200 VFC HVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA). Airborne particles were collected from a residential urban area with a strong influence from vehicular transit. Filters were kept at 4 °C in the dark inside a desiccator before particle removal, as previously described (Alfaro-Moreno et al., 2009; Chirino et al., 2015). Particles were stored in endotoxin-free glass containers under dark conditions at 4 °C until further use (Chirino et al., 2010; Sanchez-Perez et al., 2009), and the PM₁₀ composition was previously described (Chirino et al., 2015).

2.2. Cell culture

The human pulmonary epithelial carcinoma-derived A549 lung epithelial cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Cells were cultured on F12 Kaighn's medium (GIBCO Life Technologies, #21127-022) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO Life Technologies, #16000-044) at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. PM₁₀ exposure assays were performed on 80% cell confluence cultures exposed to various concentrations of PM₁₀ in FBS-free culture media.

2.3. Crystal violet assay

Crystal violet staining (Kueng et al., 1989) was used to assess the proportion of adherent cells after PM₁₀ exposure. Lung epithelial A549 cells were plated at 1 \times 10⁴ cells/well on 96-well plates. After reaching 80% confluence, cells were exposed to 5, 10, and 20 μ g/cm² of PM₁₀ for 24 h; unexposed cells were used as the control (Ct). After treatment, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with paraformaldehyde 4% (w/v) for 24 h at 4 °C. Subsequently, cells were incubated with 100 μ l of 0.1% (v/v) crystal violet dye for 10 min under gentle agitation. Plates were rinsed, dried, and then incubated with 50 μ l of 33% (v/v) acetic acid for 10 min to assess absorbance under a spectrophotometer (Tecan GENios Plus) at a wavelength of 570 nm. Results were expressed as the percentage of adherent cells compared to control treatment.

2.4. Experimental design for PM₁₀ exposure

A549 cells (7.5 \times 10⁵ cells/well) were seeded in 6-well plates and after reaching 80% confluence, we carried out a temporal evaluation (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h) of cell responses to a sub-lethal PM₁₀ concentration of 10 μ g/cm². In fact, a 10 μ g/cm² concentration could mimic a five day exposure of particles (Ferecatu et al., 2010; Li et al., 2003) and this concentration has been previously used for studies related to PM₁₀ *in vitro* exposure (Chirino et al., 2010; Ferecatu et al., 2010; Sanchez-Perez et al., 2014; Soberanes et al., 2006). To assess the role of the STAT3 pathway in the induction of p21^{Waf1/Cip1}, cell cultures were pre-incubated with various pharmacological inhibitors as follows: a) 10 μ M Src inhibitor SU6656 (Sigma Aldrich, S9692) was added 30 min before PM₁₀ exposure; b) 0.5 μ M PKC ζ inhibitor (Santa Cruz Biotechnology, sc-3098) was added 30 min before PM₁₀ exposure; and c) 40 μ M pSTAT3-Y705 inhibitor Stattic V (Calbiochem, 573099) was added 1 h before PM₁₀ exposure. The PM₁₀ exposure in cell cultures induced a fast response as a consequence of its internalization and some of the PM₁₀ components have immediate effects. For this reason, in this work, we selected pharmacological inhibitors that cause a rapid inhibition after, at least, 30 min of pre-treatment (Gayen et al., 2009; Spitzner et al., 2014b). The main concern for our experimental design is the fact that siRNA or another molecular silencing needs to be performed at least 24 h before the experiments (Liu et al., 2009), meaning that cell culture would have an entire cell cycle with a deficit in STAT3, which could overstate the effects of PM₁₀ exposure. All experiments were independently performed three times.

2.5. Protein isolation and western blot

After treatment, cells were rinsed three times with PBS and incubated with lysis buffer containing Tris 20 mM, NP-40 1% (v/v) and NaCl 150 mM, pH 8.0, supplemented with a protease inhibitor (Complete, Roche Applied Science, #11697498001) and a phosphatase inhibitor (PhosStop, Roche Applied Science,

#04906845001). Cell lysate suspensions were centrifuged at 15,000g for 5 min at 4 °C, and protein supernatant was stored at –80 °C until analysis. Protein quantification was determined by bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985). Thirty micrograms of protein were loaded into SDS-polyacrylamide gels (12%) and electrophoresed at 120 V for 1.5 h. Electrophoresed proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, 10600023) by a semi-dry transfer system (Bio-Rad) using 5% non-fat milk (w/v) in TBS-0.1% Tween-20 at room temperature for 1 h. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C on a shaker set at low speed with primary antibodies: anti-pSrc-Y418 (Invitrogen, #44660G), anti-Src (Invitrogen, #44656G), anti-pPKC ζ -T410 (Cell Signaling, #9378), anti-pPKC ζ (Cell Signaling, #9368), anti-pSTAT3-Y705 (Cell Signaling, #4113), anti-pSTAT3-S727 (Cell Signaling, #9134), anti-STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-483), anti-pEGFR-Y845 (Enzo Life Sciences, BML-SA344), anti-EGFR (Cell Signaling, #2232), anti-p21^{Waf1/Cip1} (Millipore, #05-345), anti-pERK1/2-T202 (Millipore, #05797), anti-ERK (Millipore, #06-182), and anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-32233). GAPDH was used as a loading control. The secondary antibodies used in this work were horseradish peroxidase-conjugated, anti-rabbit (Amersham, NA931V), and anti-mouse (Amersham, NA934V), which were added and incubated for 1 h at room temperature. Positive signal were detected by a chemiluminescent kit (Millipore, WBKLS0100) and visualized on a Gel Logic 1500 Imaging System. Densitometry analysis was determined by using Kodak Molecular Imaging software in at least three independent assays and it was calculated as the amount of phosphorylated protein normalized to the total content of each kinase.

2.6. Immunoprecipitation assay

Cell lysates (1 mg of protein) from cells exposed to PM₁₀ for 2 and 3 h were incubated with Preclearing Matrix A-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology, sc-45052) for 1 h at 4 °C and placed on a shaker at low-speed rotation and then subjected to centrifugation at 800g for 5 min at 4 °C. The supernatant was incubated overnight with anti-Src, anti-pPKC ζ antibodies, and Protein A/G Plus-Agarose bead (Santa Cruz Biotechnology, sc-2003) at 4 °C on a shaker set on low-speed rotation. We use a non-specific antibody as blank Normal Goat IgG Control (R&D systems, #Cat. AB-108C) for the IP assay. The immune complexes were collected and centrifuged at 800g for 5 min at 4 °C and then washed three times with lysis buffer under the same centrifugation conditions. The resulting pellet was electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels (12%) and proteins were transferred onto a PVDF membrane by using a semi-dry transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% of non-fat milk, TBS-0.1% Tween-20 at room temperature for 1 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C on a shaker set at low speed with pSTAT3-Y705 and pSTAT3-S727 primary antibodies. Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated, and visualization was performed as previously described in protein isolation and Western blot subsection.

2.7. Cell cycle and apoptosis assay

A549 cells (7.5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and after reaching 80% confluence, cells were pre-incubated with Stattic V 40 μ M 1 h before exposure to 10 μ g/cm² PM₁₀. After treatment, cell suspensions were obtained by mechanical dissociation in PBS containing 1 mM EDTA. Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining as reported before (Sanchez-Perez et al., 2014). Briefly, cells were collected and centrifuged at 1000g for 5 min and fixed with 70% ethanol at –20 °C. Samples were incubated with RNase A (30 μ g/ml DNase-

free) for 10 min at room temperature, and then samples were incubated with 80 μ l of propidium iodide (150 μ g/ml) for 15 min at 4 °C while protected from light. Cell cycle analysis was assessed by flow cytometry (BD FACS Canto II, USA) acquiring 20,000 events that were then analyzed by ModFit software. Apoptosis was evaluated by staining cells with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (Annexin-V-FLUOS Staining kit, Roche Applied Science), following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were collected and centrifuged at 200g for 5 min. Then cells were re-suspended in 100 μ l incubation buffer containing 2 μ l of Annexin-V-FLUOS and 2 μ l propidium iodide for 15 min at room temperature. Annexin-V binding was evaluated by flow cytometry (BD FACS Canto II, USA) acquiring 20,000 events and analyzed by FACSDiva software.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from three independent experiments and analyzed by GraphPad software using Prism Program version 5 by one-way analysis of variance followed by multiple comparisons according to Bonferroni. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Percentage of adherent cells was unaffected after PM₁₀ exposure

PM₁₀ exposure to 5, 10, and 20 μ g/cm² did not induce changes in the quantification of adherent cells (Table 1), and 10 μ g/cm² was selected as an intermediate concentration at which the percentage of cells is unaffected after treatment, which was also previously reported (Chirino et al., 2010; Ferecatu et al., 2010; Sanchez-Perez et al., 2009, 2014). In addition, previous studies have reported that a concentration of 10 μ g/cm² could mimic a five-day exposure to particles in humans (Ferecatu et al., 2010; Li et al., 2003).

3.2. PM₁₀ induced STAT3 phosphorylation at Y705 and S727

Time-course phosphorylation of STAT3 in Y705 (pSTAT3-Y705) showed that during the first hour of exposure to PM₁₀, the pSTAT3-Y705 had a pattern of protein dephosphorylation compared to the unexposed cells (Ct), and after 2 h of exposure, a phosphorylated pattern was shown with a 2.2-fold of increase in pSTAT3-Y705, which was maintained until 24 h of exposure to PM₁₀ (Fig. 1A; $p < 0.05$ vs. Ct).

On the other hand, STAT3 phosphorylation in S727 (pSTAT3-S727) remained at basal levels during the first 2 h of PM₁₀ exposure; however, its phosphorylation increased gradually from a 2-fold to a 2.3-fold increase after 3 h of PM₁₀ exposure and until 24 h (Fig. 1B; $p < 0.05$ vs. Ct of 3 h and $p < 0.001$ vs. Ct of 24 h vs. Ct, respectively).

Table 1
Quantification of lung epithelial A549 cells exposed to PM₁₀.

PM ₁₀ (μ g/cm ²)			
Ct	5	10	20
100	102.9 \pm 5.54	102.8 \pm 5.94	103.7 \pm 5.07

PM₁₀: Particulate matter with an aerodynamic diameter $\leq 10 \mu$ m. Control cells (Ct). The data represent the mean \pm SD. n = 3.

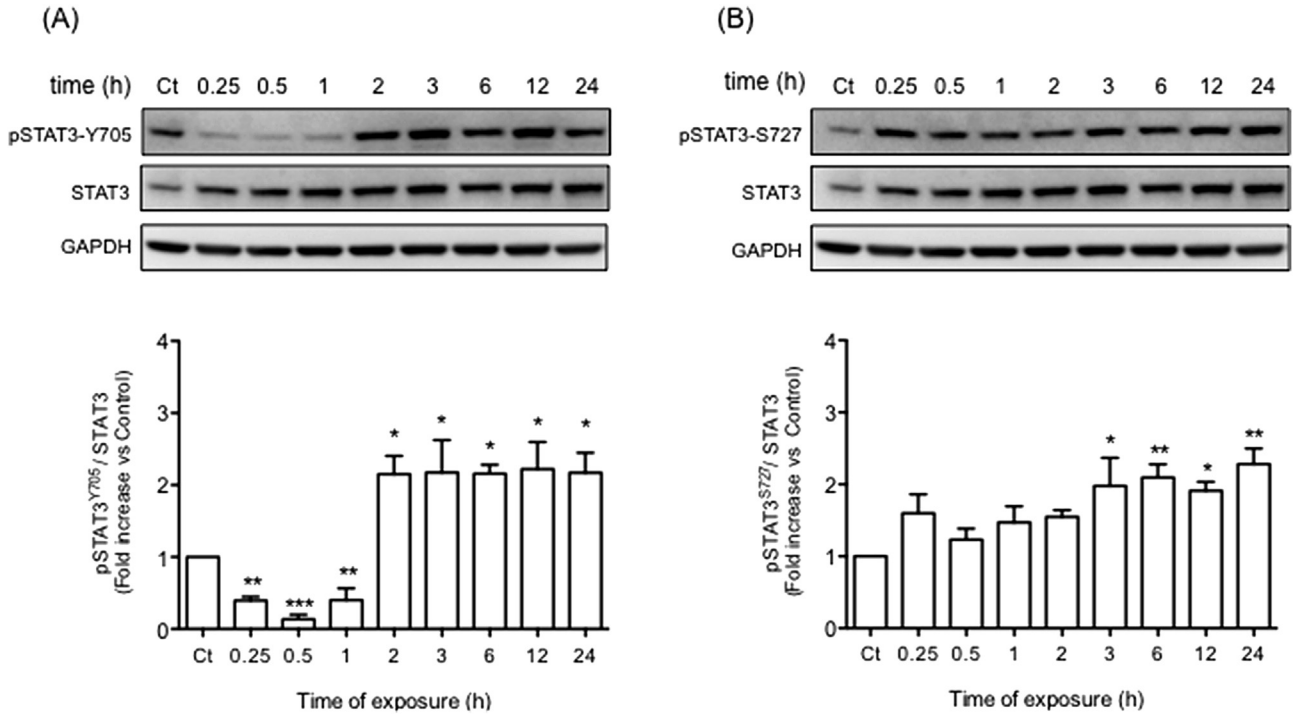


Fig. 1. Time course of STAT3-Y705 and STAT3-S727 phosphorylation induced by PM₁₀. The activation of STAT3 was evaluated in A549 cells following exposure to 10 μg/cm² PM₁₀ (particulate matter with aerodynamic diameter ≤ 10 μm) at different times: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h (A) pSTAT3-Y705 and (B) pSTAT3-S727. Representative Western blot (upper panels) and densitometric (bottom panels) analysis of expression. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. Ct: unexposed cells. *p < 0.05 vs. Ct, **p < 0.001 vs. Ct, ***p < 0.0001 vs. Ct.

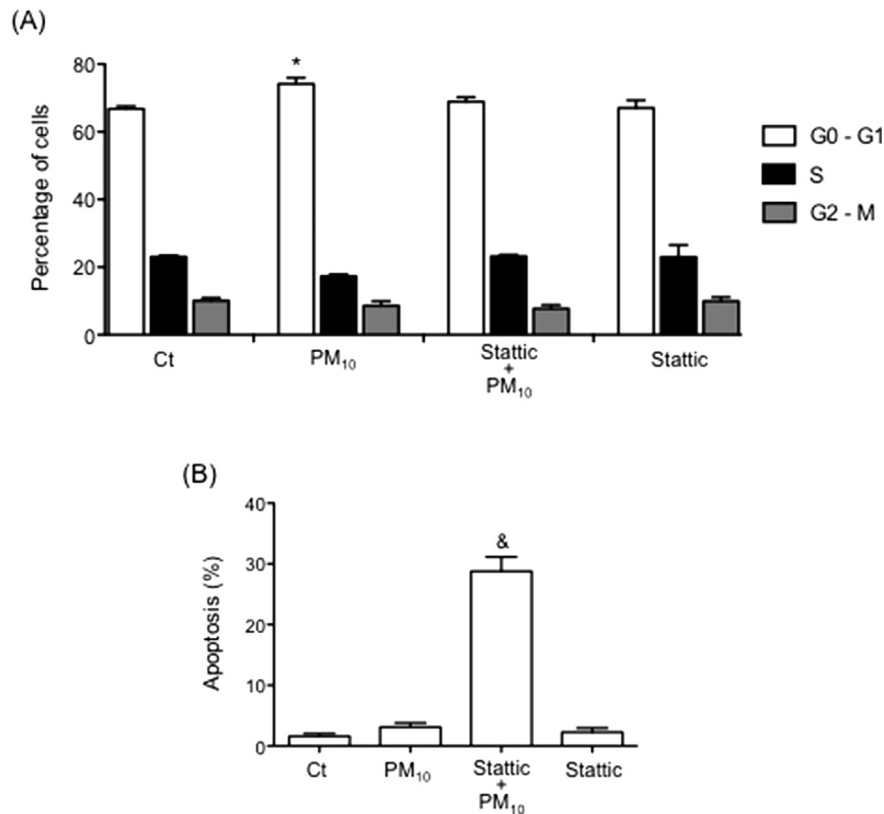


Fig. 2. Cell cycle distribution and apoptosis induced by PM₁₀. A549 cells were exposed to 10 μg/cm² of PM₁₀ (particulate matter with aerodynamic diameter ≤ 10 μm), with or without Stattic V inhibitor (Stattic 40 μM, 1 h pretreatment). (A) Cell cycle analysis was done using the propidium iodide assay, and (B) apoptosis was evaluated by annexin V staining; both were assessed by flow cytometry. The values represent the mean ± SD of three independent experiments. Ct: unexposed cells. *p < 0.05 vs. Ct; &p < 0.0001 vs. PM₁₀.

3.3. PM₁₀ induced G0-G1 cell cycle arrest and STAT3 prevented apoptosis

PM₁₀ exposure induced a 7.4% increase in the G0-G1 phase compared to unexposed cells (Fig. 2A; $p < 0.05$ vs. Ct). The inhibition of STAT3 phosphorylation led to a 28.8% increase in apoptosis (Fig. 2B; $p < 0.0001$ vs. Ct).

3.4. PM₁₀-induced Src mediates pSTAT3-Y705 levels

Levels of kinases associated with STAT3 phosphorylation after PM₁₀ exposure were analyzed, and we found that the phosphorylation of EGFR in Y845 (pEGFR-Y845), a transmembrane tyrosine kinase involved in STAT3 phosphorylation, was unmodified (Fig. 3A). Then, we assessed the activation of Src kinase and observed a 2-fold of increase in Src phosphorylation in Y418 residue (pSrc-Y418) compared to unexposed cells ($p < 0.05$) after 15 min of

PM₁₀ exposure. The phosphorylated state was maintained for the 24 h duration of the experiment (Fig. 3B; $p < 0.0001$ vs. Ct). In order to determine whether Src phosphorylates STAT3 in Y705, cell cultures were incubated for 2 h with Src inhibitor (SU6656, 10 μ M) before PM₁₀ exposure. Src kinase inhibition prevented the STAT3-Y705 phosphorylation induced by PM₁₀ exposure (Fig. 3C; $p < 0.0001$ vs. PM₁₀). The interaction between pSrc-Y418 and pSTAT3-Y705 proteins was detected after 2 h of PM₁₀ exposure (Fig. 3D), time which represents the significant increase in pSTAT3-Y705 phosphorylation after PM₁₀ exposure.

3.5. PM₁₀ induced ERK1/2 and PKC ζ , but PKC ζ mediates STAT3 phosphorylation at S727

Levels of kinases associated to STAT3 phosphorylation in S727 residue were evaluated after PM₁₀ exposure. After 0.25 h of exposure, PM₁₀ induced a rapid 3.8-fold increase in ERK1/2

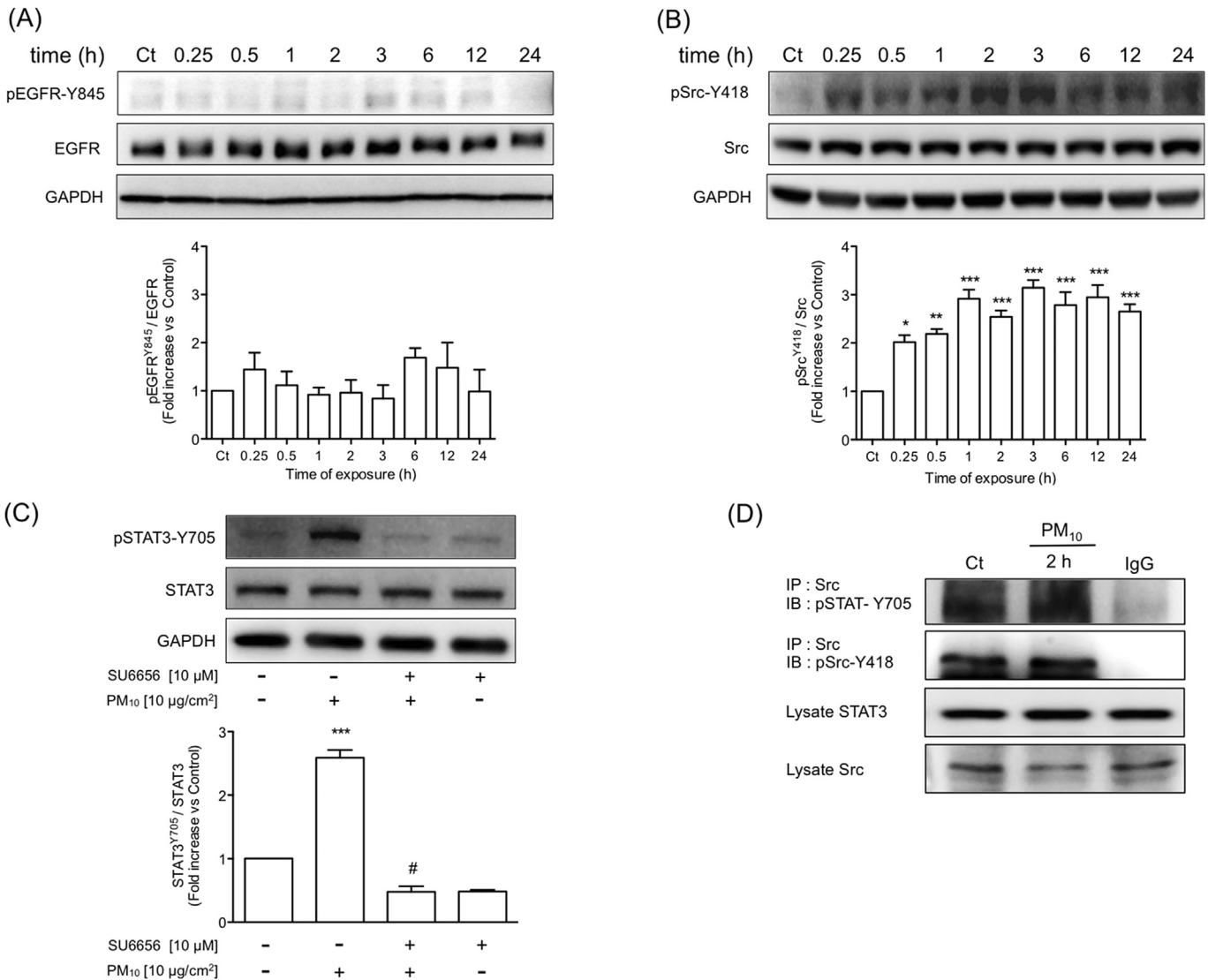


Fig. 3. EGFR and Src kinase roles for STAT3-Y705 phosphorylation by PM₁₀ exposure. Time course of (A) pEGFR-Y845 and (B) pSrc-Y418 phosphorylation after 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h of PM₁₀ (particulate matter with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu$ m) exposure (10 μ g/cm²) in A549 cells. Representative Western blot (upper panel) using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as loading control. Densitometric analysis is presented as mean \pm SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ vs. Ct, ** $p < 0.001$ vs. Ct, *** $p < 0.0001$ vs. Ct). (C) Effect of Src inhibition using SU6656 (10 μ M) 30 min before PM₁₀ exposure on pSTAT3-Y705 expression. Representative Western blot of pSTAT3-Y705 expression after Src inhibition using GAPDH as loading control and densitometric analysis is presented as mean \pm SD (*** $p < 0.0001$ vs. Ct, # $p < 0.0001$ vs. PM₁₀). (D) Interaction between Src and pSTAT3-Y705 detected by immunoprecipitation assay after 2 h of PM₁₀ exposure. Ct: unexposed cells; IP: Immunoprecipitation; IB: immunoblot.

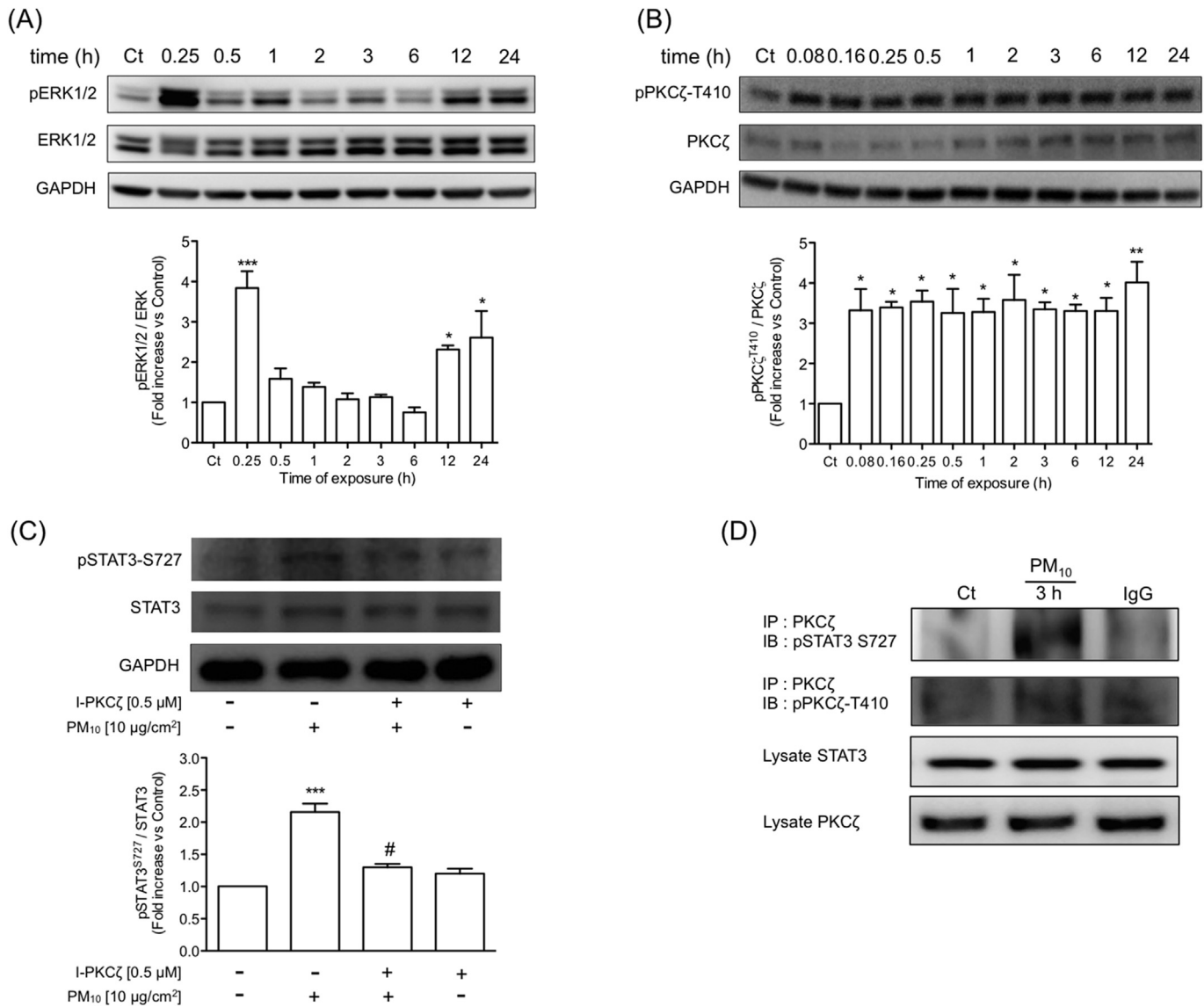


Fig. 4. Evaluation of STAT3-S727 phosphorylation induced by PM₁₀. Time course of (A) pERK1/2 expression after 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24 h, and (B) pPKCζ-T410 expression after 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h of PM₁₀ (particulate matter with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$) exposure (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in A549 cells. Representative Western blot using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as loading control and densitometric analysis presented as mean \pm SD (* $p < 0.05$ vs. Ct, ** $p < 0.001$ vs. Ct, *** $p < 0.0001$ vs. Ct). (C) Effect of inhibition of PKCζ on pSTAT3-S727 expression using PKCζ inhibitor (I-PKCζ, 0.5 μM) after 3 h of PM₁₀ (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) exposure. Cells were incubated for 30 min with I-PKCζ before PM₁₀ exposure. Data are represented as mean \pm SD of three independent experiments (*** $p < 0.0001$ vs. Ct, # $p < 0.0001$ vs. PM₁₀). (D) Representative interaction between PKCζ and pSTAT3-S727 detected by immunoprecipitation assay after 3 h of PM₁₀ exposure. Ct: unexposed cells; IP: Immunoprecipitation; IB: immunoblot.

phosphorylation at T202 (pERK1/2-T202, $p < 0.0001$ vs. Ct), which declined to basal levels after 0.5 h and was upregulated again after 12 h of PM₁₀ exposure and sustained for the duration of the 24 h exposure (Fig. 4A; $p < 0.05$ vs. Ct).

The role of PKCζ phosphorylation in T410 (pPKCζ-T410), a Thr/Ser kinase that phosphorylates STAT3 at S727, was evaluated. After 0.08 h of exposure, PM₁₀ induced a 3.3-fold activation (compared to Ct) of pPKCζ-T410 (Fig. 4B; $p < 0.05$ vs. Ct) that was maintained for the duration of the 24 h of exposure to PM₁₀ (Fig. 4B; $p < 0.001$ vs. Ct). The inhibition of PKCζ with 0.5 μM of PKCζ inhibitor induced a significant decrease in the phosphorylation of pSTAT3-S727 (Fig. 4C; $p < 0.0001$ vs. PM₁₀). We showed the interaction between PKCζ and pSTAT3-S727 with immunoprecipitation assay at 3 h of PM₁₀ exposure (Fig. 4D), which represents the increase in pSTAT3 phosphorylation in S727 residue after PM₁₀ exposure.

3.6. PM₁₀ induced an increase in p21^{Waf1/Cip1} expression mediated by STAT3 phosphorylation through of PKCζ and Src kinases

Expression p21^{Waf1/Cip1} was evaluated after exposure to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM₁₀ for 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h. The expression increased had a 2-fold increase after 6 h (Fig. 5A; $p < 0.05$ vs. Ct), and this upregulation was maintained until 24 h (Fig. 5A; $p < 0.001$ vs. Ct). On the other hand, in this work we confirm that the PM₁₀ induce cytoplasmic retention of p21^{Waf1/Cip1} at 24 h (Sanchez-Perez et al., 2014). In addition we found since 6 h occurs this event and Static prevent this retention (Fig. 1SA and 1SB; Supplementary Material).

To determine whether activation of pSTAT3-Y705 induced by PM₁₀ had an influence on p21^{Waf1/Cip1}, pSTAT3-Y705 was repressed by Stattic V inhibitor, which showed a downregulation of p21^{Waf1/Cip1} expression (Fig. 5B; $p < 0.05$ vs. PM₁₀). Then, Src kinase, which

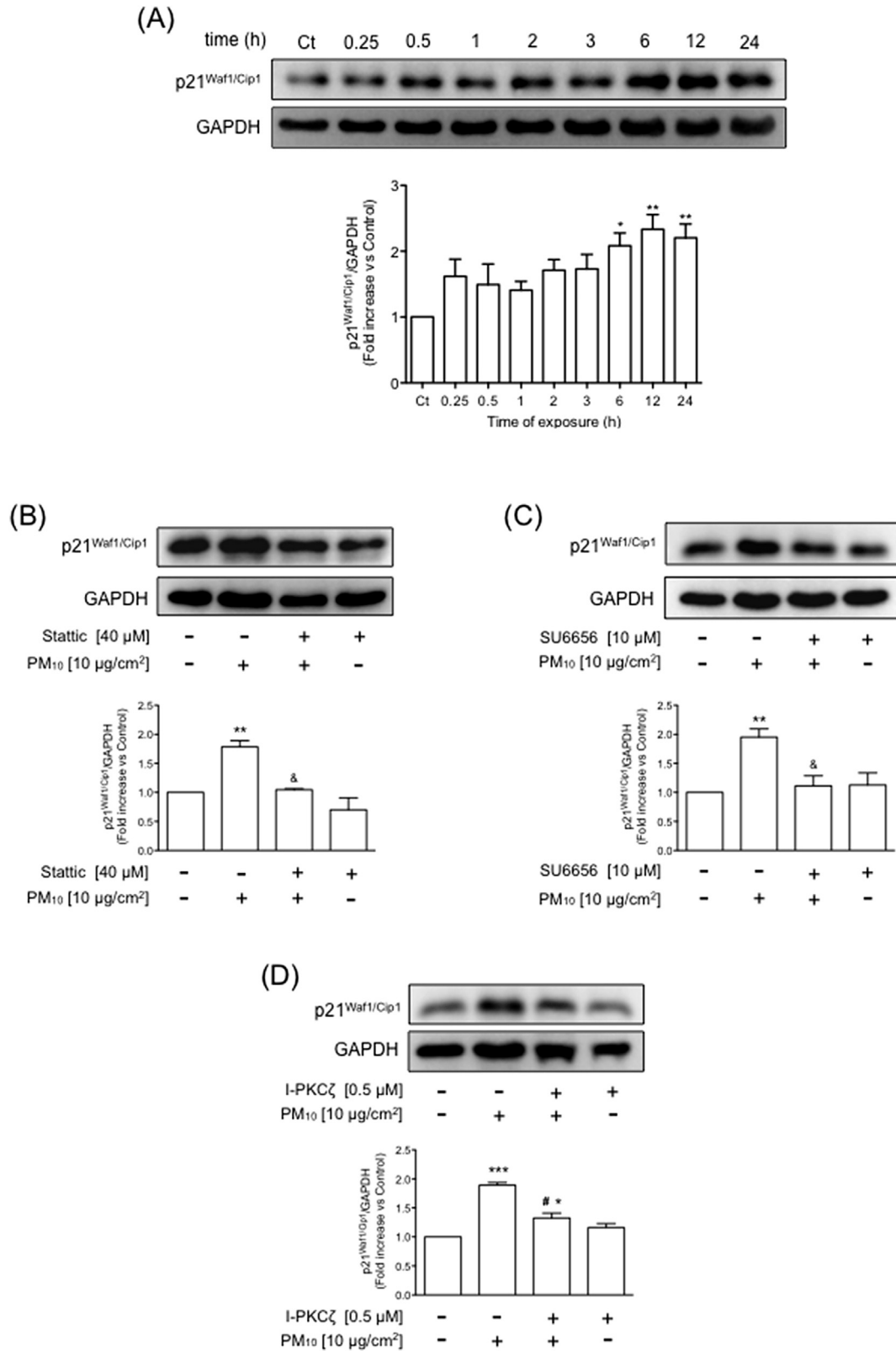


Fig. 5. Evaluation of p21^{Waf1/Cip1} expression mediated by STAT3 phosphorylation. (A) Time course of p21^{Waf1/Cip1} expression after 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h of PM₁₀ (particulate matter with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$) exposure ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) in A549 cells. Representative Western blot using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as loading control (* $p < 0.05$ vs. Ct, ** $p < 0.001$ vs. Ct). Effect of (B) STAT3 inhibition, (C) Src inhibition, and (D) PKC ζ inhibition on p21^{Waf1/Cip1} expression after PM₁₀ exposure for 24 h in A549 cells. STAT3 was inhibited by Stattic V (Stattic 40 μM , 1 h before exposure); Src kinase was inhibited by SU6656 (10 μM , 30 min before exposure), and the PKC ζ inhibition with PKC ζ inhibitor (I-PKC ζ 0.5 μM , 30 min before exposure). The values represent the mean \pm SD of three independent experiments. Ct: unexposed cells. * $p < 0.05$ vs. Ct, ** $p < 0.001$ vs. Ct, *** $p < 0.0001$ vs. Ct, & $p < 0.05$ vs. PM₁₀, # $p < 0.0001$ vs. PM₁₀.

is also involved in STAT3-Y705 phosphorylation, was inhibited by SU6656, a selective Src family kinase inhibitor, and p21^{Waf1/Cip1} expression induced by PM₁₀ was decreased (Fig. 5C; $p < 0.05$ vs. PM₁₀). In addition, PKC ζ inhibitor prevented PKC ζ kinase activity, which is responsible for pSTAT3-S727 phosphorylation, and the induction of p21^{Waf1/Cip1} expression associated with PM₁₀ exposure was prevented (Fig. 5D; $p < 0.0001$ vs. PM₁₀).

4. Discussion

Particulate matter is considered a carcinogenic material for humans, according to the International Agency for Research in Cancer (IARC, 2013; Loomis et al., 2013) and is considered a risk factor for the development of lung cancer and other malignancies in humans. The carcinogenic process induced by PM₁₀ exposure is not completely understood yet, but *in vitro* evidence suggests that concentrations between 10 and 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ have no impact on cell viability (Alfaro-Moreno et al., 2009; Sanchez-Perez et al., 2009) although those concentrations induce DNA damage (Sevastyanova et al., 2008; Soberanes et al., 2006; Topinka et al., 2000) and oxidative stress (Chirino et al., 2010; Li et al., 1996; MacNee and Donaldson, 2003; Prahalad et al., 2001).

On the other hand, a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM₁₀, which was used in this study, can be compared to five-day human PM₁₀ exposure (Ferecatu et al., 2010; Li et al., 2003), which feasibly suggests that exposed humans might develop some alterations without evident toxicity. The intriguing finding that PM₁₀ induces *in vitro* DNA damage with no cytotoxicity, alterations in cell cycle progression, or apoptosis, need to be addressed to clarify whether PM₁₀ modulates these responses in exposed cells, as they are key processes so their alteration lead to an abnormal phenotype. Among important signaling pathways, p21^{Waf1/Cip1} is a key protein in cell cycle arrest modulation after DNA damage (Dutto et al., 2015), and it is upregulated in several tumors (Hawthorne et al., 2009; Roninson, 2002). We have demonstrated that PM₁₀ induced overexpression of p21^{Waf1/Cip1} (Sanchez-Perez et al., 2014); however, the mechanism involved in p21^{Waf1/Cip1} PM-related induction is unknown. STAT3 is a transcription factor of p21^{Waf1/Cip1} (Bowman et al., 2000; Cao et al., 2010; Coqueret and Gascan, 2000; Hawthorne et al., 2009), and we found that STAT3 phosphorylation at Y705 and S727 was involved in the p21^{Waf1/Cip1} induction by PM₁₀ exposure in lung cells, as well as the cytoplasmic stabilization (supplementary material). These results suggest that the cells exposed to PM₁₀ had DNA damage, which was associated with cell cycle G0–G1 arrest. In addition, STAT3 activation could prevent apoptosis and this event conferred cell survival, as it has been reported (Bowman et al., 2000; Spitzner et al., 2014; Yu et al., 2009).

In this study, we report that PM₁₀ exposure induced an increase of G0–G1 cell cycle arrest, and we did not previously find this G0–G1 accumulation (Sanchez-Perez et al., 2014). However, the PM₁₀ used in the current study were collected in posteriors years. Since the effects of PM₁₀ are directly attributed to its composition, we suggest that the PM₁₀ used in this work are able to induce a slight—but statistically different—increase in G0–G1 accumulation. Indeed, the composition of PM₁₀ collected from every year become different since it is derived from the varying anthropogenic activities of each city. For example, PM₁₀ collected from different cities in Korea showed higher contents of metals over 22 years (Kim et al., 2016). Similarly, in PM₁₀ collected from Mexico City in 2006 and 2009 were seen to have a gain in metals such as Fe and Cu (Guerra et al., 2013; Mugica et al., 2009).

In addition, the chemical PM composition has impact on the cellular effects as has been previously demonstrated in the study conducted by Steenhof and colleagues in the Netherlands, in which PM₁₀ sampled from a “stop and go traffic” had low content of

metals such as copper, iron, nickel, vanadium and zinc and also lower levels of PAH compared with PM₁₀ sampled from an “underground train station”. Precisely, the amount of copper, iron, nickel, vanadium and zinc of the underground train station was 90, 19, 5, 2, and 240 times higher, respectively, compared with stop and go traffic samples. The amount of PAH was 4.5 times higher in samples collected from the underground train station compared with stop and go traffic. Then, PM₁₀ sampled from the “stop and go traffic” had no effect on the cell viability of macrophages when cells were exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ while underground train station PM₁₀ decreased this measurement under same concentration exposure (Steenhof et al., 2011). The release of TNF- α , IL-6 and MIP-2 was higher in macrophages exposed to PM derived from underground train station than macrophages exposed to stop and go traffic, suggesting a higher pro-inflammatory potential.

STAT3 phosphorylation can occur by EGFR, however, we determined that EGFR is not involved in the pathway activated after PM₁₀ exposure. We explored EGFR phosphorylation because isolated diesel exhaust particles (DEPs) induce STAT3 activation through EGFR (Cao et al., 2007). Although PM₁₀ contains DEPs (Kafoury and Kelley, 2005), but our findings suggest that the amount of DEPs contained in PM₁₀ is not sufficient to induce EGFR phosphorylation.

We found phosphorylated Src kinase in the early stages after PM₁₀ exposure and a complete reversion of pSTAT3-Y705 induction when Src kinase phosphorylation was inhibited, suggesting that this kinase is responsible for STAT3 phosphorylation induced after PM₁₀ exposure. On the other hand, the inhibition of pSTAT3-Y705 that we observed in the first hour of exposure might be associated with the activation of phosphatases, such as protein tyrosine phosphatase receptor T (PTPRT), also known as PTP ρ , and SH2 domain-containing phosphatase1 (SHP1) and 2 (SHP2), respectively (He et al., 2014; Zhang et al., 2007). We also found a differential response of pERK1/2, which is rapidly activated after PM₁₀ exposure and repressed after 12 h of exposure to be induced again. ERK1/2 dephosphorylation could be associated with PP2A threonine/serine phosphatase activity (Kawahara et al., 2013), but this rapid burst followed by lower activity has previously been described for ERK1/2 (Meloche and Pouyssegur, 2007). The decreased and increased phosphorylation induced by PM₁₀ exposure in pSTAT-Y705 and pERK1/2 could suggest that phosphatases might be activated as an immediate response against PM₁₀ damage and then later inhibited. In this regard, some metals, such as vanadium or cadmium, inhibit tyrosine and serine/threonine phosphatase (Pan et al., 2013; Samet et al., 1997), and those metals are contained in PM₁₀ (Englert, 2004; Guastadisegni et al., 2010; Manzano-León et al., 2013).

On the other hand, PKC ζ is also rapidly activated but sustained after 5 min and after 24 h of exposure. The immediate activation of PKC ζ could have an important impact on cells exposed to PM₁₀, because this kinase modulates inflammation and survival pathway, differentiation, development, and tumor progression, and it is activated by several cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF α) and free radicals (Diaz-Meco and Moscat, 2012; Lerner-Marmarosh et al., 2007). In this regard, inflammation is a well-demonstrated biological response induced by PM₁₀ (Alfaro-Moreno et al., 2009; Andreau et al., 2012; Li et al., 1996; Manzano-León et al., 2013; Pope and Dockery, 2006; Salcido-Neyoy et al., 2015), which could explain, at least in part, PKC ζ activation.

In this study we demonstrate some effects associated to short-term exposure, however, long-term exposure under non-cytotoxic conditions would be helpful to analyze the impact of PM₁₀ on the DNA damage. In this regard, a clonogenic assay can be used to evaluate the capability of exposed cells to undergo unlimited cell

division (Franken et al., 2006).

It is important to mention that even if lung epithelial A549 cells are well-accepted for toxicological PM₁₀ studies (Alessandria et al., 2014; Foster et al., 1998; Gualtieri et al., 2010; Soberanes et al., 2006; Upadhyay et al., 2003), they have a limitation since they are a hypotriploid cell line, which is different from normal human lung epithelial cells. In this regard, epithelial cells derived from normal human bronchial epithelium as BEAS-2B could also help to design further analyses.

In summary, in this study we found that p21^{Waf1/Cip1} expression and cytoplasmic retention is induced by PM₁₀ exposure in lung epithelial cells, and this upregulation could suggest DNA damage (Dutto et al., 2015), which indeed has been previously demonstrated after sublethal PM₁₀ exposure (Sanchez-Perez et al., 2014). STAT3 is a transcription factor that regulates the activity of p21^{Waf1/Cip1} (Coqueret and Gascan, 2000; Hawthorne et al., 2009) and is associated with the inflammatory process and tumor development (Yu et al., 2009, 2014). STAT3, Src, and PKC ζ kinases are partially responsible for p21^{Waf1/Cip1} induction, as we demonstrated by its respective inhibitors (Fig. 6 summarizes these events).

In conclusion, PM₁₀ induces phosphorylation of STAT3 at Y705 and S727 through Src and PKC ζ , respectively; this event is related to an increased p21^{Waf1/Cip1} expression level, inducing G0-G1 cell cycle arrest and preventing apoptosis. PM₁₀ is considered as an air pollutant that plays an important role in diverse health effects, and diverse epidemiological studies have demonstrated that exposure to particulate matter increases the risk of lung cancer. Due to STAT3

activation contributing to cancer progression, the results of our study warn that STAT3 signaling pathways induced by PM₁₀ exposure in lung epithelial cells leads to cell survival, and its activation could be a pathway that contributes to the cancer risk factor associated with PM₁₀ exposure.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements

This research is the result of a research project by M. Sc. Silvia Elizabeth Reyes-Zárate to obtain a Ph.D. degree in Experimental Biology at the Autonomous Metropolitan University. The authors express their gratitude to Raul Quintana, participants of the field campaign of particulate matter in Mexico City. This work received support from SEP-CONACYT CB-2011-180471; SEP-CONACYT CB-2011-166042; and a Doctoral Scholarship from CONACYT (CVU 59551).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.072>.

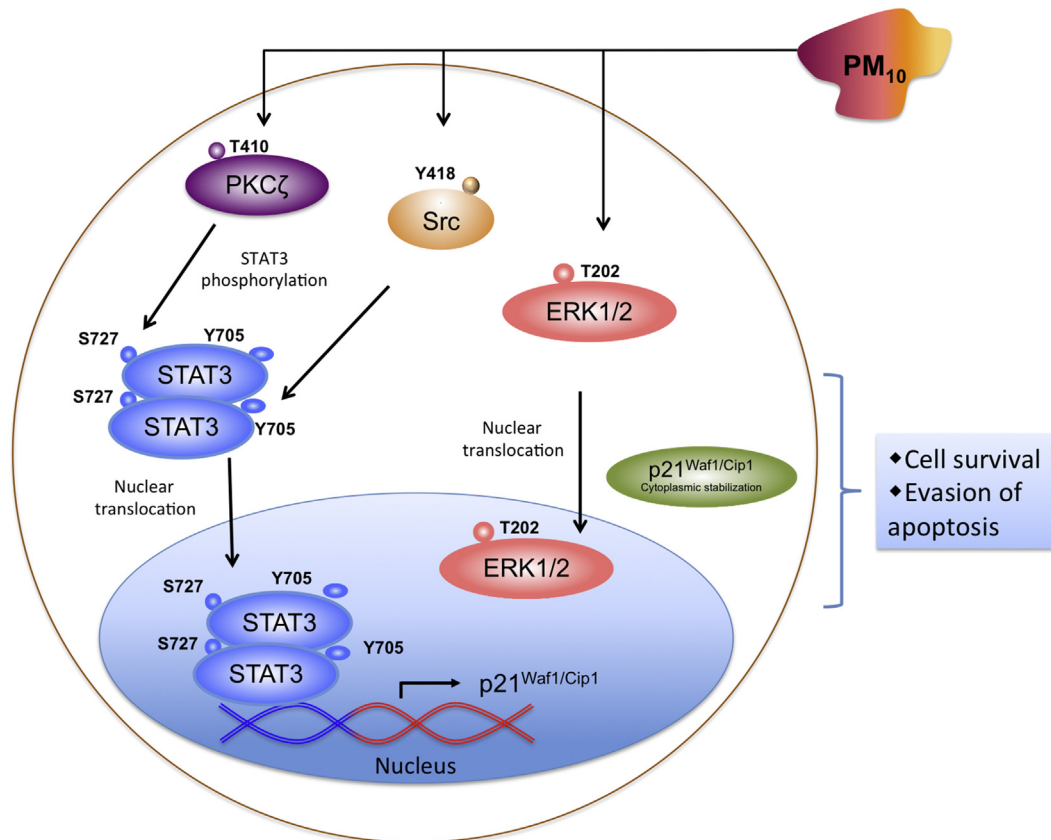


Fig. 6. Signaling pathway mechanism proposed leading to STAT3 phosphorylation induced by PM₁₀ (particulate matter with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$) exposure in lung epithelial cells. We found that the induction of p21^{Waf1/Cip1} caused cell cycle arrest. The p21^{Waf1/Cip1} upregulation is conducted through STAT3 activation mediated by Src and PKC ζ kinases. PM₁₀-exposure induced phosphorylation of Src (Y418) and PKC ζ (T410) kinases, which in turn phosphorylate specific sites for STAT3 activation in Y705 and S727, respectively. ERK1/2 kinase was induced by PM₁₀, however, it is not involved in STAT3 phosphorylation at S727 residue. We show that STAT3 phosphorylation prevented apoptosis and conferred cell survival as we demonstrated through inhibition of STAT3 phosphorylation.

References

- Aggarwal, B.B., Kunnumakka, A.B., Harikumar, K.B., Gupta, S.R., Tharakan, S.T., Koca, C., Dey, S., Sung, B., 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171, 59–76.
- Alessandria, L., Schiliro, T., Degan, R., Traversi, D., Gilli, G., 2014. Cytotoxic response in human lung epithelial cells and ion characteristics of urban-air particles from Torino, a northern Italian city. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 5554–5564.
- Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Bonner, J.C., Murray, J.C., Rosas, I., Rosales, S.P., Osornio-Vargas, A.R., 2002. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ. Health Perspect.* 110, 715–720.
- Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martínez, L., García-Cuellar, C., Nawrot, T.S., Vanaudenaerde, B., Hoet, P., Ramírez-López, P., Rosas, I., Nemery, B., Osornio-Vargas, A.R., 2009. Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ. Res.* 109, 528–535.
- Andreau, K., Leroux, M., Bouharrou, A., 2012. Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity. *Biochem. Res. Int.* 2012, 493894.
- Bonner, J.C., Rice, A.B., Lindroos, P.M., O'Brien, P.O., Dreher, K.L., Rosas, I., Alfaro-Moreno, E., Osornio-Vargas, A.R., 1998. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 672–680.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R., 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474–2488.
- Butler, A.M., Scotti Buzhardt, M.L., Li, S., Smith, K.E., Fields, A.P., Murray, N.R., 2013. Protein kinase C zeta regulates human pancreatic cancer cell transformed growth and invasion through a STAT3-dependent mechanism. *PLoS One* 8, e72061.
- Callén, M.S., de la Cruz, M.T., López, J.M., Mastral, A.M., 2011. PAH in airborne particulate matter: carcinogenic character of PM10 samples and assessment of the energy generation impact. *Fuel Process* 92, 176–182.
- Cao, D., Bromberg, P.A., Samet, J.M., 2010. Diesel particle-induced transcriptional expression of p21 involves activation of EGFR, Src, and Stat3. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 88–95.
- Cao, D., Tal, T.L., Graves, L.M., Gilmour, I., Linak, W., Reed, W., Bromberg, P.A., Samet, J.M., 2007. Diesel exhaust particulate-induced activation of Stat3 requires activities of EGFR and Src in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292, L422–L429.
- Chirino, Y.I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Segura-García, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., García-Cuellar, C.M., 2010. PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol. Lett.* 193, 209–216.
- Chirino, Y.I., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Rosas, I., García-Cuellar, C.M., 2015. Sampling and composition of airborne particulate matter (PM10) from two locations of Mexico City. *Data Brief* 4, 353–356.
- Coqueret, O., Gascan, H., 2000. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J. Biol. Chem.* 275, 18794–18800.
- Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., 2012. The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond. *Immunol. Rev.* 246, 154–167.
- Donaldson, K., Beswick, P.H., Gilmour, P.S., 1996. Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol. Lett.* 88, 293–298.
- Duan, H.O., Simpson-Haidaris, P.J., 2006. Cell type-specific differential induction of the human gamma-fibrinogen promoter by interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 281, 12451–12457.
- Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., Stivala, L.A., Prosperi, E., 2015. Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch. Toxicol.* 89, 155–178.
- Englert, N., 2004. Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicol. Lett.* 149, 235–242.
- Ferecatu, I., Borot, M.C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Andreau, K., 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. *Part Fibre Toxicol.* 7, 18.
- Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L., Audus, K.L., 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp. Cell Res.* 243, 359–366.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stop, J., Haveman, J., van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 1, 2315–2319.
- García-Cuellar, C., Alfaro-Moreno, E., Martínez-Romero, F., Ponce de León, R.S., Rosas, I., Pérez, C.E., Osornio-Vargas, A.R., 2002. DNA damage induced by PM10 from different zones of Mexico City. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 425–428.
- Gayen, J.R., Saberi, M., Schenk, S., Biswas, N., Vaingankar, S.M., Cheung, W.W., Najjar, S.M., O'Connor, D.T., Bandyopadhyay, G., Mahata, S.K., 2009. A novel pathway of insulin sensitivity in chromogranin A null mice: a crucial role for pancreastatin in glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 284, 28498–28509.
- Ghio, A.J., Carraway, M.S., Madden, M.C., 2012. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 1–21.
- Gualtieri, M., Ovrevik, J., Holme, J.A., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Schwarze, P.E., Camatini, M., 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol. In Vitro* 24, 29–39.
- Guastadisegni, C., Kelly, F.J., Cassee, F.R., Gerlofs-Nijland, M.E., Janssen, N.A., Pozzi, R., Brunekreef, B., Sandstrom, T., Mudway, I., 2010. Determinants of the proinflammatory action of ambient particulate matter in immortalized murine macrophages. *Environ. Health Perspect.* 118, 1728–1734.
- Guerra, R., Vera-Aguilar, E., Uribe-Ramirez, M., Gookin, G., Camacho, J., Osornio-Vargas, A.R., Mugica-Alvarez, V., Angulo-Olais, R., Campbell, A., Froines, J., Kleinman, T.M., De Vizcaya-Ruiz, A., 2013. Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum. *Toxicol. Lett.* 222, 146–154.
- Hamra, G.B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J.M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D., 2014. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 122, 906–911.
- Harrison, R.M., Yin, J., 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci. Total Environ.* 249, 85–101.
- Hawthorne, V.S., Huang, W.C., Neal, C.L., Tseng, L.M., Hung, M.C., Yu, D., 2009. ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 7, 592–600.
- He, R.J., Yu, Z.H., Zhang, R.Y., Zhang, Z.Y., 2014. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 1227–1246.
- IARC, 2013. In: Straif, Kurt, Cohen, Aaron, Samet, Jonathan (Eds.), *Air Pollution and Cancer. International Agency for Research on Cancer. Scientific Publication No. 161*. <http://www.iarc.fr/en/publications/books/sp161/index.php>.
- Kafoury, R.M., Kelley, J., 2005. Ozone enhances diesel exhaust particles (DEP)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression in human airway epithelial cells through activation of nuclear factors- kappaB (NF-kappaB) and IL-6 (NF-IL6). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 403–410.
- Kawahara, E., Maenaka, S., Shimada, E., Nishimura, Y., Sakurai, H., 2013. Dynamic regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by protein phosphatase 2A regulatory subunit B56gamma1 in nuclei induces cell migration. *PLoS One* 8, e63729.
- Kim, K.H., Hong, Y.J., Szulejko, J.E., Kang, C.H., Chambers, S., Feng, X., Deep, A., Kim, Y.H., 2016. Airborne iron across major urban centers in South Korea between 1991 and 2012. *Sci. Total Environ.* 550, 309–320.
- Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 182, 16–19.
- Lerner-Marmarosh, N., Miralem, T., Gibbs, P.E., Maines, M.D., 2007. Regulation of TNF-alpha-activated PKC-zeta signaling by the human biliverdin reductase: identification of activating and inhibitory domains of the reductase. *FASEB J.* 21, 3949–3962.
- Levy, D.E., Darnell, J.E.J., 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–662.
- Li, N., Hao, M., Phalen, R.F., Hinds, W.C., Nel, A.E., 2003. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin. Immunol.* 109, 250–265.
- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K., MacNee, W., 1996. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax* 51, 1216–1222.
- Liu, Y., Wang, B., Wang, J., Wan, W., Sun, R., Zhao, Y., Zhang, N., 2009. Down-regulation of PKCzeta expression inhibits chemotaxis signal transduction in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 63, 210–218.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14, 1262–1263.
- MacNee, W., Donaldson, K., 2003. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur. Respir. J. Suppl.* 40, 47s–51s.
- Manzano-León, N., Quintana, R., Sánchez, B., Serrano, J., Vega, E., Vázquez-López, I., Rojas-Bracho, L., López-Villegas, T., O'Neill, M.S., Vadillo-Ortega, F., De Vizcaya-Ruiz, A., Rosas, I., Osornio-Vargas, A.R., 2013. Variation in the composition and in vitro proinflammatory effect of urban particulate matter from different sites. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 27, 87–97.
- Mattagajasingh, S.N., Yang, X.P., Irani, K., Mattagajasingh, I., Becker, L.C., 2012. Activation of Stat3 in endothelial cells following hypoxia-reoxygenation is mediated by Rac1 and protein Kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 997–1006.
- Meloche, S., Pouyssegur, J., 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227–3239.
- Mugica, V., Ortiz, E., Molina, L., De Vizcaya-Ruiz, A., Nebot, A., Quintana, R., Aguilar, J., Alcántara, E., 2009. PM composition and source reconciliation in Mexico City. *Atmos. Environ.* 43, 5068–5074.
- Pan, C., Liu, H.D., Gong, Z., Yu, X., Hou, X.B., Xie, D.D., Zhu, X.B., Li, H.W., Tang, J.Y., Xu, Y.F., Yu, J.Q., Zhang, L.Y., Fang, H., Xiao, K.H., Chen, Y.G., Wang, J.Y., Pang, Q., Chen, W., Sun, J.P., 2013. Cadmium is a potent inhibitor of PPM phosphatases and targets the M1 binding site. *Sci. Rep.* 3, 2333.
- Pope, C.A., Dockery, D.W., 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 56, 709–742.
- Pöschl, U., 2005. Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 7520–7540.

- Prahalad, A.K., Inmon, J., Dailey, L.A., Madden, M.C., Ghio, A.J., Gallagher, J.E., 2001. Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 879–887.
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M.J., Brunekreef, B., Xun, W.W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Sommar, J., Forsberg, B., Modig, L., Oudin, A., Oftedal, B., Schwarze, P.E., Nafstad, P., De Faire, U., Pedersen, N.L., Ostenson, C.G., Fratiglioni, L., Penell, J., Korek, M., Pershagen, G., Eriksen, K.T., Sorensen, M., Tjønneland, A., Ellermann, T., Eeftens, M., Peeters, P.H., Meliefste, K., Wang, M., Bueno-de-Mesquita, B., Key, T.J., de Hoogh, K., Concin, H., Nagel, G., Vilier, A., Grioni, S., Krogh, V., Tsai, M.Y., Ricceri, F., Sacerdote, C., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Tamayo, I., Amiano, P., Dorronsoro, M., Trichopoulos, A., Bamia, C., Vineis, P., Hoek, G., 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European study of cohorts for air pollution effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14, 813–822.
- Risom, L., Moller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* 592, 119–137.
- Roninson, I.B., 2002. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sd1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* 179, 1–14.
- Salcido-Neyoy, M.E., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsebatt, M.E., Melendez-Zajgla, J., Morales-Barcenas, R., Petrosyan, P., Molina-Servin, E.D., Vega, E., Manzano-Leon, N., Garcia-Cuellar, C.M., 2015. Induction of c-jun by air particulate matter (PM10) of Mexico city: participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Pollut.* 203, 175–182.
- Samet, J.M., Stonehuerner, J., Reed, W., Devlin, R.B., Dailey, L.A., Kennedy, T.P., Bromberg, P.A., Ghio, A.J., 1997. Disruption of protein tyrosine phosphate homeostasis in bronchial epithelial cells exposed to oil fly ash. *Am. J. Physiol.* 272, L426–L432.
- Sanchez-Perez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, A.R., Herrera, L.A., Morales-Barcenas, R., López-Saavedra, A., González-Ramírez, I., Miranda, J., García-Cuellar, C.M., 2014. Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM(10)) exposure in lung cells. *Toxicol. Lett.* 225, 12–19.
- Sanchez-Perez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, A.R., Morales-Barcenas, R., Gutiérrez-Ruiz, C., Vázquez-López, I., García-Cuellar, C.M., 2009. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett.* 278, 192–200.
- Sevastyanova, O., Novakova, Z., Hanzalova, K., Binkova, B., Sram, R.J., Topinka, J., 2008. Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat. Res.* 649, 179–186.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Soberanes, S., Panduri, V., Mutlu, G.M., Ghio, A., Bundinger, G.R., Kamp, D.W., 2006. p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 1229–1238.
- Spitzner, M., Ebner, R., Wolff, H.A., Ghadimi, B.M., Wienands, J., Grade, M., 2014a. STAT3: a novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy. *Cancers (Basel)* 6, 1986–2011.
- Spitzner, M., Roesler, B., Bielfeld, C., Emons, G., Gaedcke, J., Wolff, H.A., Rave-Frank, M., Kramer, F., Beissbarth, T., Kitz, J., Wienands, J., Ghadimi, B.M., Ebner, R., Ried, T., Grade, M., 2014b. STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 134, 997–1007.
- Steenhof, M., Gosens, I., Strak, M., Godri, K.J., Hoek, G., Cassee, F.R., Mudway, I.S., Kelly, F.J., Harrison, R.M., Lebret, E., Brunekreef, B., Janssen, N.A., Pieters, R.H., 2011. In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential—the RAPTES project. *Part Fibre Toxicol.* 8, 26.
- Topinka, J., Schwarz, L.R., Wiebel, F.J., Cerna, M., Wolff, T., 2000. Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat. Res.* 469, 83–93.
- Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., Kamp, D.W., 2003. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 180–187.
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., Jove, R., 2014. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 736–746.
- Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798–809.
- Zhang, X., Guo, A., Yu, J., Possemato, A., Chen, Y., Zheng, W., Polakiewicz, R.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Wang, Z.J., 2007. Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4060–4064.