

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“RESPUESTA DE DAÑO A DNA EN CÉLULAS A549 EXPUESTAS A
PARTÍCULAS URBANAS (PM₁₀): PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS
OXIDANTE”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

M. en C. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ

Dra. Claudia María García Cuellar

Co-Directora

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Co-Directora

Dr. Álvaro Román Osornio Vargas

Asesor

México D.F., a 19 de junio del 2009

Miembros del Comité Tutorial de la Tesis

**“RESPUESTA DE DAÑO A DNA EN CÉLULAS A549 EXPUESTAS A
PARTÍCULAS URBANAS (PM₁₀): PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS
OXIDANTE”**

Realizada por
M. en C. Yesennia Sánchez Pérez

En las instalaciones del Instituto Nacional de Cancerología y la
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, ambas en la
ciudad de México DF.

Dra. Claudia María García Cuellar

Laboratorio de Toxicología Ambiental
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología.
cmgarcia@salud.gob.mx

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

Dr. Álvaro Román Osornio Vargas

Laboratorio de Toxicología ambiental
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología.
aosornio_06@servidor.unam.mx

Los miembros del jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis **"RESPUESTA DE DAÑO A DNA EN CÉLULAS A549 EXPUESTAS A PARTÍCULAS URBANAS (PM₁₀): PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDANTE"** realizada por la M en C Yesennia Sánchez Pérez quien realizó la disertación pública el 19 de junio del 2009 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



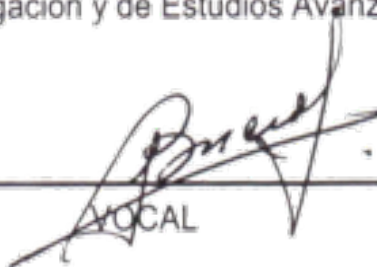
PRESIDENTE

Dr. Pablo Damián Matsumura
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



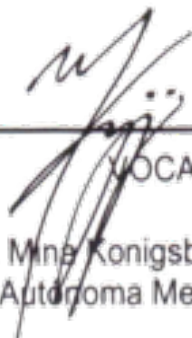
SECRETARIA

Dra. Andrea Marisa Gabriela De Vizcaya Ruiz
Sección externa de Toxicología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-I.P.N.



VOCAL

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa pertenece al padrón de excelencia de posgrados del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: UAM-I 0904-0.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con los apoyos No. 43138-M, No. AC-2006-52830, y por la beca Parker B. Francis, USA.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi comité tutorial por su valioso apoyo y colaboración en la realización de este trabajo: a la Dra. Claudia María García Cuellar, del Instituto Nacional de Cancerología; a la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y al Dr. Álvaro Román Osornio Vargas, del Instituto Nacional de Cancerología.

A mi jurado: La Dra. Mina Königsberg Fainstein; al Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura, Dra. Leticia Bucio Ortiz de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; y a la Dra. Andrea Marisa Gabriela De Vizcaya Ruíz, de la Sección Externa de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN.

Deseo expresar mi agradecimiento por su valiosa colaboración a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, a la Bióloga Yazmin Segura García, a la QFB María Inés Vázquez López, y a la Bióloga Rocío Morales Bárcena, del Instituto Nacional de Cancerología.

A la Bióloga Yazmin Segura García y al Ing. Químico Raúl Quintana Belmares por su apoyo en el muestreo, para la obtención del material particulado utilizado en éste trabajo.

Al Dr. Javier Miranda del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su colaboración en el análisis del contenido de elementos químicos del material particulado, y a la Dra. Irma Rosas del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México por su colaboración en el análisis del contenido de endotoxina en las PM.

A la Dra. Argelia Valdés Arzate, por su apoyo en la realización de la técnica de carbonilación de proteínas y a la Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero, por su ayuda en la evaluación de la senescencia celular, ambas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Toxicología Ambiental, de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología y en el laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Índice	VII
Lista de abreviaturas	IX
Resumen	XII
Abstract	XIV
INTRODUCCIÓN	1
• Composición y características de las aeropartículas contaminantes (PM)	1
• Estudios epidemiológicos y toxicológicos de las PM	2
• Estrés oxidante y su manejo	3
• Daño oxidante a macromoléculas	5
• Respuesta celular ante el daño al DNA	6
• Senescencia celular	8
• Estrés oxidante y PM	10
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
• General	14
• Particulares	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
• Recolección y preparación del material particulado (PM ₁₀)	15
• Análisis elemental del material particulado	15
• Determinación de endotoxina	16
• Cultivo celular	16
• Preparación de las partículas para exponer cultivos celulares	16
• Exposición de células a las partículas	17
• Citotoxicidad	17
• Especies reactivas de oxígeno	17
• Contenido de glutatión total	18
• Actividad de SOD total y catalasa	18
• Lipoperoxidación	19
• Oxidación de proteínas	20

• Oxidación de proteínas	20
• Daño a DNA	21
• Expresión y fosforilación de proteínas de respuesta ante daño al DNA (ATM, ATR, H2A.X, CHK1, CHK2, MDM2, CDC25A, 53BP1)	21
• Focos de daño a DNA de γ H2A.X (S139) y ATM fosfo (S1981)	23
• p53 total y p53(S15)	23
• Ciclo celular	24
• Apoptosis	25
• Senescencia celular asociada a β -galactosidasa	25
• Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
• Determinación de elementos químicos y endotoxina en las PM ₁₀ de la Ciudad de México	27
• Generación de especies reactivas de oxígeno y cambios en los niveles de GSH	28
• Las PM ₁₀ disminuyen la actividad de SOD y catalasa	29
• Las PM ₁₀ inducen daño a lípidos y proteínas	30
• Las PM ₁₀ inducen daño oxidante al DNA	31
• Rompimiento en doble cadena del DNA y cambios en las cinasas ATM/ATR y 53BP1	32
• ATM se asocia a sitios de corte en la doble cadena del DNA	33
• Activación de las proteínas Chk2, Chk1 y CDC25A vía ATM y ATR	34
• Expresión de p53	36
• Las PM ₁₀ no inducen cambios el ciclo celular y no inducen apoptosis	37
• Las PM ₁₀ inducen senescencia celular asociada a β -galactosidasa	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS	49
PUBLICACIÓN	60

Lista de abreviaturas

53BP1	Proteína supresora de tumor que se une a p53
ANOVA	Análisis de varianzas
ATM	Ataxia-telangiectasia Mutada
ATM(S1981)	ATM fosforilada en serina 1981
ATR	Proteína Relacionada con Ataxia-telangiectasia y RAD3
ATR(S428)	ATR fosforilado en serina 428
BSA	Albúmina sérica bovina
Cdc25	Proteínas de división celular
ChK1	Proteína cinasa de “revisión” del ciclo celular 1
ChK2	Proteína cinasa de “revisión” del ciclo celular 2
cm ²	Centímetros cuadrados
CT	Control
Cu/Zn-SOD	Superoxido dismutasa Cu/Zn
Mn-SOD	Superoxido dismutasa Mn
DA-DCFH	2,7-diacetato-diclorofluoresceina
DDR	Respuesta de daño al DNA
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DE	Desviación estándar
DSBs	Rompimiento en la doble cadena del DNA.
SSB	Rompimiento en una cadena del DNA
DTNB	5,5'-Ditiobis(ácido 2-nitrobenzónico)
DTPA	Ácido dietil triaminopentaacético
EDTA	Ácido etilen diaminotetraacético
EGTA	Ácido etilen glicol tetraacético
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H2A.X	Histona 2A.X

IL	Interleucinas
LPX	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
MDM2	Oncogen murino doble minuto
MES	Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico
NaN ₃	Azida de sodio
NP-40	Nonidet P-40
p53(S15)	Proteína p53 fosforilada en Serina 15
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBS	Amortiguador de fosfatos
PBS-T	Amortiguador de fosfatos más 0.05 % de Tween 20
PIPES	Ácido dipotasio 1,4-Piperazina dietanosulfónico
PIXE	Emisión de rayos-X inducida por protones
PM	Aeropartículas contaminantes
PU	PM con un diámetro aerodinámico < 0.1 µm
PM ₁₀	PM con un diámetro aerodinámico ≤ 10 µm
PM _{2.5}	PM con un diámetro aerodinámico ≤ 2.5 µm
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilo
RAF	Proteína cinasa Serina/Treonina
RAS	Proteína G, específicamente es una pequeña GTPasa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
SA β-Gal	Senescencia asociada a β-galactosidasa
TBS	Amortiguador salino de TRIS
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β
TLX	Trolox
TLX+CT	Células A549 incubadas con 10 µM de Trolox
TLX-PM ₁₀	10 µM de Trolox más 10 µg/cm ² de PM ₁₀
TNFα	Factor de necrosis tumoral α

TRIS	2-Amino-2-(hidroximetil)aminometano
UE	Unidades de endotoxina
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
γ H2A.X	gama histona H2A.X (fosforilada en serina 139)

Resumen

Las aeropartículas contaminantes con un tamaño aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) son un componente de la contaminación del aire. Se sabe que las PM afectan la salud del ser humano y que son un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón. Se ha determinado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por componentes de las PM_{10} , como los metales, juegan un papel importante en los efectos inducidos por éstas. El objetivo de este trabajo fue determinar en células epiteliales de pulmón humano (A549) expuestas a una concentración subletal ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PM_{10} que contenían metales de transición como Fe, Cu y Ti, la inducción de estrés oxidante, daño oxidante a los lípidos, las proteínas y al DNA, las vías de respuesta por daño al DNA y la inducción de senescencia; así como determinar la participación del estrés oxidante mediante la utilización del antioxidante Trolox (TLX). Para esto se expusieron células A549 a una concentración subletal ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PM_{10} por 24 h, se evaluó la generación de ROS intracelular y los niveles de glutatión. Para determinar la lipoperoxidación se evaluó la generación de malondialdehído y la oxidación de proteínas se evaluó por medio de un oxyblot. El daño al DNA se determinó mediante la técnica de cometas. Los cambios en los niveles y la fosforilación de las proteínas se hizo por inmuno reconocimiento (Western-Blot). La co-localización de focos de daño a DNA se hizo mediante inmuno-fluorescencia, la apoptosis se evaluó por anexina V y la senescencia se evaluó por la técnica de Senescencia Asociada a β -galactosidasa. Para determinar la participación de las ROS se utilizó el sequestrador de radicales libres Trolox.

La exposición a las PM_{10} por 24 h indujo un incremento de 1.8 veces la generación de ROS y se observó una disminución 60% en el contenido de glutatión total. Las PM Indujeron oxidación de lípidos y proteínas. También disminuyeron la actividad de las enzimas SOD (60 %) y de catalasa (40 %), se indujo rompimiento de la doble cadena del DNA y la vía de respuesta ante este daño, estuvo mediada por la vía de la proteína ATM. ATM fosforiló a la proteína H2A.X ($\gamma\text{H2A.X}$) y se formaron focos de daño al DNA (ATM- $\gamma\text{H2A.X}$). Debido a que la proteína 53BP1 se activó, lo que sugiere que ésta proteína también se está reclutando en los focos de daño al DNA.

La exposición a las PM₁₀ también indujo el incremento de p53; así como la fosforilación de p53(S15), eventos característicos de daño al DNA. Las PM₁₀ indujeron cambios en la fosforilación de proteínas relacionadas con la detención del ciclo celular, para la reparación del DNA, tales como Chk1/Chk2 y la fosfatasa CDC25A. A las 24 h de exposición, no se observaron cambios en las fases del ciclo celular, tampoco se observó apoptosis. A las 48 h se observó que aproximadamente el 50% de las células expuestas a las PM₁₀ presentaron un estado de Senescencia Asociada a β -galactosidasa. La senescencia está relacionada con la vía de respuesta de daño al DNA mediada por ATM y la activación de p53; así como por el estrés oxidante. TLX previno la mayoría de las alteraciones observadas después de que las células fueron expuestas a las PM₁₀. Las PM₁₀ indujeron daño oxidante y daño al DNA. La respuesta celular ante el daño al DNA estuvo mediada por la fosforilación de las proteínas ATM, γ H2A.X y 53BP1. En este trabajo se observó que a las 24 h las PM₁₀ inducen estrés oxidante, daño genotóxico y células senescentes (capaces de alterar su microambiente) y si estos eventos se mantienen a largo plazo, podrían favorecer el desarrollo de cáncer de pulmón.

Abstract

Exposure to urban airborne particles is associated with an increase in morbidity and mortality. Reactive oxygen species (ROS) induced by PM₁₀ are thought to play an important role in the induction of adverse health effects, particularly cardiorespiratory and cancer. In this study we describe the events triggered in A549 cells exposed to a sub-lethal concentration (10 µg/cm²) PM₁₀, which have been characterized for transition metals and endotoxin content. Evaluation of intracellular ROS generation, glutathione levels, antioxidant enzymes activity [superoxide dismutase (SOD) and catalase], oxidative damage, DNA double strand breaks, and DNA-damage molecular signal from DNA double-strand breaks (γH2A.X 53BP1, ATM/ATR/Chk1/Chk2/p53), apoptosis and cellular senescence was performed. Airborne PM₁₀ was able to induce 1.8-fold increase in ROS generation and about a 60% glutathione decrease. Superoxide dismutase and catalase activity was reduced in 60% and 40% respectively after PM₁₀ exposure, in addition lipoperoxidation and protein carbonylation were induced. Exposure to PM₁₀ also induced the formation of DNA doublestrand breaks, γH2A.X generation, and 53BP1 recruitment. To protect the genome, cells activated the ATM/ATR/Chk1/Chk2/p53 pathway, however after 48 h cells turned into a senescence-like state determined by β-galactosidase, a marker associated to senescence. The antioxidant Trolox, was able to prevent most of the alterations caused by particulate matter exposure, indicating the important role of ROS as a mediator of PM₁₀-induced genotoxicity. The ROS, DNA damage and a microenvironment altered in senescent-like cells could be a mechanism by which airborne particles could contribute to the risk of lung cancer.

INTRODUCCIÓN.

Composición y características de las aeropartículas contaminantes (PM)

Las aeropartículas contaminantes (PM) son una mezcla compleja de partículas suspendidas en el aire de origen natural y antropogénico, generadas por emisiones directas de procesos de combustión, como el uso de gasolina, diesel de autos, quema de madera o carbón y por procesos industriales. Las PM están compuestas esencialmente por suspensión de polvo, tierra u otros materiales sólidos, también se encuentran en ellas diversos elementos químicos y metales de transición como S, Cl, K, Ca, Fe, Cr, Cu, Ti, V, Mn, Ni, Zn, Se y Pb. Estos elementos se han asociado a diferentes fuentes de emisión, por ejemplo: S, V y Ni se han asociado a la combustión del petróleo; Fe, K, Ca y Ti se originan de la erosión de las rocas, y Mn, Cu, Zn, Se, Pb, Cl y Cr, son derivados de la industria^[1]. Las PM también contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), endotoxinas (lipopolisacáridos derivados de la pared de bacterias Gram-negativas), sales, polenes, esporas y otros derivados de plantas, también contienen partículas de sulfatos y nitratos, que son generadas por la conversión primaria de la emisión de óxido de nitrógeno y azufre^[2]. Las PM varían en número, forma, superficie, área, composición química, solubilidad, origen y tamaño. El tamaño de las partículas se define como el punto de corte con un 50 % de eficiencia en un diámetro aerodinámico específico^[3], y la distribución del tamaño de las partículas totales suspendidas en el aire es trimodal e incluye partículas $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}), finas $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) y ultrafinas $< 0.1 \mu\text{m}$ (UF). Debido a su tamaño aerodinámico las aeropartículas con un tamaño aerodinámico ≤ 10 micrómetros se consideran como la fracción inhalable capaz de penetrar a las vías respiratorias profundas^[4].

Estudios epidemiológicos y toxicológicos de las PM

Estudios epidemiológicos han reportado que existe una asociación entre la exposición a las PM de aire de zonas urbanas y la incidencia en mortalidad y morbilidad, debido a complicaciones cardiovasculares^[5]. También existen reportes que demuestran que las PM pueden agravar los síntomas de personas con asma e inducir efectos nocivos sobre el desarrollo pulmonar en niños^[6].

El factor de riesgo para las enfermedades respiratorias se debe a que las PM₁₀, por su tamaño aerodinámico, pueden permanecer en las vías respiratorias superiores, fosas nasales, laringe, faringe^[4], e inclusive depositarse en las bifurcaciones de los conductos alveolares^[7]. En el pulmón, las PM pueden inducir inflamación y progresión de enfermedades obstructivas pulmonares crónicas^[2,8]. Además, la exposición a la contaminación del aire durante la infancia se ha vinculado con una reducción del 17 % en el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁), un 12 % de disminución en la capacidad vital forzada (FVC) y disminución del 34.7 % en el flujo espiratorio forzado (FEF)^[9]. En niños con asma se encontró disminución en el FEV₁ y mayor exhalación de óxido nítrico (NO), asociado con la cercanía a vías con alto tránsito vehicular^[10]. También se ha reportado que existe un déficit anual en el FEV₁ de 11 ml en niñas y 15 ml en niños asociado a incremento de 36.4 µg/m³ de PM₁₀^[6].

En la última década, se ha reportado que la exposición crónica a las PM está asociada con un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón^[2,11,12]. En un estudio realizado con adultos no fumadores en California, USA, se observó que existe una asociación por la exposición crónica a concentraciones elevadas de PM₁₀ y dióxido de azufre (SO₂) con el incremento en la incidencia de cáncer de pulmón^[13]. También se ha reportado que una parte de las muertes por cáncer de pulmón en Europa pueden ser explicadas por la exposición a PM^[14]. Las investigaciones también se han dirigido hacia el estudio de otras neoplasias y al respecto recientemente se ha reportado que las PM están relacionadas con el desarrollo del cáncer de la mama^[15] y cáncer gástrico^[16]. Todos estos trabajos han despertado

gran interés en el estudio de los mecanismos celulares mediante los cuales las partículas pueden participar en el desarrollo de estas neoplasias.

Para comprender los mecanismos mediante los cuales las PM inducen efectos adversos en la salud del ser humano se han realizado estudios experimentales que han demostrado que las PM son citotóxicas, causan necrosis y apoptosis^[17,18]. En diferentes líneas celulares se ha visto que las PM son capaces de inducir mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL) IL1- β , IL-6, IL-8^[17-20]. También se sabe que las PM inducen daño al DNA, como rompimiento en una y dos cadenas; así como su degradación^[18,21]. Igualmente, se ha visto que las PM son capaces de inducir disfunción del citoesqueleto en macrófagos^[22]. Diversos trabajos epidemiológicos y toxicológicos, también han demostrado que la composición de las partículas juega un papel muy importante en la toxicidad que inducen^[17-19].

Si bien, existe suficiente literatura que demuestra que las PM son un factor de riesgo para la salud del ser humano, se conoce muy poco acerca de los mecanismos celulares mediante los cuales inducen estos efectos. Sin embargo, hay consenso de que el estrés oxidante juega un papel central en los efectos inducidos por las PM^[8,23]. Debido a que las PM están compuestas de diferentes sustancias, algunas de estas se sabe que pueden incrementar la generación de ROS por una variedad de reacciones como la catálisis de metales de transición, metabolismo, el ciclo redox de quinonas y la inflamación^[24,25]. Esta capacidad pro-oxidante apoya fuertemente el hecho de que el estrés oxidante es un evento importante en los efectos celulares inducidos por las PM^[26].

Estrés oxidante y su manejo

Las especies reactivas de oxígeno incluyen: radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y si bien, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es considerado un radical libre, su participación es muy importante ya que es un precursor potencial del radical hidroxilo. Las ROS son indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (que está relacionado con otros procesos como la

proliferación celular y la apoptosis), la inmunidad, y la defensa contra microorganismos. Un manejo inadecuado de ellas, origina estrés oxidante, que causa graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas como los lípidos, las proteínas y el DNA^[27,28].

Para el manejo de las especies reactivas de oxígeno, existen sistemas tanto enzimáticos como no enzimáticos, que trabajan en conjunto para proteger a los organismos de los riesgos del estrés oxidante^[29]. Dentro de los sistemas enzimáticos antioxidantes, se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX).

Existen cuatro enzimas SOD que catalizan la reacción de dismutación de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser eliminado a su vez por las enzimas catalasa o glutatión peroxidada. Una de las enzimas de SOD contiene dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe, Mn o Ni. En humanos existen tres tipos de SOD: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD) que también contiene en su sitio catalítico Cu y Zn^[27,28].

La catalasa, es una enzima muy eficiente en catalizar la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 , ésta enzima consta de cuatro subunidades idénticas de 60 kDa, dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferroprotoporfirina por molécula^[27,28].

La glutatión peroxidasa comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2), usando glutatión reducido (GSH). Esta enzima consta de cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática^[27,28].

Entre los antioxidantes no enzimáticos que eliminan radicales libres se encuentra la vitamina C y la vitamina E. La vitamina C (ácido ascórbico) tiene funciones como cofactor enzimático. Su función antioxidante deriva de su capacidad de actuar como donador de electrones y disminuye los niveles de $\text{O}_2^\cdot$ y

H₂O₂. La vitamina E (α tocoferol) actúa unida a membrana y es el principal antioxidante capaz de prevenir y bloquear la oxidación de lípidos^[29].

Estos dos sistemas enzimáticos y no enzimáticos, en muchas ocasiones trabajan de manera cinérgica para mantener un balance en el contenido de ROS celular.

Daño oxidante a macromoléculas

Las ROS son moléculas que rápidamente reaccionan con componentes celulares, principalmente lípidos, proteínas y DNA.

La lipoperoxidación es un evento que ocurre cuando existe la interacción de un radical libre como $\cdot\text{OH}$ con un ácido graso, generalmente de triacilglicerol o fosfoacilglicerol, ubicados en las membranas celulares. Dicha interacción tiene como consecuencia la oxidación y desestabilización de las membranas, por lo tanto, la célula puede permanecer en un estado vulnerable para morir o permanecer en estado de senescencia^[30]. Cuando ocurre la lipoperoxidación se forman diversos productos, siendo el más estudiado el malondialdehído (MDA) debido a su capacidad pro-mutagénica, ya que puede interactuar con el DNA formando aductos, y esta es la manera mediante la cual puede producir mutaciones. Por otro lado, el MDA también es capaz de interactuar con proteínas, por ejemplo en el caso de las enzimas, ésta interacción afecta su actividad y por lo tanto se ve afectado el funcionamiento celular^[30], por esta razón el daño a lípidos se asocia con la etiología de diversos padecimientos como el proceso de envejecimiento celular, la arterosclerosis, la artritis reumatoide y el cáncer^[31].

Las proteínas son otro blanco de las ROS y en ellas se han identificado residuos de aminoácidos como la metionina, la histidina, la cisteína, la prolina, el triptófano, la lisina y la tirosina, que son modificados, principalmente por la interacción del radical hidroxilo. La formación de grupos carbonilo (como grupos aldehído o cetona) en las proteínas, es el resultado de diversas reacciones oxidativas y este evento puede alterar su conformación, determinando la parcial o total inactivación de la proteína. La oxidación de proteínas por carbonilación ocurre

preferencialmente en algunas proteínas, por ejemplo, en aquellas que tienen metales, como la Cu/Zn-SOD. La carbonilación hace que las proteínas sean más hidrófobas y resistentes a la proteólisis, lo que provoca acumulación de proteínas^[32], y éste evento puede alterar el funcionamiento general de las células, debido a que los agregados de proteínas carboniladas disminuye la actividad de los proteosomas^[33]. La carbonilación de proteínas es un evento que se incrementa en enfermedades como Parkinson, Alzheimer, diabetes y cáncer^[32].

Las especies reactivas de oxígeno también reaccionan con el DNA, oxidando el esqueleto azúcar-fosfato y las bases. La reacción de los radicales con los azúcares conduce a la fragmentación del enlace fosfo-diéster, lo que lleva al rompimiento de una o dos cadenas del DNA, esto dependiendo de la severidad del daño. De las bases que se modifican por oxidación, las más importantes son: la guanina que se oxida a 8-hidroxiguanina; la adenina que se oxida a 8-hidroxiadenina; y la timina que se oxida a timina glicol. Los radicales libres, principalmente el radical $\cdot\text{OH}$, pueden reaccionar con la desoxirribosa, transformándola en diferentes productos, algunos altamente mutágenos. Los radicales libres también pueden actuar directamente sobre las bases púricas y pirimidícas, como en el caso del doble enlace de la timina, convirtiéndola en timinaglicol, compuesto con carácter de radical libre y que puede reaccionar con el oxígeno para formar peroxitimina, la cual se une a moléculas adyacentes modificando la estructura del DNA, además de dañar bases y formar aductos que pueden ser la causa de diversas enfermedades como el cáncer^[34].

Respuesta celular ante el daño al DNA.

Si bien, el daño oxidante a lípidos y proteínas es muy importante, debido a que el daño a DNA está relacionado con mutagenicidad y consecuentemente con el desarrollo de neoplasias^[35,36], el estudio de los efectos de las PM en el DNA se vuelve un proceso molecular importante de evaluar.

Una respuesta celular adecuada ante el daño al DNA por rompimiento en una (SSB) y doble cadena (DSB), es fundamental para el mantenimiento de la

estabilidad genética y para evitar la formación de tumores. El gen ataxia-telangiectasia mutado (ATM), codifica para una proteína cinasa que es una de las primeras en detectar el rompimiento en la doble cadena del DNA. Ésta proteína es responsable de desencadenar la activación de una serie de eventos de fosforilación de diversas proteínas, que constituye la llamada respuesta ante daño a DNA (DDR). En este contexto, ATM inicia esta respuesta mediante autofosforilación y este evento desencadena la cascada de activación de proteínas que revisan y reparan al DNA^[37].

La proteína ATM fosforila a la histona H2AX en la serina 139 (Ser139) en la región C-terminal, evento que ocurre inmediatamente después de la introducción de DSB^[38]. La fosforilación de H2A.X se conoce como γ H2AX y esta fosforilación es una señal esencial para el reclutamiento de numerosas proteínas que están involucradas en la reparación del DNA. El reclutamiento de diversas proteínas al sitio de daño al DNA forma “focos de daño”, que se caracterizan por la acumulación de proteínas como ATM, γ H2AX, ATR y p53 en los sitios de rompimiento del DNA^[39]. La proteína de unión a p53 (53BP1) también se recluta en los sitios de DSB, ésta proteína se une a dominios de unión del DNA de p53 e incrementa la activación transcripcional mediada por p53 y rápidamente co-localiza con γ H2A.X^[40]. La activación de las proteínas ATM y ATR, tiene también como consecuencia la activación de proteínas cinasas encargadas de la revisión del ciclo celular, como las proteínas cinasas Chk1 y Chk2. La proteína Chk1 es un elemento clave en la vía de respuesta ante daño al DNA y juega un papel crucial en los puntos de revisión del ciclo celular en G2/M, después de ser activado vía ATR. Las proteínas Chk1 y Chk2 son muy importantes en el proceso de reparación a través de múltiples mecanismos, por ejemplo, Chk1 es una proteína modificadora de la cromatina que media la represión transcripcional de algunos genes y también controla el tiempo en el que se entra a mitosis mediante la fosforilación de Cdc25A, ésta es una fosfatasa importante de la maquinaria del ciclo celular, ya que funciona como un regulador positivo en la activación de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y regula la transición de G1 a S y de G2 a M del ciclo celular, por lo que la pérdida de ésta proteína impide que se activen las CDKs, lo que lleva a la

detención del ciclo celular^[41,42] y se sabe que al final de la mitosis, los niveles de Cdc25A rápidamente disminuyen por degradación por proteosomas vía Chk1 y Chk2. El papel fundamental de Chk2 es mediar diversas respuestas celulares ante estrés genotóxico. La proteína Chk2 regula la red de vías que protegen el genoma, coordina el ciclo celular con la reparación del DNA y también regula la supervivencia y la muerte celular.

ATM fosforilada, activa a p53 fosforilándola en diferentes residuos, sin embargo, las proteínas Chk1 y Chk2 también pueden fosforilar a p53. La fosforilación de p53, fundamentalmente en las serinas 15 y 20 y su disociación de MDM2 (un regulador de p53) favorecen la traslocación de p53 al núcleo, donde ejerce su función de activador de genes. Las proteínas Chk1 y Chk2 también activan a la proteína 53BP1.

La vía ATM/ATR, junto con las cinasas Chk1/Chk2 y la activación de p53^[43] constituye un sistema sensor de daño al DNA que puede inducir la detención del ciclo celular para dar tiempo a reparar el daño^[44,45], sin embargo, ésta vía también puede llevar a apoptosis o a un estado de senescencia celular, eventos que dependen de la severidad del daño al DNA^[46].

Senescencia celular.

Se sabe que las células normales se dividen un número finito de veces, y a esto se le conoce como límite de Hayflick ^[47,48], y al proceso que limita la división celular se le conoce como senescencia replicativa. La palabra senescencia se refiere al sentido de envejecer o disminuir la actividad celular. La senescencia replicativa, senescencia celular y envejecimiento celular, a la fecha, se manejan como sinónimos^[49]. La senescencia se limita a células capaces de tener división mitótica y no en las células postmitóticas como las neuronas maduras o las células de músculo^[48]. La senescencia se refiere a células que han sufrido detención del ciclo celular, como resultado del acortamiento de telómeros que ocurre con cada ronda del ciclo celular. Los telómeros son extensiones del DNA (5'-TTAGGG-3') que están asociados a proteínas que cubren y estabilizan el extremo final de los

cromosomas, previniendo la fusión de los cromosomas y la inestabilidad genómica. Las células senescentes permanecen vivas por largos períodos de tiempo, se encuentran metabólicamente activas, responden a señales del medio ambiente y retienen muchas características de las células pre-senescentes, ya que ambas expresan muchos genes en común, algunos de los cuales siguen siendo inducibles por estímulos externos a lo largo de todo su tiempo de su vida. Las células senescentes se caracterizan: en primer lugar, por ser incapaces de proliferar en respuesta a estímulos mitogénicos, ya que se encuentran detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular, y esta detención, a diferencia de la quiescencia, es irreversible. En segundo lugar, presentan cambios fenotípicos en su aspecto general y alteraciones específicas en sus funciones diferenciadas. Esto último es diferente en cada caso y depende del tipo celular del que se trate. Morfológicamente, las células senescentes se observan como células grandes y aplanadas, con una gran cantidad de vacuolas. Incrementan la biogénesis de sus lisosomas y reducen su velocidad de síntesis y degradación de proteínas. Además de que se presentan cambios en la regulación y expresión de genes específicos como IL-6 e IL-8, y disminuyen la expresión de los inhibidores de metaloproteinasas de tejidos 1 y 3 (TIMP-1 y TIMP-3), por lo que en lugar de generar matriz extracelular, están produciendo proteínas que la degradan ^[48,50].

La tercera particularidad que caracteriza a las células senescentes, es que son resistentes a estímulos que inducen la muerte por apoptosis. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta resistencia o los factores que la promueven, aún se desconocen, pero este hecho podría explicar porqué las células senescentes, a pesar de estar metabólica y fisiológicamente alteradas se acumulan *in vivo* ^[48,51].

Durante muchos años se manejó a la senescencia como un mecanismo anti-tumoral, sin embargo, recientemente se ha propuesto que la senescencia es una arma de doble filo, ya que a la larga pueden promover la formación de tumores, debido a que las células senescentes pueden alterar el microambiente, por ejemplo produciendo factores de crecimiento e induciendo proliferación mitogénica en las células vecinas ^[52]. También incrementan la producción de metaloproteasas, lo que puede promover el desarrollo de neoplasias, por interrumpir la comunicación

intracelular y jugar un papel importante en la formación de metástasis^[53]. Se sabe que los acontecimientos que inducen daño al DNA, tales como el estrés oxidante, también pueden tener como resultado la inducción de células senescentes^[54]. La senescencia puede también ser inducida por privación de suero, exceso de glucosa, o de otro tipo de estrés ambiental, de forma independiente del acortamiento de los telómeros^[55,56].

Estrés oxidante y PM.

Si bien, desde hace muchos años se sabe que las PM inducen efectos dañinos en la salud del ser humano, es a mediados de los 90's que se determina que las PM₁₀ son generadoras de radicales libres y que éstos juegan un papel importante en la patogenicidad inducida por las PM^[57]. Mediante un ensayo *in vitro* se demostró la relajación del plásmido ϕ X174 RF, mediante la generación del radical $\cdot$ OH por partículas que contenían cobalto, níquel o bien titanio, efecto que no se observó cuando se utilizaron partículas de carbono negro, partículas que se sabe no inducen estrés oxidante. La utilización de N-acetilcisteína (NAC) como antioxidante, previno la relajación de este plásmido, lo que manifiesta la participación de las especies reactivas de oxígeno en estos efectos^[23]. Posteriormente, mediante ensayos con DNA desnudo (libre de proteínas) se determinó que las PM de la ciudad de México son capaces de romper el DNA solo en presencia de H₂O₂, daño que no ocurre cuando se usa un quelante de metales (deferoxamina), por lo que los autores proponen que el daño al DNA esta dado por el radical hidroxilo, el cual se genera vía la reacción de Fenton mediada por los metales presentes en las partículas^[21]. Así mismo, en otro estudio se determinó que uno de los posibles mecanismos de daño inducido por las aeropartículas son los efectos que tienen los componentes de las mismas al interactuar con la membrana celular y producir un ambiente generador de ROS^[58].

Existen reportes que también demuestran que las PM inducen daño oxidante a lípidos y proteínas. En células broncoepiteliales normales (BEAS-2B), expuestas a partículas procedentes del valle de Utah, USA, estas indujeron lipoperoxidación y

este daño se asoció con la variabilidad de metales como el cobre y el zinc contenidos en las partículas^[59] y con componentes orgánicos^[60]. En células de pulmón de rata, se demostró la fragmentación del DNA y lipoperoxidación como consecuencia del estrés oxidante producido por las aeropartículas^[61]. En células derivadas de un cáncer de pulmón (A549), las PM₁₀ indujeron híper-acetilación de la histona H4 por un mecanismo dependiente del estrés oxidante^[62]. En pulmones de ratones instilados con PM se observó una gran actividad en el promotor de hemoxigenasa 1 (HO-1), causado por daño oxidante inducido por las partículas ambientales y la actividad en este promotor genera susceptibilidad para desarrollar enfermedades pulmonares^[63].

Con respecto al manejo de las ROS inducidas por las PM, existen trabajos donde se evaluaron las enzimas antioxidantes ante la exposición a aeropartículas. En uno de ellos se instilaron ratas con PM₁₀ y no observaron cambios en los niveles de glutatión, sin embargo observaron una disminución inconsistente en la actividad de catalasa^[64]. En otro trabajo, utilizando un ensayo *in Vitro*, analizaron la actividad de cuatro enzimas antioxidantes (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, glutatión peroxidasa, y glutatión reductasa), éstas enzimas fueron expuestas directamente a diferentes concentraciones de PM con diferente composición: PM altamente tóxicas (alto contenido de metales), partículas de moderada toxicidad (metales, silicatos y sulfatos) y partículas de baja toxicidad (principalmente sílice), éstos autores determinaron que las PM disminuyen la actividad de las cuatro enzimas, y la magnitud en la disminución dependió de la composición, siendo las PM con mayor contenido de metales las que indujeron mayor disminución en la actividad de las cuatro enzimas^[65]. Recientemente se reportó que en raspados nasales de individuos que viven en la ciudad de México, se encuentra disminuida la expresión de la proteína GPX, comparado con individuos de una zona no contaminada (San Andrés Tuxtla, Veracruz, México)^[66].

Estos trabajos aportan evidencia de cómo las PM inducen daño oxidante a diversas biomoléculas, sin embargo, el panorama del manejo enzimático del estrés oxidante inducido por PM aún se encuentra muy limitado, es por esta razón que es importante esclarecer como se encuentran los mecanismos encargados del manejo

de las ROS ante la exposición a las aeropartículas contaminantes, por lo que es necesario realizar mas estudios para conocer mejor estos mecaniamos. También es importante conocer el daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA; así como conocer las vías de respuesta ante daño al DNA, dado que el estrés oxidante y el daño al DNA son eventos importantes en la inducción de neoplasias.

JUSTIFICACIÓN.

El empatar las evidencias generadas a través de estudios epidemiológicos, referente a que la exposición a las PM son un factor de riesgo en el desarrollo de diversas patologías, con las evidencias toxicológicas, ha sido un problema consistente que ha limitado el valor del conocimiento de ambas disciplinas. Un punto importante es conocer como las células responden ante los efectos producidos por exposiciones crónicas a las PM, ya que este tipo de exposiciones puede tener como consecuencia el surgimiento del cáncer asociado a la exposición a ellas, lo cual ha sido avalado por diversos estudios epidemiológicos, sin embargo es muy poca la información con la que se cuenta sobre los mecanismos celulares implicados en ello. Considerando que se ha demostrado que el estrés oxidante generado por las PM juega un papel importante en los efectos producidos, y con la finalidad de identificar eventos que pudieran favorecer un proceso carcinogénico, el estudiar la participación del estrés y el daño oxidante a biomoléculas, entre ellas el DNA; y por las implicaciones directas que este daño juega en un proceso carcinogénico, determinar la vía de respuesta de daño que se desencadena, es un tema muy importante de estudio. Esto debido a que de ello depende la respuesta celular, como lo es la activación de la maquinaria involucrada en identificar y reparar el daño, y las consecuencias de su eficiencia sobre diferentes estados celulares como la apoptosis, o la senescencia celular, eventos ligados al estrés oxidante y a rompimientos en la doble cadena del DNA. Este trabajo contribuirá a conocer algunos eventos celulares alterados por la exposición a PM y sus consecuencias biológicas permitiendo profundizar en el conocimiento de cómo las PM podrían favorecer el desarrollo de neoplasias.

HIPÓTESIS

Las PM₁₀ inducirán estrés y daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA en células A549, y las vías de respuesta por daño al DNA irán dirigidas hacia senescencia celular. Debido a que TLX es un antioxidante, este será capaz de prevenir el estrés y el daño oxidante; así como la senescencia celular.

OBJETIVOS.

General.

Determinar si las PM₁₀ inducen estrés oxidante, daño oxidante a lípidos, proteínas y al DNA en células A549, las vías de respuesta por daño al DNA y la inducción de senescencia.

Particulares.

1. Caracterizar a las PM₁₀ (análisis elemental y determinación de endotoxina).
2. Determinar el daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24 h.
3. Evaluar la respuesta enzimática antioxidante, cuantificando la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24h .
4. Determinar la respuesta celular ante daño por rompimiento en doble cadena del DNA mediada por ATM, mediante transductores (ATM/ATR), efectores (H2A.X, Chk1, Chk2, p53 y MDM2) y vías de reparación ante daño al DNA (ATM/ATR/Chk1/Chk2/p53) en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀.
5. Evaluar si las PM₁₀ de la ciudad de México inducen apoptosis o senescencia en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Recolección y preparación de las aeropartículas (PM₁₀)

Las partículas fueron colectadas en una zona comercial de la Ciudad de México (zona comercial, con alto tráfico vehicular), estación Merced de la Red Automatizada de Monitoreo Atmosférico del Gobierno del Distrito Federal (RAMA-GDF), utilizando colectores de PM₁₀ de grandes volúmenes (GMW modelo 1200 VFC HVPM₁₀; Sierra Andersen, Smyrna GA, USA), empleando filtros de nitrato de celulosa con un poro nominal de 3 µm (Sartorius Goettingen, Germany). El muestreo se realizó de octubre del 2004 a mayo del año 2005 (época de secas) por períodos de 24 h (1.13 m³/min), 3 días por semana. Los filtros se guardaron a 4°C en un desecador antes de remover las partículas. Para obtener las PM de la nitrocelulosa, primero se utilizó un cepillo de dientes eléctrico (Oral-B AdvancePower 400, Braun, Mexico) para soltar las partículas, y luego se utilizó una hoja quirúrgica (no.11) para recoger las partículas de la superficie de la membrana. Las partículas recuperadas de las membranas se mezclaron y se almacenaron en viales de vidrio libres de endotoxina los cuales se guardaron a 4°C en un desecador y se protegieron de la luz, hasta su utilización^[67].

Análisis elemental de las aeropartículas

El análisis del contenido de elementos en las aeropartículas contaminantes colectadas se hizo por emisión de rayos-X inducida por protones (PIXE). Se utilizó como radiación primaria un haz de protones de 2.95 MeV y los rayos-X emitidos se colectaron con un detector LEGe. La señal del detector se capturó y el espectro se procesó en un analizador multicanal como se reportó previamente^[1]. El espectro de emisión se interpretó usando el código para computadora QXAS en las instalaciones del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Determinación de endotoxina

Para evaluar el contenido de la endotoxina en las PM₁₀, se realizó un ensayo cinético de lisados de *Limulus* de Amebocitos, siguiendo las especificaciones del fabricante (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). Se utilizó como estándar endotoxina de *Escherichia coli* (BioWhittaker, Walkersville MD, USA). Las concentraciones de endotoxina se expresaron como unidades de endotoxina por miligramo de partículas (UE/mg). Las determinaciones se hicieron en el Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM.

Cultivo celular

La línea celular A549 (células epiteliales de cáncer de pulmón humano) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA, USA). Las células se utilizaron entre los pases 10 y 30 a partir de la obtención de las células de la ATCC. El cultivo se realizó en cajas de 75 cm² (Corning) con medio de cultivo F-12 de Kaighn (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) complementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island NY, USA). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ (Nuaire CF autoflow). Para los experimentos se utilizaron cultivos celulares semiconfluentes, libres de suero.

Preparación de las aeropartículas para exponer cultivos celulares

Las PM se pesaron y se esterilizaron inmediatamente antes de los experimentos, se realizaron suspensiones de 1 mg/mL de PM en medio F-12 de Kaighn, y de estas suspensiones se tomaron las alícuotas necesarias para alcanzar la concentración final de 10 µg/cm² en el cultivo celular.

Exposición de células a las partículas

Las células A549 en semiconfluencia fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24 h. En todas las evaluaciones se utilizó como control de expresión basal, células sin exponer a aeropartículas. En paralelo a éstos experimentos y previo a la exposición con las PM, cultivos de células se preincubaron con $10 \mu\text{M}$ de Trolox por 10 min, y como control de TLX, se utilizaron células expuestas solo a TLX.

Citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó con la técnica de Cristal Violeta^[68], en placas de 96 pozos. Al término de los tratamientos, las células se lavaron con PBS (pH 7.4) y se fijaron con formaldehído al 4 % en amortiguador de fosfatos (PBS) y se dejaron 24 h a 4°C . Después de este período, se lavaron las células con agua corriente y se tiñeron con cristal violeta al 0.1 % en PBS por 10 min. Las placas se lavaron con agua hasta eliminar el exceso del colorante. La extracción del colorante de las células adheridas se hizo agregando $50 \mu\text{l}$ de ácido acético al 33 % por 10 min y las placas se leyeron a una longitud de onda de 570 nm (Genios plus Tecan, Trading AG, Suiza). El porcentaje de viabilidad se calculó al comparar la absorbancia de las células expuestas con las no expuestas a partículas, considerando estas últimas como el 100 % de la viabilidad.

Especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno se evaluó espectrofotométricamente usando el 2,7-diacetato-diclorofluoresceína (DA-DCFH) (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Esta molécula difunde a través de la membrana e interacciona con las ROS intracelulares, generando una molécula fluorescente. Los experimentos se hicieron en placas de 96 pozos cuando las células se encontraban en semiconfluencia. Después de 24 h de incubación con cada uno de los

tratamientos (PM₁₀, TLX-PM₁₀), las células se incubaron con 10 µM de DA-DCFH por 30 min. La fluorescencia se evaluó en un lector de placas (Genios plus Tecan Trading AG, Suiza) con filtros de excitación de 480 nm y de emisión de 515 nm. Los pozos que contenían sólo células y DA-DCFH y pozos con PM₁₀ y DA-DCFH, se utilizaron como controles de fluorescencia basal y oxidación de DA-DCFH por las PM. Los resultados fueron reportados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UF) X10⁶ células.

Contenido de glutatión total

La evaluación del glutatión total se hizo con un ensayo comercial (Calbiochem 354103). Después de 24 h de exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀ las células fueron cosechadas y colectadas por centrifugación (2000 g por 5 min). Las células fueron homogenizadas en amortiguador frío (MES 50 mM, pH 7.0, más 1 mM de EDTA). El homogenizado fue centrifugado y se colectó el sobrenadante. Las muestras fueron desproteinadas añadiendo ácido metafosfórico (Sigma M6288) para evitar interferencia de los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su utilización. Cincuenta microlitros de las muestras fueron añadidos a una placa de 96 pozos y se les agregó 150 µL de una mezcla con los siguientes reactivos contenidos en el estuche del ensayo: 11.25 mL de amortiguador MES, 0.45 mL de mezcla de cofactor, 2.1 mL de la mezcla de enzima, 2.3 mL de agua y 0.45 mL de DTNB. El contenido del GSH total se cuantificó utilizando un lector de placas a 405 nm (Genios™ plus, Tecan Trading AG, Switzerland). Se utilizó una curva estándar de GSH y se reportó como µM de GSH.

Actividad de SOD total y de catalasa

La actividad de SOD total se midió con un ensayo comercial (Calbiochem 574600). Después de exponer las células a 10 µg/cm² de PM₁₀, se lisaron con el reactivo de extracción proporcionado en el estuche del ensayo. A 20 µg de proteína se le añadió la solución amortiguadora (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 50 mM,

conteniendo 3.3 mM de ácido bórico y 0.11 mM DTPA, pH= 8.8), se agregó el reactivo 2 (1,4,6-trimetil-2-vinilpiridina trifluorometasulfanato, 33.3 mM, en 1mM de HCl) y se incubó durante 1 min a 37°C, se agregó el reactivo 1 (5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxibenzofluoreno, 0.66 mM, en 3.2 mM de HCl conteniendo 0.5 mM de ácido dietilentriamin pentacético DTPA y 25% etanol). Las muestras se leyeron durante 1 min en un espectrofotómetro (Beckman DU® 650) a 525 nm. Para determinar la relación de unidades de SOD y el tiempo de reacción enzimática, se realizó una prueba de cuatro blancos. Los resultados se reportan en unidades de actividad de SOD/mg de proteína.

La actividad de catalasa se realizó según la técnica de Beers^[69], la cual se basa en la degradación de H_2O_2 a H_2O por la enzima catalasa. Después de la exposición a PM_{10} se lisaron las células con amortiguador de lisis (Tritón-100 1%, 0.1 M Na_2HPO_4). La actividad de catalasa se evaluó utilizando 20 µg de proteína en 100 µL y se ajustó a 3 mL con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 a 25°C, como sustrato para la catalasa se agregó H_2O_2 a una concentración final de 0.033 %. Se midió el tiempo en el cual disminuye la lectura de 0.550 nm a 0.520 nm a una longitud de onda de 240 nm (Beckman DU® 650), esto debido a la degradación de H_2O_2 . Como control se utilizaron 50 unidades de catalasa (Sigma EC 1.11.1.6). Los datos se presentan como la relación de unidades de actividad por microgramo de proteína.

Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se determinó por la evaluación de la formación de malondialdehído (MDA) y se hizo con un ensayo colorimétrico (Calbiochem, San Diego CA, USA). Después de la exposición a las PM, las células se lavaron dos veces con PBS, se lisaron con amortiguador (Tris 10 mM, PMSF 10 mM y NaCl 150 mM, pH 7.4) y se cuantificó la proteína mediante ácido bicinconínico^[70]. Se usaron 80 µg de proteína que se mezclaron con N-metil 2 fenilindol acetonitrilo y se le agregó ácido metanosulfónico, incubando la mezcla a 45°C por 1 h. El contenido de MDA se determinó a una longitud de onda de 586 nm en un lector de placas

(Genios plus Tecan Trading AG, Switzerland), con base en una curva estándar de MDA que se hizo en cada uno de los experimentos. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y se presentan como nmolas de MDA/mg de proteína.

Oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas se hizo mediante la evaluación de grupos carbonilos y para esto se utilizó el ensayo comercial Oxyblot (Chemicon, Temecula CA, USA). Después de la exposición a las PM, las células fueron lisadas con amortiguador (tris 10 mM, pH 8; NaCl 150 mM y 1 % de NP-40) y se realizó la cuantificación de proteína mediante ácido bicinconínico. Posteriormente a 15 µg de proteína de cada uno de los experimentos se les agregó 5 µL de SDS al 12 %, 10 µL de dinitrofenilhidrazina (DNPH), y 10 µL de solución neutralizante para detener la reacción. Las proteínas derivatizadas se separaron en un gel de acrilamida al 12 % en un módulo de electroforesis (Bio- Rad Mini Protean 3 cell) con buffer de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% pH. 8.3) a 170 Volts. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Trans-Blot SD) con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3), durante 45 minutos a 12 Volts. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con 1 % de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS-Tween (PBS-T) durante 1 h, posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-DNP (Dilución 1:100 en PBS-T con 1 % de BSA) por 1 h. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con PBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo (Horseradish peroxidase-conjugated) dilución 1:300 en PBS-T, proporcionado en el estuche del ensayo. El revelado de la inmunoreacción se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando el ensayo de ECL-PLUS (Amersham RPN 2132).

Daño a DNA

El daño al DNA se evaluó con un ensayo comercial para cometas (Trevigen, 4250-050-K) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Después de 24 h de exposición a las aeropartículas, las células fueron cosechadas, centrifugadas a 2000 g por 5 min, y 1×10^5 células fueron resuspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 1 % y las muestras fueron colocadas en portaobjetos pretratados, proporcionados en el estuche del ensayo. Los núcleos fueron tratados por 30 min con buffer de digestión (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2 M, 1% de Triton X-100, pH 10). Posteriormente se lavaron las muestras (NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y fueron sometidas a una electroforesis alcalina a 50 V por 30 min (Horizon 58; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD). Los cometas se tiñeron con SYBER Green I y se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40, Japón). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Coolpix P5100, Nikon) y la longitud de los cometas se midió usando un analizador de imágenes (ImageJ, NIH)^[71]. Se midieron 100 cometas por muestra y los resultados se presentan en un diagrama de cajas y bigotes, en el que se calculó la mediana y los percentiles 25 y 75, con los cuales se formaron las cajas, que tienen la mediana como eje central.

Expresión y fosforilación de proteínas de respuesta ante daño al DNA (ATM, ATR, H2A.X, CHK1, CHK2, MDM2, CDC25A y 53BP1)

Después de que las células fueron expuestas a las PM, se lavaron con PBS y se lisaron (Tris 20mM, NP40 al 1% y 150 mM de NaCl, pH 8.0), utilizando una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Mannheim, Germany). Los lisados fueron centrifugados (13000 x g por 5 min) y guardados a -20°C. El contenido de proteína se determinó mediante la técnica de ácido bicinonínico^[70]. Cuarenta microgramos de proteína fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12.5 % con SDS. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, UK) en una cámara de transferencia semiseca

(Bio-Rad Trans-Blot SD) con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3), durante 45 minutos a 12 V. Las membranas se bloquearon durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente con PBS + 5% de leche descremada, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. Las condiciones de los anticuerpos primarios fueron las siguientes: para ATM se usó un anticuerpo anti ATM anti conejo (UPSTATE #05-513) dilución 1:500 y para ATM fosforilada en serina 1981 se utilizó un anticuerpo anti ATM fosfo ser 1981 anti conejo (UPSTATE # 05-740), dilución 1:2000. Para la proteína ATR se utilizó un anticuerpo primario anti conejo (Abcam, Ab 2905), dilución 1:2000, para ATR fosforilado en Serina 428, se utilizó un anticuerpo anti conejo (Cell Signaling, 2853), dilución 1:2000. Para la evaluación de las proteínas H2A.X y γ H2A.X (Ser 139) se utilizaron anticuerpos anti conejo (UPSTATE, 07-627 y 07-627, respectivamente), para ambos la dilución fue de 1:3000. Las proteínas Chk1 y Chk1 fosforilada en Serina 317 fueron evaluadas con anticuerpos anti conejo (Abcam, ab47488 y ab38518, respectivamente), dilución 1:2000, para ambos anticuerpos. La proteína Chk2 se evaluó con un anticuerpo anti conejo (Abcam, ab47433) y para la proteína Chk2 fosforilada en Treonina 68 se utilizó un anticuerpo anticonejo (Abcam, ab47433), dilución 1:2000. La proteína 53BP1 se evaluó con un anticuerpo anti conejo (Abcam, ab21083), dilución 1:1000. La proteína MDM2 se evaluó con un anticuerpo anti conejo (Abcam, ab53710), dilución 1:2000, Cdc25A se evaluó con un anticuerpo anti conejo (Abcam, ab2357), dilución 1:1000, Cdc25A fosforilada en Serina 278 se evaluó con un anticuerpo anti conejo (Abcam, ab59977), dilución 1:1000. La actina se utilizó como un control de carga y el anticuerpo anti actina hecho en ratón, fue donado por el Dr. Manuel Hernández (Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México). Todos los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche en agitación a 4°C. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Amersham, NXA931) e IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Amersham, NXA934) a una dilución de 1:2000, por 1 h a temperatura ambiente. El revelado de la inmunoreacción se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando el ensayo de ECL-PLUS (Amersham RPN 2132). Los niveles de proteína fueron evaluados mediante densitometría usando el programa Image J (rsb.info.nih.gov/ij)^[71].

Focos de daño al DNA de γ H2A.X (S139) y ATM fosforilada (S1981).

Las células fueron crecidas en cámaras de cultivo de 8 pozos (Falcon 08-774-208), después de que las células fueron expuestas a PM₁₀ por 24 h, fueron fijadas en metanol a -20°C por 10 min. Para reducir la autofluorescencia, las células fueron tratadas con borohidruro por 5 min y lavadas tres veces con amortiguador de tris (TBS) pH 7.0. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados (BSA al 1%, NaN₃ 0.02% en TBS) por 1 h, después de la incubación, se le realizaron 2 lavados de 5 min con TBS. Para el doble marcaje se siguió un protocolo de inmunofluorescencia que puede revisarse en la siguiente página (<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11458>). Para el primer marcaje, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti γ H2AX (S139) (Upstate cat. No. 07-164) dilución 1:100 en 1 % de BSA-TBS, toda la noche a 4°C en un cámara húmeda. Después de la incubación las células fueron lavadas 3 veces por 5 min con TBS, posteriormente las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario (FITC conjugated goat anti-rabbit IgG de Jackson ImmunoResearch 111-095-144) dilución 1:100. Las células fueron lavadas 3 veces por 5 min con TBS. Como segundo paso se puso el siguiente anticuerpo primario anti ATM-P (S1981) (Upstate 05-740) en BSA al 1% en TBS, dilución 1:100, el anticuerpo secundario fue utilizado en una dilución 1:100 (Rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG de Jackson ImmunoResearch cat.115-025-166). Las condiciones y los tiempos fueron los mismos que los del primer anticuerpo. Las muestras fueron montadas usando ProLong antifade con DAPI (Molecular Probe P36935). Las imágenes fueron capturadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus AX70) y analizadas con el software SPOT, versión 4.0.4.

p53 total y p53(Ser15)

Las evaluaciones de estas proteínas se realizaron por ELISA con un ensayo comercial para determinar p53 total (Cell signaling # 7370) y p53(Ser 15) (Cell

signaling # 7365), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células A549 fueron sembradas en placas de 55 cm² y expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀, después de 24 h de exposición, las células se cosecharon bajo condiciones no desnaturalizantes para obtener los lisados utilizando buffer de lisis proporcionado por el fabricante. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el sobrenadante, el cual fue transferido a placas de 96 pozos e incubada con el anticuerpo primario anti p53 total o el anticuerpo anti p53(Ser15), después de incubar por 1 h a 37°C, se agregó el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (proporcionado en el estuche del ensayo). La placa se incubó por 30 min a 37°C. Se le agregó a la placa la solución de detención y 30 min después se leyeron las muestras a 405 nm (Genios™ plus, Tecan Trading AG, Switzerland). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

Ciclo celular

Después de que las células fueron expuestas a 10µg/cm² de PM por 24 h, se lavaron dos veces con PBS y se obtuvo el botón centrifugando a 1000 g por 5 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 300 µL de etanol al 70 % y se incubaron a -20°C toda la noche, posteriormente se centrifugaron a 2000 g por 5 min a 4°C, se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 2000 g por 5 min a 4°C. Para la evaluación del ciclo celular se tiñeron las células como sigue: se agregaron 200 µL de la solución A [en 100 mL de solución madre (3.4 mM de Citrato de Trisódico-2H₂O, 0.1 % v/v de Nonidet-P40, 1.5 mM de tetrahidrocloreuro de espermina y 0.5 mM de Tris), más 30 mg de Tripsina, pH 7.6)] por 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de la solución B (en 100 mL de solución madre se agregaron 50 mg de inhibidor de tripsina, 100 mg de Ribonucleasa A, pH 7.6) por 10 min a temperatura ambiente, finalmente se les agregó 200 µL de la solución C (en 100 mL de solución madre mas 416 mg de Ioduro de propidio, 1160 mg de tetrahidrocloreuro de espermina pH 7.6) por 15 min en hielo y se leyeron por citometría de flujo 10,000 eventos (FACSortBECTON DICKINSON), usando los software CellQuest y DodFit LT.

Apoptosis

La apoptosis se determinó mediante ioduro de propidio y anexina V fluoresceinada (Roche 18580777). Las células fueron expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} en placas de 6 pozos en medio libre de suero por 24, 48 y 72 h, después de cada tiempo de exposición las células fueron lavadas con PBS, despegadas con PBS-EDTA (1 %) y centrifugadas a 2000 *g* por 5 min. El botón obtenido fue resuspendido en 100 μL de la solución de anexina 5 (Annexin V FLUOS) e incubadas 15 min a 15°C antes de la lectura y el ioduro de propidio se agregó antes de que las muestras fueran leídas por citometría de flujo. Para determinar la fracción de células apoptóticas se leyeron 10,000 eventos en un citómetro de flujo FACSsort de Becton Dickinson equipado con el software Lysis II v2.0 para la adquisición de datos y el análisis se realizó con el software WindMi v2.9.

Senescencia celular asociada a β -galactosidasa

Para la evaluación de senescencia se utilizó la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA β -Gal), mediante la técnica descrita por Dimri *et al* (1995) ^[72]. Brevemente, después de que las células fueron expuestas a las PM por 24 o 48 h, se retiró el medio a las células, se agregaron 500 μl de solución fijadora (PIPES 0.1 M, pH 6.9; 2 % de paraformaldehído; MgCl_2 2 mM y EGTA 1.25 mM, pH 8.0) y se dejó incubar durante una hora a 37°C. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se realizaron tres lavados con PBS. Inmediatamente después se añadieron 300 μl de la solución de X-gal [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM; $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM, pH 6.0; X-gal 1 mg/ml (Promega)], y se incubaron las células toda la noche a 37°C. El porcentaje de actividad de β -galactosidasa se realizó contando 100 células por pozo en un microscopio invertido (Leica) y se capturaron las imágenes con una cámara digital (Coolpix P5100, Nikon). Los datos fueron reportados como porcentaje de células senescentes comparadas contra el control de células sin exponer.

Análisis estadístico

Los datos de los cometas se presentan en un diagrama de cajas y bigotes, en el que se calcula la mediana y los percentiles 25 y 75. Los otros experimentos son representados como el promedio $\pm$ DE (n=3). Los diferentes tratamientos fueron comparados usando un ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones individuales entre la media de los grupos. Los datos se consideraron estadísticamente significantes cuando el valor de p es $\leq$ a 0.05.

RESULTADOS.

Determinación de elementos químicos en las PM₁₀ de la ciudad de México

Las partículas presentaron un total de 12.5 µg de elementos químicos por miligramo de PM₁₀. Los elementos más abundantes fueron los que se encuentran asociados a suelo: [Al (15%), Si (51.09 %), Ca (14 %), y Fe (10 %)]. También se determinaron en cantidades menores, metales de origen antropogénico como Cu (0.2 %), Zn (0.5 %), Pb (0.17 %), y Ni (0.02 %) (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de elementos químicos en PM₁₀ colectadas en una zona urbano-comercial de la Ciudad de México

Elementos	µg/mg de PM ₁₀	Elementos	µg/mg de PM ₁₀
Al	15.60	V	0.08
Si	51.09	Cr	0.04
P	0.45	Mn	0.30
S	4.75	Fe	10.09
Cl	0.05	Ni	0.029
K	3.80	Cu	0.27
Ca	14.60	Zn	0.51
Ti	1.18	Pb	0.17

El contenido elemental se hizo mediante la técnica de PIXE (proton-induced X-ray emission) en 1 mg de PM₁₀ de la Ciudad de México

Generación de especies reactivas de oxígeno y cambios en los niveles de GSH

Después de que las células A549 fueron expuestas a las PM₁₀, se observó que las PM indujeron un incremento de 1.8 veces en la generación de ROS comparado con el control (Figura 1A), y este incremento fue significativo ($p = 0.001$). TLX previno la generación de ROS de manera significativa ($p=0.001$). En células preincubadas únicamente con TLX (CT-TLX) se observó una disminución de cerca del 30 % de las ROS comparada con el control. Las PM₁₀ disminuyeron cerca de un 60 % el contenido de glutatión comparado con el control ($p = 0.001$) (Figura 1B). TLX previno significativamente la disminución del GSH inducido por las PM₁₀ ($p = 0.001$) (Figura 1B). En las células que solo fueron tratadas con TLX no se observaron cambios en los niveles de GSH (Figura 1B).

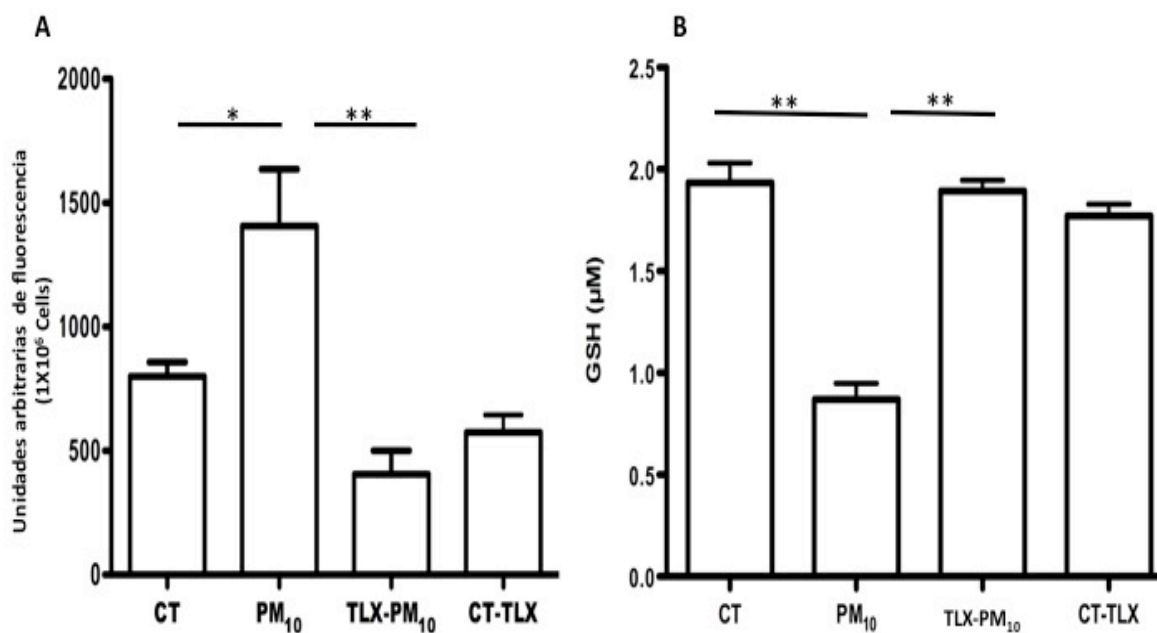


Figura 1. Generación de ROS y evaluación de los niveles de glutatión (GSH). A) La generación de ROS se evaluó mediante la fluorescencia de la molécula DA-DCFH. Los resultados son el promedio de seis experimentos independientes $\pm$ DE y se presentan como unidades de fluorescencia. * $p = 0.01$, CT vs PM₁₀; ** $p = 0.001$, PM₁₀ vs TLX-PM₁₀. B). Cambios en los niveles de GSH después de 24 h de exposición a PM₁₀. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes $\pm$ DE (** $p = 0.001$, CT vs PM₁₀; ** $p = 0.001$, PM₁₀ vs TLX-PM₁₀).

Las PM₁₀ disminuyen la actividad de las enzimas SOD y catalasa.

Las PM₁₀ disminuyeron un 60 % la actividad de SOD total ($p = 0.01$) (Figura 2A), y disminuyeron un 40 % la actividad de catalasa ($p = 0.01$) (Figura 2A). TLX no fue capaz de prevenir la disminución de la actividad de SOD total y catalasa inducida por las PM (Figura 2 A y B). TLX, no afecta la actividad de ambas enzimas (CT-TLX) (Figura 2 A y B).

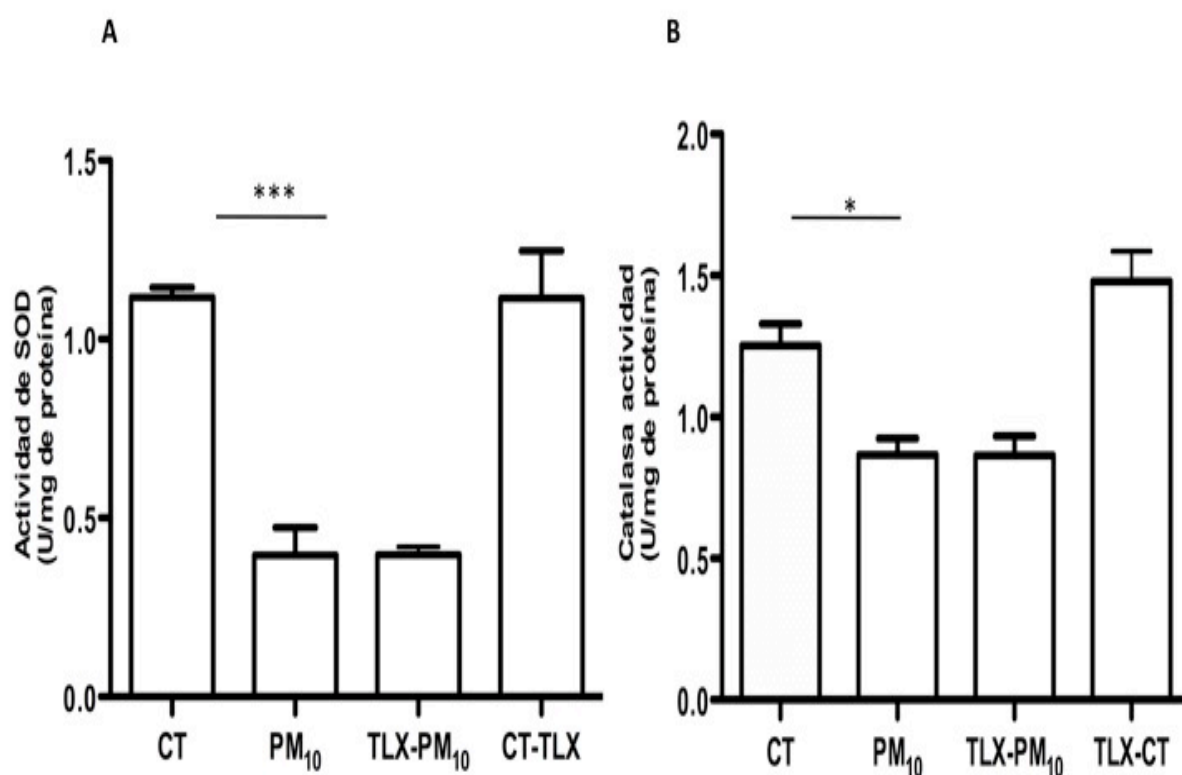


Figura 2. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa. Se evaluaron los cambios en la actividad de las enzimas SOD y catalasa en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ por 24 h. A). Evaluación de la actividad de SOD total, los resultados son el promedio de tres experimentos independientes $\pm$ DE (** p 0.001, PM₁₀ vs CT). B). Evaluación de la actividad de catalasa. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (* p = 0.01, PM₁₀ vs CT).

Las PM₁₀ inducen daño oxidante a lípidos y proteínas

Debido a que las PM₁₀ indujeron la generación de ROS, y disminuyeron la actividad de las enzimas antioxidantes en células A549 expuestas a 10µg/cm², se evaluó el daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA. Las PM₁₀ incrementaron significativamente la lipoperoxidación, determinada por la formación de MDA, comparada con el control ($p = 0.001$), TLX previno significativamente la oxidación de lípidos inducido por las PM ($p = 0.001$) (Figura 3A), sin llegar a los niveles basales. Cuando las células fueron expuestas solo a TLX (CT-TLX) se observó un incremento comparado con el control, sin embargo este incremento no fue significativo. Otro blanco importante del estrés oxidante evaluado fue la oxidación de proteínas, este tipo de daño se midió evaluando la carbonilación de proteínas y se observó que las PM₁₀ indujeron oxidación en las proteínas y TLX previno parcialmente este daño (Figura 3B). Cuando las células fueron tratadas solo con TLX (CT-TLX) no se observaron cambios comparados con el control (CT) (Figura 3).

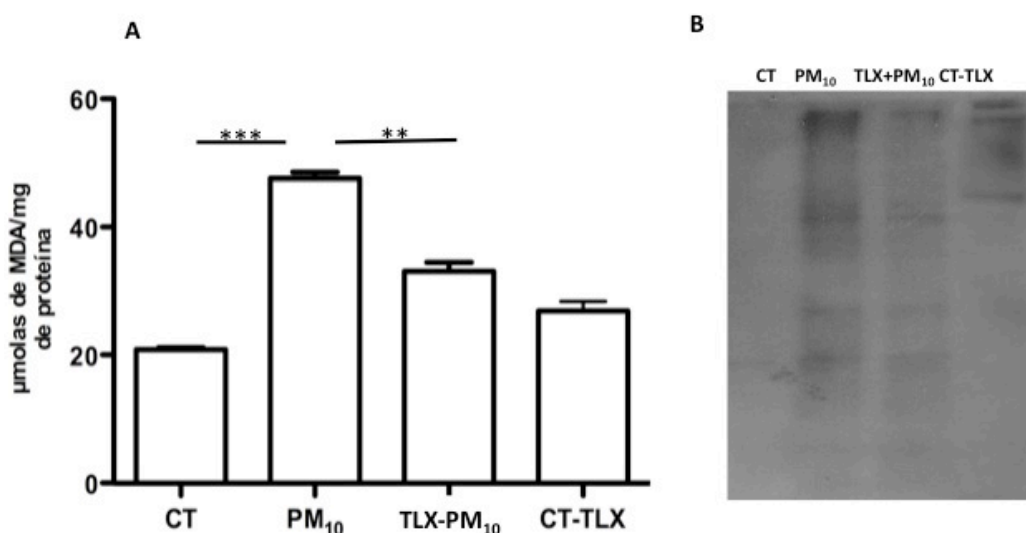


Figura 3. Daño oxidante a lípidos y proteínas inducidos por 10 µg/cm² de PM₁₀ en células A549. A) Evaluación de lipoperoxidación, mediante el contenido de MDA (** $p = 0.001$, PM₁₀ vs CT; ** $p = 0.01$, PM₁₀ vs TLX-PM₁₀). B) La oxidación de proteínas se evaluó mediante oxyblot y se utilizó un anticuerpo dirigido hacia los residuos carbonilo. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Las PM₁₀ inducen daño oxidante al DNA

En la figura 4 se observa que las PM₁₀ dañaron al DNA (rompimiento en la doble cadena del DNA), comparado con las células control ($p < 0.001$). Cuando las células que muestran daño en el DNA fueron pre-tratadas con TLX, antes de ser expuestas a las PM₁₀, se observó una prevención significativa ($p < 0.001$) de este daño. No se observaron cambios en la formación de cometas, cuando las células fueron tratadas solo con TLX (Figura 4).

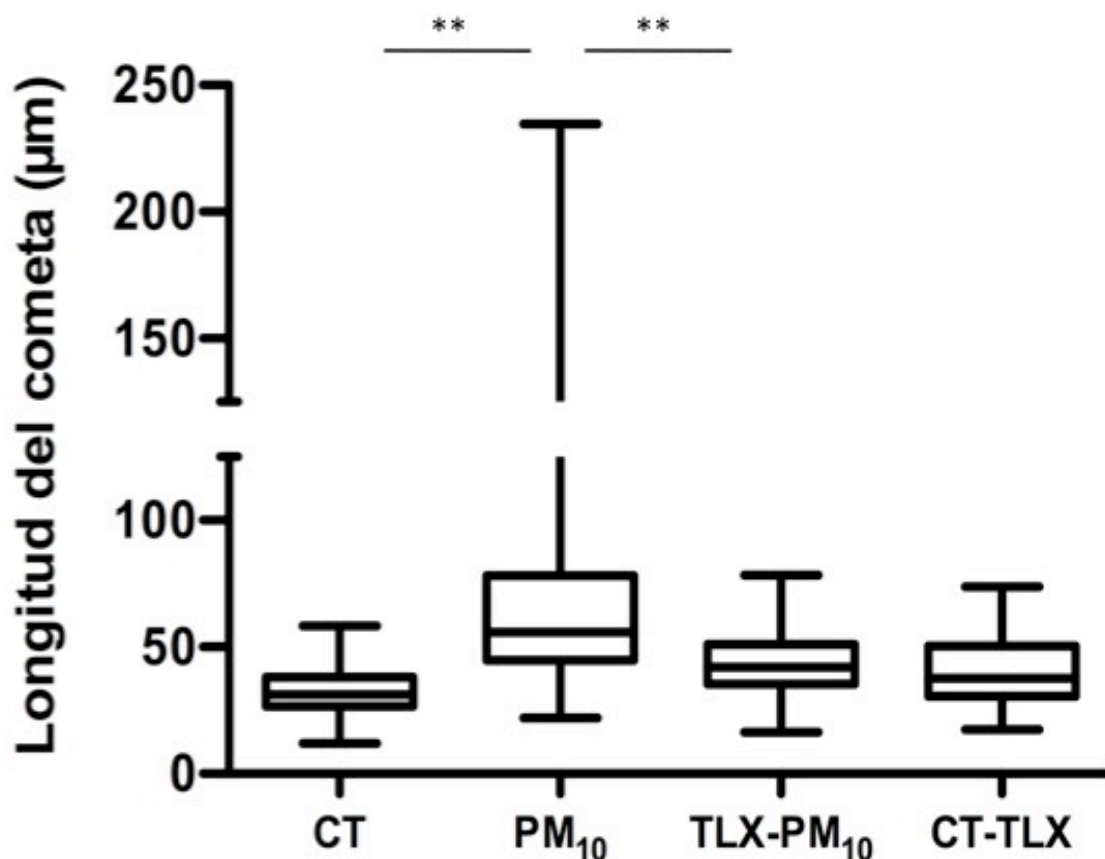


Figura 4. Daño a DNA inducido por PM₁₀ de la Ciudad de México. El daño a DNA se evaluó con la técnica del cometa en células A549 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24 h. Los resultados se presentan en un diagrama de cajas y bigotes, en el que se calcula la mediana y los percentiles 25 y 75 (** $p < 0.001$, PM₁₀ vs CT; ** $p < 0.001$ PM₁₀ vs TLX-PM₁₀).

Rompimiento en doble cadena del DNA y cambios en las cinasas ATM/ATR y 53BP1

En la figura 5 y la tabla 2 se observa que la exposición a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} incrementó 1.8 veces la proteína ATM fosforilada en serina 1981. Las PM_{10} no indujeron cambios en el nivel de expresión de ATR total, sin embargo, disminuyeron la presencia de ATR fosforilado en serina 428, comparado con el control de células sin exponer y TLX no impidió ésta disminución (Figura 5, tabla 2). También se observó un incremento de 2.8 veces en la proteína $\gamma\text{H2A.X}$. La fosforilación de H2A.X fue prevenida con TLX (1.27 veces), así como la fosforilación de ATM. La proteína 53BP1 juega un papel importante en la reparación de daño al DNA y esta proteína se incrementó 3.64 veces después de 24 h de exposición de las células A549 a PM_{10} . TLX previno este incremento en la expresión de 53BP1 (Figura 5, Tabla 2). TLX (CT-TLX), no tuvo efecto sobre los niveles basales de las proteínas.

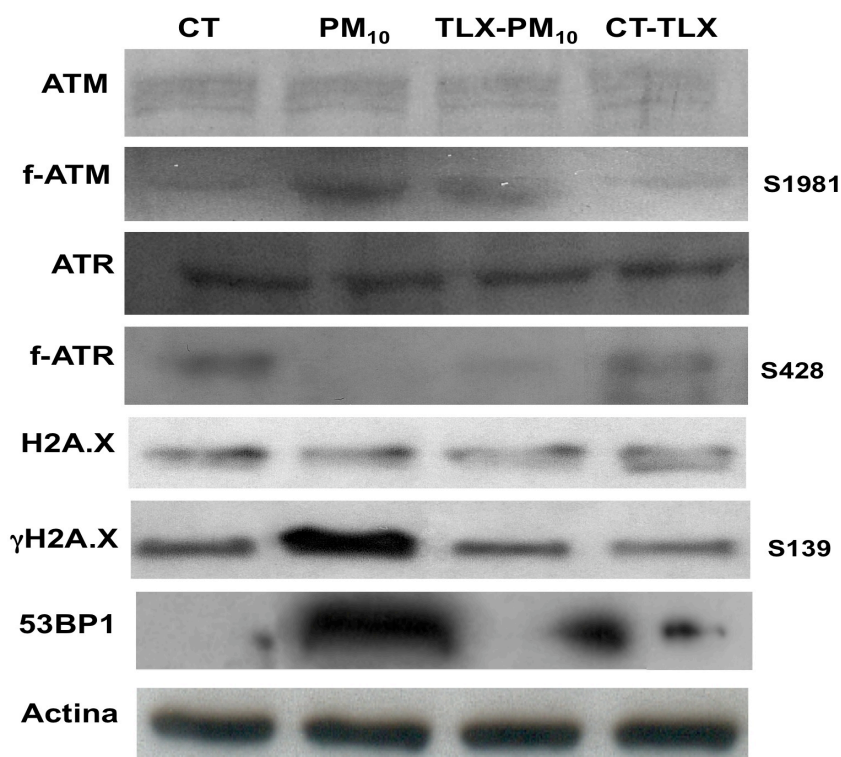


Figura 5. Mecanismo de respuesta ante daño a DNA inducido por las PM_{10} de la ciudad de México. Mediante Western blot se evaluaron los cambios en los niveles de expresión, así como la activación de H2A.X, $\gamma\text{H2A.X}$, ATM, ATM fosforilada, 53BP1, ATR y ATR fosforilada en células A549 expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24 h. La imagen mostrada es representativa de tres experimentos independientes. TLX se utilizó como un secuestrador de radicales libres.

ATM se asocia a sitios de corte en doble cadena del DNA.

Después de exponer las células A549 a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , la células fueron tratadas con los anticuerpos anti- $\gamma\text{H2A.X}$ y de anti-ATM y por inmunofluorescencia se estableció la formación de focos de ATM fosforilada asociada con $\gamma\text{H2A.X}$. Cuando las células fueron preincubadas con TLX, la señal de los focos disminuyó, como consecuencia de la prevención de la formación de DSB inducidos por las PM_{10} (Figura 6). Cuando las células fueron tratadas solo con TLX (CT-TLX), no se observaron cambios comparados con el control (CT).

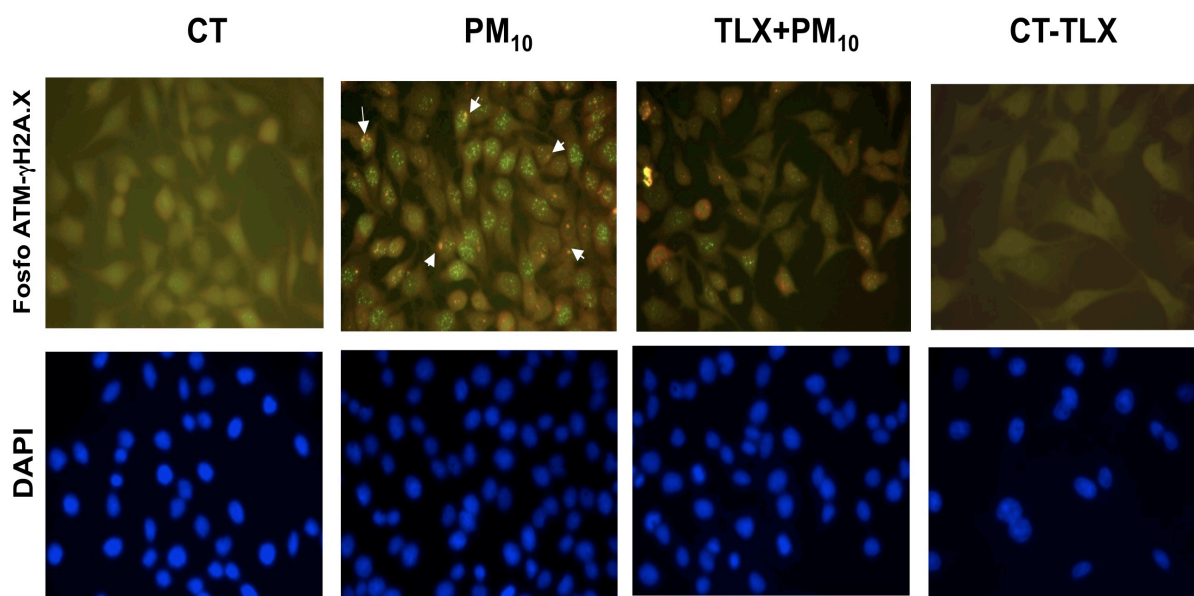


Figura 6. Formación de focos de ATM fosforilada y $\gamma\text{H2A.X}$. Evaluación de focos de ATM fosforilada en serina 1981 (S1981) y $\gamma\text{H2A.X}$ fosforilada en serina (S139) en células A549 expuestas por 24 h a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} y células pre-incubadas con TLX. En el panel superior se muestra una fusión de las imágenes de las células incubadas con anticuerpo para ATM (S1981) y $\gamma\text{H2A.X}$ (1S39). Las flechas muestran los lugares donde se observa focos. En el panel de abajo se muestra el control de células teñidas con DAPI. TLX se utilizó como un secuestrador de radicales libres.

Activación de las proteínas Chk2, Chk1 y CDC25A vía ATM y ATR

Las proteínas Chk2 y Chk1 son blancos de ATM y ATR. Las PM₁₀ incrementaron 1.27 veces los niveles de la proteína Chk2 (Tabla 2) y no se detectaron cambios en Chk2 fosforilada en treonina 68 (Figura 7), TLX previno este incremento. Por otro lado, las PM disminuyeron cerca del 17 % los niveles de la proteína Chk1 (Figura 7, Tabla 2) y se observó un incremento de 2.5 veces en Chk1 fosforilada en serina 318, TLX no previno este incremento (Figura 7, Tabla 2). La proteína Cdc25A es un sustrato de Chk1 y después que las células A549 fueron expuestas por 24 h a 10 µg/cm² de PM₁₀ se observó una disminución del 41 % en los niveles de Cdc25A, así mismo, este tratamiento también indujo una reducción del 60 % en Cdc25A fosforilada. TLX no previno la disminución en los niveles de la proteína y de la fosforilación en Cdc25A (Figura 7, Tabla 2). TLX no tuvo efectos sobre el nivel basal de la proteínas (CT-TLX) (Figura 7).

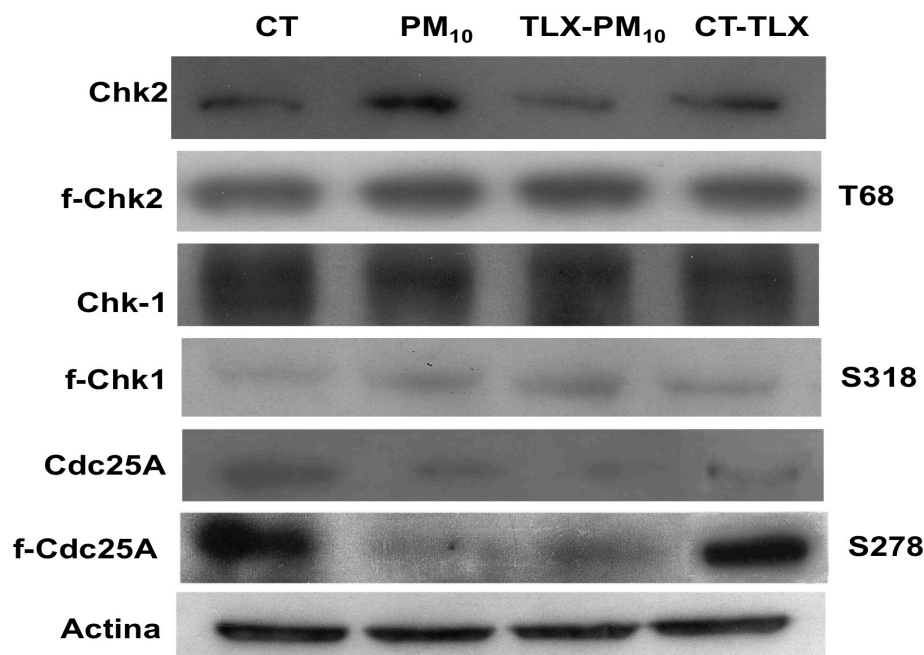


Figura 7. Efectos de las PM₁₀ en proteínas que participan en la detención del ciclo celular ante daño al DNA. Mediante Western blot se evaluaron los cambios en los niveles de proteína y fosforilación de Chk2/Chk2 fosforilada en treonina 68 (T68), Chk1/Chk fosforilada en serina 317 (S317) y Cdc25A/Cdc25A fosforilada en serina 278 (S278). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. TLX se utilizó como un secuestrador de radicales libres.

Tabla 2. Expresión de proteínas (cambios con respecto al control)

	f-ATM	γ H2A.X	53BP1	Chk2	Chk1	f-Chk1	Cdc25A	f-Cdc25A	MDM2
PM₁₀	1.7 $\pm 0.12^a$	2.81 $\pm 0.15^a$	3.64 $\pm 1.01^b$	1.27 $\pm 0.10^c$	0.83 $\pm 0.01^c$	2.5 $\pm 0.79^c$	0.59 $\pm 0.08^a$	0.41 $\pm 0.01^a$	Nd
TLX+PM₁₀	1.03 $\pm 0.13^d$	1.27 $\pm 0.22^d$	1.47 $\pm 0.30^e$	0.93 $\pm 0.13^f$	0.90 ± 0.09	2.4 $\pm 0.56^c$	0.61 $\pm 0.07^a$	0.50 $\pm 0.14^b$	0.74 $\pm 0.07^d$

PM₁₀: Material Particulado (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); PM₁₀+TLX: Material Particulado (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) más trolox (10 μM). Histona H2A.X fosforilada en serina 139: γ H2A.X; Ataxia Telangiectasia mutada fosforilada en serina 1981(f-ATM), Proteína de unión a p53, 53BP1; cinasa de revision 2, Chk2; cinasa de revisión 1, Chk1, Chk1 fosforilada en serina 317, f-Chk1; Proteína de división celular 25 A, Cdc25A; Cdc25A fosforilada en serina 278, f-Cdc25A; Ubiquitin ligasa E3 específica de p53, MDM2. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes $\pm$ DE. ^ap<0.001, ^bp<0.01, ^cp<0.05 vs control; ^dp<0.001, ^ep<0.05, ^fp<0.05 vs PM₁₀.

Expresión de p53.

Cuando las células A549 fueron expuestas a las PM₁₀ indujeron un incremento tanto en el nivel total de p53, así como en p53(Ser15), y TLX previno este incremento (Figura 8). TLX (CT-TLX), no afectó los niveles basales de p53. La activación de p53 está relacionada con la pérdida de interacción de MDM2 con p53. Cuando las células A549 fueron expuestas a las PM₁₀ se observó una pérdida total de MDM2 y TLX previno ésta pérdida, observándose una recuperación del 74 % (Figura 8, Tabla 2). Los niveles basales de MDM2 no se vieron afectados por el tratamiento de las células con TLX.

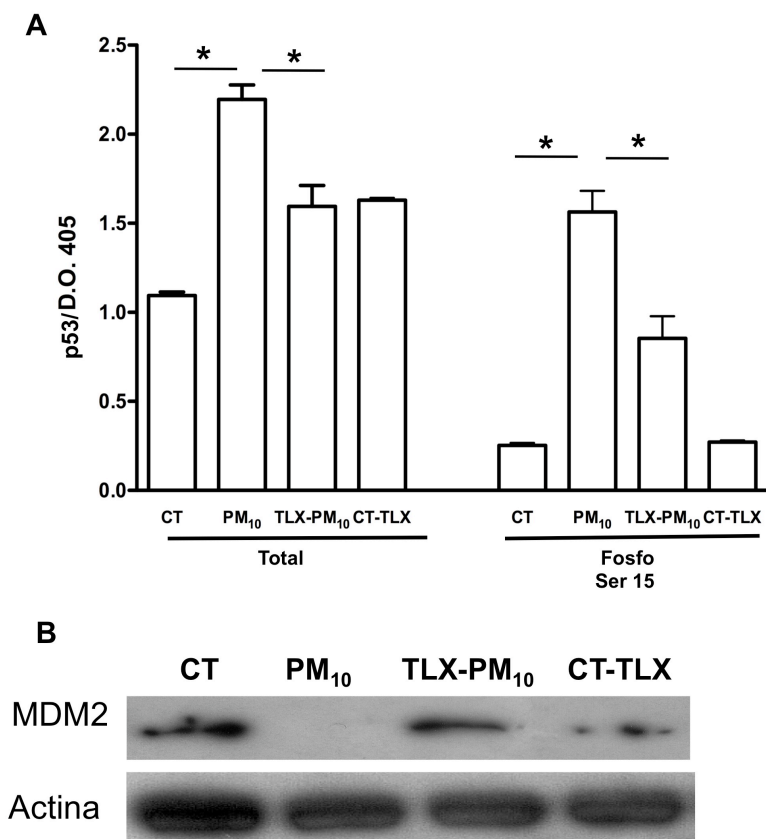


Figura 8. Evaluación de proteínas de respuesta ante daño a DNA inducida por PM₁₀. A) Expresión de la proteína p53 y p53 fosforilada en Serina 15 en células A549 expuestas por 24 h a 10 µg/cm² de PM₁₀. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes ± DE (**p* = 0.0001). B) Efecto en células A549 expuestas a PM₁₀ y TLX sobre la expresión de la proteína MDM2. La figura es representativa de tres experimentos independientes. Se utilizó actina como control de carga.

Las PM₁₀ no inducen cambios en el ciclo celular y no inducen apoptosis.

Después de 24 h de exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀, las células mostraron activación de las vías de ATM/ART/Chk1/Chk2/p53, sin embargo no se observaron cambios en los porcentajes de la distintas fases del ciclo celular (Tabla 3), siendo muy similares los porcentajes de células expuestas a las PM₁₀ al control. Por otro lado, las PM₁₀ tampoco indujeron apoptosis, ya que no se observaron cambios significativos con respecto al control (Tabla 3). En células tratadas solo con TLX (CT-TLX), no se observaron alteraciones en las fases del ciclo celular (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las fases del ciclo celular y apoptosis en células A549 expuestas a PM₁₀ de la ciudad de México

	Fase celular (%)			Apoptosis (%)
	G0-G1	S	G2-M	
CT	58.6 ± 4.6	26.8 ± 10.1	14.4 ± 7.0	0.03 ± 0.005
PM₁₀	57.7 ± 2.7	25.3 ± 7.2	16.9 ± 4.7	0.07 ± 0.01
PM₁₀-TLX	54.1 ± 7.9	27.8 ± 9.9	20.3 ± 6.6	0.02 ± 0.005
CT-TLX	61.4 ± 5.4	24.1 ± 13.06	14.4 ± 7.6	0.01 ± 0.2

CT: control; PM₁₀: Material Particulado (10 µg/cm²); TLX- PM₁₀: Material Particulado (10 µg/cm²) más trolox (10 µM); TLX-CT: Control mas trolox. Distribución del ciclo celular y apoptosis después de 24 h de exposición a PM₁₀. Las evaluaciones se hicieron por citometría de flujo. Se presenta el promedio de 3 experimentos independientes ± DE.

Las PM₁₀ inducen senescencia celular asociada a β galactosidasa.

Las PM₁₀ indujeron estrés oxidante y un incremento en la actividad de p53 y ambos eventos juegan un papel importante en la inducción de senescencia celular, por lo que se analizó si en células A549, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ inducían senescencia. Después de 24 h de exposición a las PM₁₀, no se detectó senescencia asociada a β -galactosidasa (datos no mostrados), sin embargo, a las 48 h de exposición a las PM₁₀ se observó un incremento significativo de cerca del 50 % de células positivas a β -galactosidasa comparadas con el control ($p = 0.001$), cuando las células A549 fueron pre-incubadas con TLX, la actividad de β -galactosidasa disminuyó significativamente ($p = 0.001$) (Figura 9). TLX (CT-TLX), no induce cambios en la actividad de β -galactosidasa, comparado con el control.

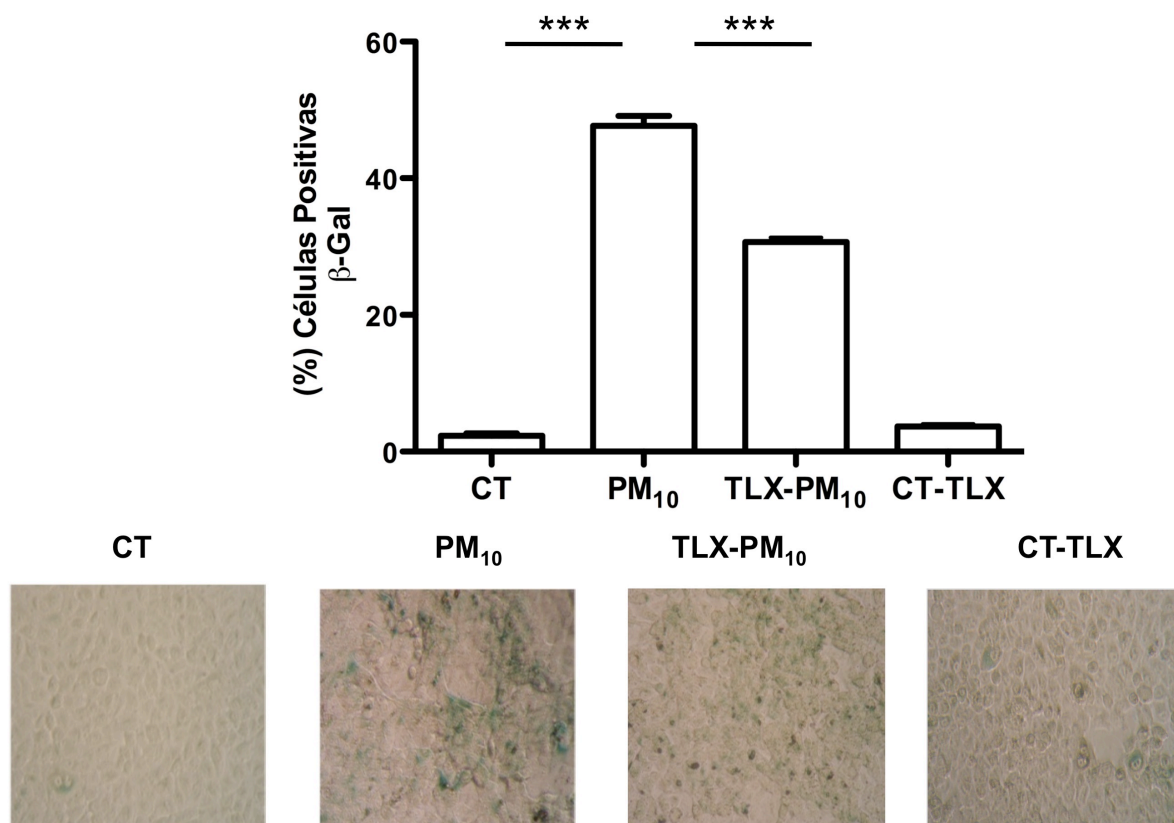


Fig. 10. Senescencia inducida por PM_{10} . Senescencia celular asociada a β -galactosidasa en células A549 expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 48 h. La senescencia se evaluó mediante la actividad de β -galactosidasa. Se contaron 100 células por punto evaluado, los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas a β -galactosidasa y son el promedio de tres experimentos independientes $\pm$ DE (** $p = 0.001$; PM_{10} vs CT; PM_{10} vs TLX- PM_{10}).

DISCUSIÓN

Debido a su tamaño aerodinámico las PM₁₀ tienen la capacidad de penetrar en las vías respiratorias profundas e inducir efectos adversos en la salud del ser humano^[73], y en los últimos años se ha demostrado que las PM son un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de neoplasias^[2,15,16]. Diferentes grupos de investigación han demostrado que la composición de las PM es muy importante en los efectos biológicos que inducen; así como por la capacidad que tienen para inducir la generación de ROS^[17,19,74-76].

Para conocer más acerca de los mecanismo implicados en la inducción de los efectos mediante los cuales las PM₁₀ inducen daño celular, en este trabajo se utilizó como modelo la línea celular A549 (células epiteliales tipo II, derivadas de un carcinoma de pulmón humano). Esta línea celular ha sido ampliamente caracterizada, y se sabe que expresa a p53 de manera silvestre y que tiene sensibilidad al estrés oxidante, por lo que ha sido utilizada para estudios de daño genotóxico^[77] y también en estudios de evaluación de los efectos celulares promovidos por aeropartículas contaminantes^[44,76].

La concentración de PM₁₀ utilizada en este trabajo no indujo cambios en la viabilidad celular (datos no mostrados), por lo que se consideró como una concentración subletal, que tuvo la capacidad de inducir diferentes efectos importantes, por su participación en inducir procesos carcinogénicos y la respuesta celular ante ellos.

La generación de ROS inducida por las PM se ha atribuido a la participación de algunos componentes de las PM₁₀, incluyendo PAH^[78], endotoxina y metales como cobre, hierro, vanadio, zinc y plomo^[75]. Los PAH requieren de la activación metabólica para producir ROS y los metales inducen la generación de ROS vía la reacción de Fenton. Por otro lado, la endotoxina es otro de los componentes de las PM y se sabe que al igual que los PAH, la producción de ROS se da de manera indirecta, ya que la endotoxina, despierta una respuesta inflamatoria, donde se activan diferentes citocinas como TNF α , IL-6 y este proceso inflamatorio es el que lleva a un estado de estrés oxidante. La utilización de inhibidores de la endotoxina

en experimentos con PM ha permitido determinar la participación de ésta en los efectos inducidos por las PM^[79]. En este trabajo se determinó que las PM₁₀ indujeron estrés oxidante, ya que se observó la generación de ROS y la disminución de un 60 % en el contenido de GSH, así como daño oxidante a macromoléculas. Los trabajos previos apoyan fuertemente que el incremento de las ROS y la disminución en el contenido de glutatión, pueden ser atribuidos a componentes de las PM, como los metales, la endotoxina y los PAH.

Si bien, algunos de los componentes de las PM como los metales pueden ser internalizados a las células y generar radical hidroxilo, como ya se ha demostrado previamente^[21], otros componentes de las PM₁₀ pueden inducir efectos por acción de la endotoxina que ejerce su efecto a través de la estimulación del receptor de Toll-like 4, un receptor que es expresado en células A549^[80].

Puesto que la generación de ROS ocurre como parte del metabolismo de una célula normal, existen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que se encargan del manejo de éstas especies^[81]. Dichos sistemas trabajan de manera conjunta para prevenir un ambiente oxidante capaz de promover alteraciones que conduzcan a patologías, como el cáncer.

En este trabajo se determinó que las PM₁₀ disminuyeron tanto la actividad de SOD total (60 %); así como la de catalasa (40 %). En cuanto a la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, se ha reportado que en raspados nasales de personas que viven en la ciudad de México, la concentración de la proteína GPX es menor, comparada con muestras de personas que viven en una zona con baja o nula contaminación del aire^[66]. En cuanto a otras enzimas antioxidantes como catalasa, en ratas instiladas con partículas urbanas se disminuye la actividad de esta enzima^[64]. En un trabajo con enzimas aisladas, se reportó que cuando las enzimas Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y GPX son expuestas a partículas con diferente contenido de metales, la actividad de estas enzimas se ve disminuida, proponiendo que los metales, pueden estar participando en la disminución de la actividad por interacción directa con éstas enzimas^[65], esto es por la sustitución del metal de la enzima por otro que impide su actividad. Estos datos concuerdan con los resultados encontrados en este trabajo, y dado que TLX no previno la disminución de la

actividad de ambas enzimas, en este trabajo se propone que los metales pudieran estar jugando un papel crucial en la disminución de la actividad de éstas enzimas mediante una posible interacción directa con ellas, sin embargo, es necesaria la realización de otros experimentos para demostrarlo, como sería la realización cristalografía de rayos-X, para determinar ésta interacción entre las enzimas y los componentes de las PM. Posiblemente las PM₁₀ inducen estrés oxidante en las células A549, debido a la disminución en la actividad de SOD y catalasa y otras enzimas de las vías del manejo de radicales libres.

Las PM₁₀ utilizadas en este trabajo indujeron lipoperoxidación, carbonilación de proteínas y la formación de cometas, debió a la formación de radicales hidroxilo, los cuales probablemente fueron manejados inadecuadamente por la células, ya que se observó que las PM₁₀ disminuyen la actividad de SOD y catalasa, y cuando las células fueron preincubadas con TLX, se observó una prevención del daño oxidante a éstas macromoléculas, lo que sugiere la participación de las ROS en éstos eventos.

Hasta este punto del trabajo, se tiene un ambiente celular que a largo plazo podría ser capaz de desencadenar eventos que favorezcan un proceso neoplásico, pero las células cuentan con toda una maquinaria que les permite enfrentarse a estas alteraciones y de ser posible reparar el daño. La siguiente parte del trabajo va dirigida hacia evaluar algunos de estos mecanismos

Debido a que el daño al DNA tiene gran relevancia en procesos carcinogénicos y buscando conocer con mayor profundidad los mecanismos mediante los cuales las PM causan daño celular, se evaluaron marcadores de daño al DNA por rompimiento en doble cadena (DSB). Una vía de señalización importante que se activa ante daño por DSB es iniciada por la autofosforilación de ATM y por la fosforilación de ATR. En este trabajo se observó que las PM₁₀ inducen la fosforilación de ATM, ésta proteína es un dímero que se encuentra en su forma inactiva y es necesario que se autofosfore para su activación^[82], el antioxidante TLX previno la fosforilación de ATM por las PM₁₀. La fosforilación de ATR disminuyó después de que las células fueron expuestas a las PM₁₀ y TLX no previno ésta disminución. Es importante mencionar que como parte de su

mecanismo de activación, ATR es reclutada e interactúa con proteínas que interaccionan con ella ^[83-85], por lo que la disminución en la fosforilación de ATR, puede ser atribuida a la interacción de esta con otras proteínas.

La proteína ATM activada, fosforila a H2A.X (γ H2A.X) y ambas proteínas activadas promueven el reclutamiento de diferentes proteínas en el lugar, formando lo que se conoce como focos de daño al DNA^[86]. En este trabajo se observó que las proteínas ATM y γ H2A.X colocalizan en focos de daño al DNA cuando las células son expuestas a las PM₁₀, lo cual sugiere que ATM fosforila a H2A.X en respuesta a estrés oxidante, ya que TLX fue capaz de prevenir la activación de ambas proteínas. Debido a que las PM₁₀ inducen la activación de ATM, se evaluó a la proteína 53BP1, por ser un sustrato de ATM que ayuda al reclutamiento del complejo de ATM con γ H2A.X y su sobre-expresión esta relacionada con incremento en ROS y reparación del DNA. Las PM₁₀ indujeron la sobre-expresión de 53BP1 y ésta disminuyó cuando las células fueron preincubadas con TLX. La proteína 53BP1 también esta asociada a varias proteínas involucradas en vías de reparación de DSB, incluyendo Mre 11, Fosfo-ATM (S1981) y fosfo-Chk2 (T68)^[87]. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, se observó que las PM₁₀ inducen inestabilidad genómica, ya que inducen sensores (53BP1), transductores (ATM/ATR) y efectores (γ H2A.X) de daño al DNA, y esto correlaciona con la formación de focos de daño al DNA en donde colocalizan ATM y γ H2A.X.

Las cinasas ATM y ATR activan proteínas como Chk1 y Chk2 mediante la fosforilación de residuos de serina o treonina, y Chk1 y Chk2 son particularmente importantes, ya que ellas fosforilan otros sustratos para mantener la estabilidad genómica después del daño al DNA. En este trabajo se determinó que la proteína Chk2 se incrementa, y no se observaron cambios en Chk2 fosforilada después de que las células fueron expuestas a las PM₁₀. Con respecto a este resultado, se debe de tomar en cuenta que todas las evaluaciones se hicieron a un solo tiempo (24 h), por lo que existe la posibilidad que Chk2 fosforilada se encuentre en condiciones normales en este punto, y que la proteína fosforilada ya haya disminuido. Esta propuesta se basa en reportes recientes, que dicen que el pico de fosforilación de Chk2 no coincide con la activación de ATM y H2A.X^[88], por lo que

sería importante evaluar si esta proteína se está activando a otros tiempos.

En contraste, después de la exposición a las PM₁₀, se observó un incremento en Chk1 fosforilada (S317), y no se observaron cambios con TLX. En continuidad a la vía, las PM₁₀ indujeron la degradación de Cdc25A y de Cdc25A fosforilada y TLX tampoco fue capaz de prevenir estos cambios, por lo que si Chk1 se incrementa por la exposición a las PM₁₀ y Cdc25A disminuye, se propone que Chk1 fosforila a Cdc25A, lo que hace que ésta proteína sea degradada, concordante con el papel que se le atribuye como principal característica de ésta proteína ante daño al DNA^[41,89].

Por otro lado, se observó que las PM₁₀ promueven la fosforilación de p53 en la Serina 15 y la pérdida de la proteína MDM2, un regulador negativo de p53, efectos que si fueron prevenidos por TLX, lo que sugiere la participación del estrés oxidante en esta vía. La proteína p53 es un gen supresor de tumor y participa en el control del ciclo celular y la apoptosis^[90,91]. Dependiendo del tipo y del ambiente celular, y de las alteraciones oncogénicas, la activación de p53 puede llevar a las células a detener el ciclo celular, inducir la senescencia celular, diferenciación o apoptosis^[92].

Las PM₁₀ inducen la formación de focos de γ H2A.X y ATM, y este daño es detectado por la vía de ATM/ART/Chk1/Chk2/p53, como se muestra en el esquema de la figura 10. Por lo que se puede decir que en células A549 las PM₁₀ inducen estrés oxidante y efectos genotóxicos, determinados por el rompimiento en la doble cadena de DNA (DSB). Si bien, se sugiere que en los focos de daño al DNA se lleva a cabo el reclutamiento de proteínas que participan en la reparación del daño al DNA, ésta reparación podría no ser eficiente, ya que existe un reporte reciente que estableció que la exposición de células a PM urbanas reducen un 35 % la capacidad de reparación del DNA por escisión de nucleótidos y se incrementa cinco veces la frecuencia de mutaciones^[93]. Se sabe que una reducción en la reparación del DNA está asociado con un incremento en mutagénesis, lo que es un factor muy importante en el desarrollo de neoplasias.

A pesar del daño al DNA y activación de vías que están relacionadas con la detención del ciclo celular (Figura 10), a las 24 h de exponer las células A549 a 10

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , no se observó detención del ciclo celular y las PM no indujeron apoptosis. Sin embargo, a las 48 h de exposición a las PM_{10} se observó un estado de senescencia celular. Además de los programas de muerte celular, tales como apoptosis y la autofagia, la senescencia es reconocida como una potente barrera contra la transformación oncogénica, ya que es importante en reprimir la proliferación de células neoplásicas.

La senescencia, se determina mediante un aumento en la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia y condensación de cromatina^[42,72,94]. En este trabajo se activaron algunos de los marcadores principales asociados a senescencia como la proteína p53^[95,96], así como γH2AX , y la actividad de Chk1 y Chk2^[42,97] (Figura 10), pero se sabe que otras proteínas como p16INK4a, p21^{CIP1/WAF1}, PAI-1, que no fueron evaluadas en éste trabajo, también son importantes en la senescencia celular. El fenotipo de senescencia se ha caracterizado por la secreción de factores asociados a senescencia (SAP) entre los que se encuentran IL-6 e IL-8^[98]. La secreción de estos factores altera el microambiente del entorno celular con repercusión en el estado de p53 y otras proteínas como RAS, que tienen efectos deletorios en las células. En el contexto de la carcinogénesis, diferentes grupos han observado células senescentes en la fase temprana de procesos neoplásicos en diferentes tumores en humanos y han mostrado que las células expresan marcadores de senescencia en la etapa inicial de la formación del tumor^[99,100]. Si bien, por muchos años se consideró a la senescencia como una barrera contra la formación de neoplasias, actualmente se sabe que las células senescentes “a largo plazo”, juegan un papel importante en la inducción de células preneoplásicas, ya que tienen impacto en su microambiente, induciendo por ejemplo, proliferación en células vecinas, por la inducción de mitógenos^[96]. También generan un ambiente oxidante, a través de la inducción de citocinas como IL-6 e IL-8, citocinas que se sabe son alteradas por las PM^[18,62,67].

A pesar de la formación de DSB, el incremento en la actividad de p53 y la presencia de células senescentes por las PM_{10} , no se observaron cambios en el ciclo celular (Figura 10). En este sentido se ha reportado que estos elementos no son suficientes para mantener la detención del ciclo celular^[101] ya que es necesaria

la participación de otras proteínas, tales como p21^{Waf1/Cip1} y p16INK4a para inducir un estado permanente de senescencia^[102]. Por otro lado, la inactivación de cinasas de puntos de revisión en DNA en eventos senescentes, pueden restaurar la progresión de la fase “S” del ciclo celular y la eficiencia en la detención del ciclo celular en células senescentes, depende de la continua actividad de cinasas de punto de revisión^[46]. También se sabe que las células A549 estimuladas con TGF- β 1, muestran positividad a β -galactosidasa, sin una inmediata detención del ciclo celular^[103].

En este trabajo se determinó que las PM₁₀ inducen la formación de ROS, así como daño oxidante a lípidos, proteínas y DNA. Las PM₁₀ indujeron daño al DNA por rompimiento en doble cadena, se observaron focos de daño al DNA y se activaron proteínas de reparación del daño al DNA, sin embargo no se observaron cambios en las fases del ciclo celular y no se observó apoptosis. También se determinó que la exposición a las PM₁₀ inducen SA- β -galactosidasa en aproximadamente el 50% de células. El daño oxidante y el daño genotóxico; así como el hecho de que las células no mueren, puede generar un entorno que a largo plazo podría favorecer el desarrollo de cáncer de pulmón. Concomitante a este resultado, la senescencia es un evento que está relacionada con la vía de respuesta de daño al DNA mediada por ATM y la activación de p53; así como por el estrés oxidante y las células senescentes son capaces alterar su microambiente. El estrés oxidante, el daño genotóxico y probablemente el microambiente alterado por las células senescentes, son eventos que si se mantienen a largo plazo, podrían ser importantes en los mecanismos por los cuales las PM aumentan el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón ^[2,11,13].

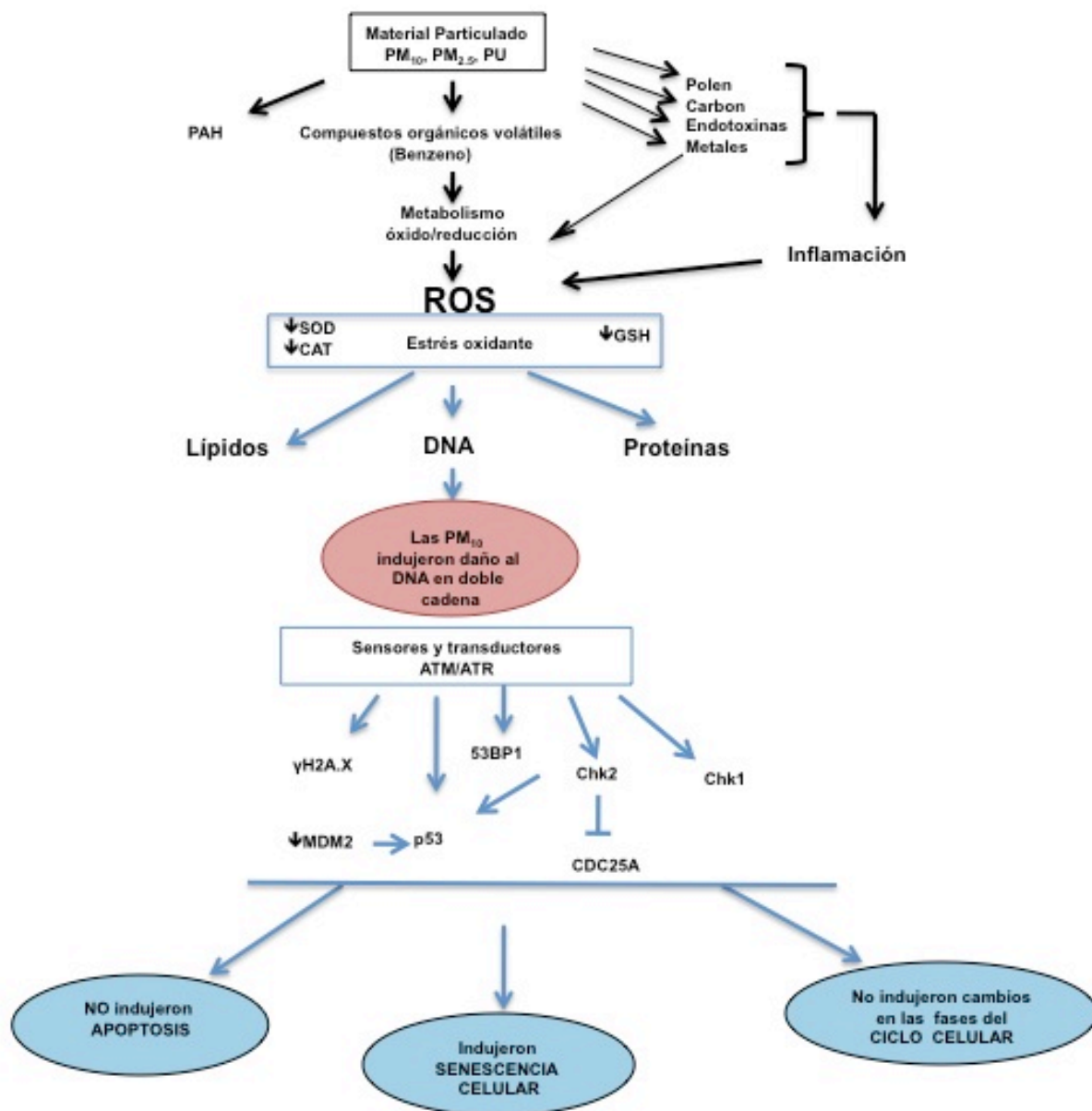


Figura 10. Eventos y respuesta celular inducida por las PM₁₀ mediante la generación de radicales libres.

CONCLUSIONES

- Las PM₁₀ generan un ambiente pro-oxidante por inducir la generación de ROS y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa.
- Las PM₁₀ inducen daño oxidante a lípidos, proteínas y al DNA.
- Las PM₁₀ inducen vías de respuesta relacionadas al daño al DNA en doble cadena y proteínas de reparación ante este daño.
- Las PM₁₀ no inducen cambios en el ciclo celular.
- Las PM₁₀ indujeron un estado de senescencia celular.
- En este trabajo se concluye que las PM₁₀ inducen estrés oxidante, daño genotóxico y un estado de senescencia, eventos fuertemente relacionados en la inducción de neoplasias.

PERSPECTIVAS

- Evaluar otras enzimas antioxidantes, como las encargadas del metabolismo del glutatión (glutatión sulfidril transferasa y glutatión reductasa).
- Evaluar otras proteínas que participan en la senescencia celular como p14 y p16, p21^{Waf1/Cip1} o RAS, que podrían estar jugar un papel importante en impedir que se lleve a cabo la detención del ciclo celular.
- Utilizar células “normales” como las BEAS-B2, para determinar si los efectos son iguales o diferentes, comparados con células derivadas de una neoplasia.
- La utilización de animales, como ratas, las cuales sean instiladas a las PM o expuestas directamente a las PM en ambientes altamente contaminados, para determinar si los eventos encontrados en este trabajo son similares.

REFERENCIAS

1. Miranda, J.; Rodríguez-Fernández, L.; De Lucio, O. G.; López, K.; Haranda, J. A. A new beamline for characteristics X-ray experiments at the pelletron accelerator. *Rev Mex Fis* 46:367-372; 2000.
2. Pope, C. A.; Dockery, D. W. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* 56:709-742; 2006.
3. Chow, J. C. Measurement methods to determine compliance with ambient air quality standards for suspended particles. *J Air Waste Manag Assoc* 45:320-382; 1995.
4. Brauer, M.; Avila-Casado, C.; Fortoul, T. I.; Vedal, S.; Stevens, B.; Churg, A. Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect* 109:1039-1043; 2001.
5. Chow, J. C. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* 56:707-708; 2006.
6. Rojas-Martinez, R.; Perez-Padilla, R.; Olaiz-Fernandez, G.; Mendoza-Alvarado, L.; Moreno-Macias, H.; Fortoul, T.; McDonnell, W.; Loomis, D.; Romieu, I. Lung function growth in children with long-term exposure to air pollutants in Mexico city. *Am J Respir Crit Care Med* 176:377-384; 2007.
7. Balashazy, I.; Hofmann, W.; Heistracher, T. Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *J Appl Physiol* 94:1719-1725; 2003.
8. Donaldson, K.; Stone, V.; Borm, P. J.; Jimenez, L. A.; Gilmour, P. S.; Schins, R. P.; Knaapen, A. M.; Rahman, I.; Faux, S. P.; Brown, D. M.; MacNee, W. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* 34:1369-1382; 2003.
9. Kulkarni, N.; Pierse, N.; Rushton, L.; Grigg, J. Carbon in airway macrophages and lung function in children. *N Engl J Med* 355:21-30; 2006.
10. Holguin, F.; Flores, S.; Ross, Z.; Cortez, M.; Molina, M.; Molina, L.; Rincon, C.; Jerrett, M.; Berhane, K.; Granados, A.; Romieu, I. Traffic-related exposures,

- airway function, inflammation, and respiratory symptoms in children. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1236-1242; 2007.
11. Vineis, P.; Husgafvel-Pursiainen, K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 26:1846-1855; 2005.
 12. Dockery, D. W.; Pope, C. A. r.; Xu, X.; Spengler, J. D.; Ware, J. H.; Fay, M. E.; Ferris, B. G. J.; Speizer, F. E. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329:1753-1759; 1993.
 13. Beeson, W. L.; Abbey, D. E.; Knutsen, S. F. Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: results from the AHSMOG study.Adventist Health Study on Smog. *Environ Health Perspect* 106:813-823; 1998.
 14. Nawrot, T. S.; Nackaerts, K.; Hoet, P. H.; Nemery, B. Lung cancer mortality and fine particulate air pollution in Europe. *Int J Cancer* 120:1825-6; 1827; 2007.
 15. Nie, J.; Beyea, J.; Bonner, M. R.; Han, D.; Vena, J. E.; Rogerson, P.; Vito, D.; Muti, P.; Trevisan, M.; Edge, S. B.; Freudenheim, J. L. Exposure to traffic emissions throughout life and risk of breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. *Cancer Causes Control* 18:947-955; 2007.
 16. Sjødahl, K.; Jia, C.; Vatten, L.; Nilsen, T.; Hveem, K.; Lagergren, J. Body mass and physical activity and risk of gastric cancer in a population-based cohort study in Norway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:135-140; 2008.
 17. Osornio-Vargas, A. R.; Bonner, J. C.; Alfaro-Moreno, E.; Martinez, L.; Garcia-Cuellar, C.; Ponce de Leon Rosales, S.; Miranda, J.; Rosas, I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 111:1289-1293; 2003.
 18. Alfaro-Moreno, E.; Martinez, L.; Garcia-Cuellar, C.; Bonner, J. C.; Murray, J. C.; Rosas, I.; Rosales, S. P.; Osornio-Vargas, A. R. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect* 110:715-720; 2002.

19. 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. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:672-680; 1998.
20. Monn, C.; Becker, S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol* 155:245-252; 1999.
21. García-Cuellar, C.; Alfaro-Moreno, E.; Martínez-Romero, F.; Ponce de León Rosales, S.; Rosas, I.; Pérez-Cárdenas, E.; Osornio Vargas, A. R. DNA damage induced by PM₁₀ from different zones of Mexico City. *Ann Occup Hyg* 46:425-428; 2002.
22. Moller, W.; Brown, D. M.; Kreyling, W. G.; Stone, V. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Part Fibre Toxicol* 2:7; 2005.
23. Dick, C. A.; Brown, D. M.; Donaldson, K.; Stone, V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* 15:39-52; 2003.
24. Moller, P.; Folkmann, J. K.; Forchhammer, L.; Brauner, E. V.; Danielsen, P. H.; Risom, L.; Loft, S. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett* 266:84-97; 2008.
25. Kasai, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387:147-163; 1997.
26. Valavanidis, A.; Vlahoyianni, T.; Fiotakis, K. Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic Res* 39:1071-1081; 2005.
27. Heffner, J. E.; Repine, J. E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 140:531-554; 1989.

28. Hassett, D. J.; Cohen, M. S. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J* 3:2574-2582; 1989.
29. Gutteridge, J. M.; Mitchell, J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 55:49-75; 1999.
30. Feng, Z.; Hu, W.; Marnett, L. J.; Tang, M. S. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat Res* 601:125-136; 2006.
31. Esterbauer, H.; Eckl, P.; Ortner, A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 238:223-233; 1990.
32. Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 10:389-406; 2006.
33. Grune, T.; Jung, T.; Merker, K.; Davies, K. J. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2519-2530; 2004.
34. Pogozelski, W. K.; Tullius, T. D. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chem Rev* 98:1089-1108; 1998.
35. Sato, H.; Sone, H.; Sagai, M.; Suzuki, K. T.; Aoki, Y. Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 21:653-661; 2000.
36. Ichinose, T.; Yajima, Y.; Nagashima, M.; Takenoshita, S.; Nagamachi, Y.; Sagai, M. Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 18:185-192; 1997.
37. Tanaka, T.; Huang, X.; Jorgensen, E.; Gietl, D.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z.; Albino, A. P. ATM activation accompanies histone H2AX phosphorylation in A549 cells upon exposure to tobacco smoke. *BMC Cell Biol* 8:26; 2007.

38. Celeste, A.; Fernandez-Capetillo, O.; Kruhlak, M. J.; Pilch, D. R.; Staudt, D. W.; Lee, A.; Bonner, R. F.; Bonner, W. M.; Nussenzweig, A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675-679; 2003.
39. Chung, Y. L.; Lee, M. Y.; Pui, N. N. Epigenetic therapy using the histone deacetylase inhibitor for increasing therapeutic gain in oral cancer: Prevention of radiation-induced oral mucositis and inhibition of chemical-induced oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2009.
40. Rappold, I.; Iwabuchi, K.; Date, T.; Chen, J. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol* 153:613-620; 2001.
41. Jin, J.; Ang, X. L.; Ye, X.; Livingstone, M.; Harper, J. W. Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem* 283:19322-19328; 2008.
42. d'Adda di Fagagna, F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8:512-522; 2008.
43. Sidi, S.; Sanda, T.; Kennedy, R. D.; Hagen, A. T.; Jette, C. A.; Hoffmans, R.; Pascual, J.; Imamura, S.; Kishi, S.; Amatruda, J. F.; Kanki, J. P.; Green, D. R.; D'Andrea, A. A.; Look, A. T. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell* 133:864-877; 2008.
44. Soberanes, S.; Panduri, V.; Mutlu, G. M.; Ghio, A.; Bundinger, G. R.; Kamp, D. W. p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1229-1238; 2006.
45. Upadhyay, D.; Panduri, V.; Ghio, A.; Kamp, D. W. 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; 2003.
46. d'Adda di Fagagna, F.; Reaper, P. M.; Clay-Farrace, L.; Fiegler, H.; Carr, P.; Von Zglinicki, T.; Saretzki, G.; Carter, N. P.; Jackson, S. P. A DNA damage

- checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426:194-198; 2003.
47. Hayflick, L.; Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621; 1961.
 48. López-Díaz Guerrero NE; Martínez Garduño CM; Konigsberg Fainstein M. La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Revista de educación bioquímica* 24:47-53; 2005.
 49. Muller, M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 11:59-98; 2009.
 50. Campisi, J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14:183-188; 2000.
 51. Wang, E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55:2284-2292; 1995.
 52. Krtolica, A.; Parrinello, S.; Lockett, S.; Desprez, P. Y.; Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12072-12077; 2001.
 53. Liu, D.; Hornsby, P. J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67:3117-3126; 2007.
 54. Fritsche, M.; Haessler, C.; Brandner, G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8:307-318; 1993.
 55. Blazer, S.; Khankin, E.; Segev, Y.; Ofir, R.; Yalon-Hacohen, M.; Kra-Oz, Z.; Gottfried, Y.; Larisch, S.; Skorecki, K. L. High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 296:93-101; 2002.
 56. Kurata, S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 275:23413-23416; 2000.
 57. Gilmour, P. S.; Brown, D. M.; Lindsay, T. G.; Beswick, P. H.; MacNee, W.; Donaldson, K. Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* 53:817-822; 1996.

58. Gonzalez-Flecha, B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol Aspects Med* 25:169-182; 2004.
59. Frampton, M. W.; Ghio, A. J.; Samet, J. M.; Carson, J. L.; Carter, J. D.; Devlin, R. B. Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 277:L960-7; 1999.
60. Huang, S. L.; Hsu, M. K.; Chan, C. C. Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect* 111:478-482; 2003.
61. Choi, J. H.; Kim, J. S.; Kim, Y. C.; Kim, Y. S.; Chung, N. H.; Cho, M. H. Comparative study of PM_{2.5} - and PM₁₀ - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci* 5:11-18; 2004.
62. Gilmour, P. S.; Rahman, I.; Donaldson, K.; MacNee, W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L533-L540; 2003.
63. Roberts, E. S.; Malstrom, S. E.; Dreher, K. L. In situ pulmonary localization of air pollution particle-induced oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A* 70:1929-1935; 2007.
64. Pradhan, A.; Waseem, M.; Dogra, S.; Khanna, A. K.; Kaw, J. L. Alterations in bronchoalveolar lavage constituents, oxidant/antioxidant status, and lung histology following intratracheal instillation of respirable suspended particulate matter. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 24:19-32; 2005.
65. Hatzis, C.; Godleski, J. J.; Gonzalez-Flecha, B.; Wolfson, J. M.; Koutrakis, P. Ambient particulate matter exhibits direct inhibitory effects on oxidative stress enzymes. *Environ Sci Technol* 40:2805-2811; 2006.
66. Hernandez-Escobar, S. A.; Avila-Casado, M. C.; Soto-Abraham, V.; Lopez Escudero, O. L.; Soto, M. E.; Vega-Bravo, M. L.; van der Goes, T. F.; Reyes-Maldonado, E. Cytological damage of nasal epithelium associated with decreased glutathione peroxidase in residents from a heavily polluted city. *Int Arch Occup Environ Health* 82:603-612; 2009.

67. Alfaro-Moreno, E; Torres, V; Martínez, L; García-Cuellar, C; Nawret, TS; Vanaudenaerde, BM; Hact, P; Ramirez-López, P; Rosas, I; Nemery, B; Osornio-Vargas, A. R. 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. (2009),doi:10.1016/j.envres.2009.02.010.
68. Kueng, W.; Silber, E.; Eppenberger, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182:16-19; 1989.
69. Beers, R. F.; Sizer, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133-140; 1952.
70. 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. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85; 1985.
71. Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191; 1988.
72. Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et, a. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367; 1995.
73. Brunekreef, B.; Forsberg, B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J* 26:309-318; 2005.
74. Rossner, P. J.; Svecova, V.; Milcova, A.; Lnenickova, Z.; Solansky, I.; Sram, R. J. Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part I. Oxidative damage to DNA. *Mutat Res* 642:14-20; 2008.
75. Alfaro-Moreno, E.; Ponce-de-Leon, S.; Osornio-Vargas, A. R.; Garcia-Cuellar, C.; Martinez, L.; Rosas, I. Potential toxic effects associated to metals and endotoxin present in PM10: an ancillary study using multivariate analysis. *Inhal Toxicol* 19 Suppl 1:49-53; 2007.
76. Aust, A. E.; Ball, J. C.; Hu, A. A.; Lighty, J. S.; Smith, K. R.; Straccia, A. M.; Veranth, J. M.; Young, W. C. Particle characteristics responsible for effects on

- human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst* 1-65; discussion 67-76; 2002.
77. Foster, K. A.; Oster, C. G.; Mayer, M. M.; Avery, M. L.; Audus, K. L. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 243:359-366; 1998.
 78. Hu, W.; Feng, Z.; Tang, M. S. Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25:455-462; 2004.
 79. Gutierrez-Castillo, M. E.; Roubicek, D. A.; Cebrian-Garcia, M. E.; De Vizcaya-Ruiz, A.; Sordo-Cedeno, M.; Ostrosky-Wegman, P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 47:199-211; 2006.
 80. MacRedmond, R.; Greene, C.; Taggart, C. C.; McElvaney, N.; O'Neill, S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir Res* 6:116; 2005.
 81. Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161-1208; 2005.
 82. Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506; 2003.
 83. Costanzo, V.; Gautier, J. Single-strand DNA gaps trigger an ATR- and Cdc7-dependent checkpoint. *Cell Cycle* 2:17; 2003.
 84. Zou, L.; Liu, D.; Elledge, S. J. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13827-13832; 2003.
 85. Cortez, D.; Guntuku, S.; Qin, J.; Elledge, S. J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294:1713-1716; 2001.
 86. Takahashi, A.; Ohnishi, T. Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett* 229:171-179; 2005.

87. Guirouilh-Barbat, J.; Redon, C.; Pommier, Y. Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Mol Biol Cell* 19:3969-3981; 2008.
88. Zhao, H.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation. *Cell Cycle* 2008.
89. Boutros, R.; Dozier, C.; Ducommun, B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 18:185-191; 2006.
90. Fridman, J. S.; Lowe, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-9040; 2003.
91. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331; 1997.
92. Vousden, K. H.; Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2:594-604; 2002.
93. Mehta, M.; Chen, L. C.; Gordon, T.; Rom, W.; Tang, M. S. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat Res* 657:116-121; 2008.
94. Narita, M.; Nunez, S.; Heard, E.; Narita, M.; Lin, A. W.; Hearn, S. A.; Spector, D. L.; Hannon, G. J.; Lowe, S. W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113:703-716; 2003.
95. Ben-Porath, I.; Weinberg, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37:961-976; 2005.
96. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513-522; 2005.
97. Suzuki, T.; Minagawa, S.; Michishita, E.; Ogino, H.; Fujii, M.; Mitsui, Y.; Ayusawa, D. Induction of senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp Gerontol* 36:465-474; 2001.
98. Coppe, J. P.; Patil, C. K.; Rodier, F.; Sun, Y.; Munoz, D. P.; Goldstein, J.; Nelson, P. S.; Desprez, P. Y.; Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6:2853-2868; 2008.

99. Nuciforo, P. G.; Luise, C.; Capra, M.; Pelosi, G.; d'Adda di Fagagna, F. Complex engagement of DNA damage response pathways in human cancer and in lung tumor progression. *Carcinogenesis* 28:2082-2088; 2007.
100. Bartkova, J.; Rezaei, N.; Lontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L. V.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V. C.; Takaoka, M.; Nakagawa, H.; Tort, F.; Fugger, K.; Johansson, F.; Sehested, M.; Andersen, C. L.; Dyrskjot, L.; Orntoft, T.; Lukas, J.; Kittas, C.; Helleday, T.; Halazonetis, T. D.; Bartek, J.; Gorgoulis, V. G. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444:633-637; 2006.
101. Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11:S27-31; 2001.
102. Deng, C.; Zhang, P.; Harper, J. W.; Elledge, S. J.; Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82:675-684; 1995.
103. Katakura, Y.; Nakata, E.; Miura, T.; Shirahata, S. Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255:110-115; 1999.

PUBLICACIÓN



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

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



DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM₁₀) of urban air pollutants

Yesennia Sánchez-Pérez^{a,b,1}, Yolanda I. Chirino^{a,1}, Álvaro R. Osornio-Vargas^a, Rocío Morales-Bárceñas^a, Concepción Gutiérrez-Ruiz^b, Inés Vázquez-López^a, Claudia M. García-Cuellar^{a,*}

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

^b Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-Iztapalapa), 09340 Mexico, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2008

Received in revised form 6 January 2009

Accepted 6 January 2009

Keywords:

PM₁₀

Senescence-like state

DNA damage

ABSTRACT

We describe the events triggered by a sub-lethal concentration of airborne particulate matter (PM₁₀) in A549 cells, which include the formation DNA double-strand breaks, γ H2A.X generation, and 53BP1 recruitment. To protect the genome, cells activated ATM/ATR/Chk1/Chk2/p53 pathway but, after 48 h, cells turned into a senescence-like state. Trolox, an antioxidant, was able to prevent most of the alterations observed after particulate matter exposure, demonstrating the important role of ROS as mediator of PM₁₀-induced genotoxicity and suggesting that DNA damage could be the mechanisms by which particulate matter augment the risk of lung cancer.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There is growing concern that exposure to airborne particulate matter (PM) is associated with an increase in morbidity and mortality and that it could augment the risk of lung cancer [1–3]. PM of an aerodynamic diameter ≤ 10 μ m (PM₁₀) consists of dust, soot, and other solid, liquid, and aerosol particles, as well as its chemical constituents. Although the mechanisms of PM₁₀-related health effects remain incompletely studied, there is increasing evidence that exposure to PM₁₀ has a major effect in several experimental models [4,5]. In addition, some of these changes are strongly related to an increase in reactive oxygen species (ROS) [6,7]. In this regard, one of the most important changes induced by PM₁₀ is DNA damage [8,9] and the level of this damage has been correlated with mutagenicity and tumor formation in exper-

imental models [10,11]. The induced DNA damage by PM₁₀ and its constituents involves the formation of DNA double-strand breaks (DSBs) [8,9,12,13]. In response to DSBs caused by other agents like ionizing radiation [14], the histone H2A.X undergoes phosphorylation at Ser139 [14]. The phosphorylated H2A.X protein is defined as γ H2A.X and this phosphorylation is mediated by phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases (PIKKs), including ataxia telangiectasia mutated (ATM), ATM and Rad-3 related kinase (ATR), and DNA dependent protein kinase (DNA-PKcs) [15]. ATM and ATR, in turn, activate the checkpoint kinases, Chk1 and Chk2, and tumor suppressor 53-binding protein 1 (53BP1). 53BP1 binds to the DNA-binding domain of p53, enhances p53-mediated transcriptional activation, and rapidly colocalizes with γ H2A.X in response to DNA damage induced by ionizing radiation [16]. In addition, Chk1 and Chk2 kinases have several effectors, including cell division 25 (Cdc25) family proteins, which have phosphatase activity related to cell cycle regulation, specifically Cdc25A, in response to ionizing radiation [17]. On the other hand, after DNA damage,

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5628 0462; fax: +52 55 5628 0432.

E-mail address: cmgarcia@salud.gob.mx (C.M. García-Cuellar).

¹ These authors contributed equally to the work.

p53 initiates different transcriptional programs that lead to cell cycle arrest, cellular senescence, or apoptosis in response to γ -radiation through the ATM/ATR and Chk1/Chk2 kinases [18]. To this regard, before p53 induction, a disruption between the complex formed by p53 and MDM2, a p53-specific E3 ubiquitin ligase, is needed for its biological response [19]. In the setting of DNA damage, the cell undergoes cell cycle arrest to provide time to carry out DNA repair [9,13] or apoptosis, depending on the PM₁₀ concentration used. Based on this information, we decided to investigate if the above cell-signaling pathway (ATM/ATR/Chk1/Chk2/p53) is involved in the response to the DNA damage induced by PM₁₀ exposure in epithelial lung cancer cells even when cells are exposed to a sub-lethal concentration. Since there is an increase in DNA damage correlated to the oxidative stress induced by environmental pollutants [20,21], we decided to use trolox, a hydroxyl radical scavenger, to investigate if a connection exists between the effect of PM₁₀ exposure on DNA damage and if this effect is related to ROS formation. This study evidences that PM₁₀ activates sensors (53BP1), transducers (ATM/ATR), and effectors (H2A.X, Chk1, Chk2, p53, and MDM2) of DNA damage, pointing toward a strong relation between DNA damage and oxidative stress. Even though, this signal transduction pathway is activated in response to DNA damage after 24 h, a senescence-like phenotype is observed in cells exposed to PM₁₀ after 48 h. These findings provide important clues on the role of PM₁₀ exposure in DNA damage and senescence-like events that are strongly involved in cancer development.

2. Materials and methods

2.1. PM₁₀ sampling

PM₁₀ was collected in a commercial zone (with major traffic sources) of Mexico City using a high-volume particle collector with a flux of 1.13 m³/min (GMW model 1200 VFC HVPM10; Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA). PM₁₀ was collected on 3.0- μ m pore size cellulose nitrate filters (Sartorius AG, Goettingen, Germany), 3 days a week from October 2004–May 2005. Filters were maintained in the dark at 4 °C in a desiccator prior to particle removal. Particles were gently scraped off the membranes with a surgical blade into endotoxin-free glass vials, maintained in the dark in a dryer at 4 °C until use.

2.2. Cell culture and PM₁₀/trolox treatment

A549 type cells derived from human adenocarcinoma were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in F12 K medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were seeded in 6-well culture plates (1 $\times$ 10⁶ cells per well) and they were grown in F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum for 24 h. Then the medium was removed and replaced to free serum medium plus PM₁₀. Free serum medium was used in order to avoid that albumin contained in the fetal bovine serum acts as

metal chelator and masks the real PM₁₀ effect because it contains metals [22]. Since PM has a complex composition that includes soluble and insoluble compounds and it was not totally dissolved in culture medium, a suspension of PM₁₀ was obtained and the A549 cell culture was exposed to this suspension at 10 μ g/cm² during 24 h. Parallel experiments were done after pre-incubation with 10 μ M trolox (antioxidant).

2.3. The comet assay

A549 cells were plated on 24-well plates (2 $\times$ 10⁴ cells per well) and exposed to 10 μ g/cm² of PM₁₀ and, after 24 h of exposure, cells were trypsinized (0.05%). Cells (1 $\times$ 10⁵) were mixed in 1% low fusion point agarose and then placed on a slide covered with previously solidified agarose. The sample was treated with digestion buffer (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 10) for 30 min, then rinsed in a 100 mM NaCl, 1 mM EDTA solution, and subjected to 50 V alkaline electrophoresis for 30 min (Horizon 58; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD). SYBER Green I solution (TREVIGEN cat.4250-050-K) was added to each sample and analyzed under fluorescence microscopy (AX70; Olympus, Japan), capturing the image with a digital camera (Coolpix P5100, Nikon). The length of each comet was measured using an image analysis program (ImageJ, NIH) [23]. One hundred comets per sample were measured. Length distributions were used and the median, 25th and 75th percentiles, and maximal and minimal values were calculated.

2.4. Western blot

The cells were rinsed twice with PBS and lysed with 20 mM Tris, 1% NP-40, and 150 mM NaCl, pH 8.0; a protease inhibitor cocktail (Roche Mannheim, Germany) and the cell lysates were centrifuged (13000 g for 2 min), and the supernatant was stored at –20 °C.

The protein content of the supernatant was calculated using the bicinchoninic acid protein assay [24]. SDS polyacrylamide gels were prepared by standard techniques and 40 μ g of protein was loaded per line onto a 12.5% acrylamide-SDS gel [25]. Protein was blotted onto a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, UK) and probed using primary and secondary antibodies and detected by enhanced chemiluminescence (Millipore, UK), following the Towbin et al. procedure [26]. H2A.X (07146), phosphorylated H2A.X (γ H2A.X) (07164), ATM (05513), phospho-ATM S1981 (05740) were purchased from Upstate; ATR (ab2905), phospho-ATR S428 (2853), Chk1 (ab47488), phospho-Chk1 S317 (ab38518), Chk2 (ab47433), phospho-Chk2 T68 (E126), 53BP1 (ab21083), MDM2 (ab53710), Cdc25A (2357), phospho-Cdc25A S278 (ab59977) were purchased from Abcam (Cambridge, MA). Actin antibody was utilized as loading control (kindly provided by Dr. Manuel Hernández (Department of Cellular Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico). Equal protein concentration loading on the PVDF membrane was verified using Ponceau S staining (Sigma, USA). Protein levels were evaluated through densitometry using the ImageJ freeware program (rsb.info.nih.gov/ij) [27].

2.5. Immunofluorescence labeling for γ H2A.X (S139) and phospho-ATM (S1981)

Cells were grown on 8-well culture slides with a growth area of 0.7 cm² (BD Falcon cat.08-774-208); after treatment with PM₁₀, unexposed cells (control) and treated cells were fixed with ice-cold methanol for 10 min at –20 °C. To reduce autofluorescence, cells were quenched in fresh 0.1% sodium borohydride for 5 min and washed three times with TBS (pH 7.0). A blocking step was done incubating the slides for 1 h with 1% BSA, 0.02% NaN₃ in 1X TBS; afterwards, two washes in 1X TBS for 5 min each were done. For double-labeling, an immunofluorescence sequential protocol was followed (<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11458>). For the first labeling, the cells were incubated with diluted primary antibody (1:100) in 1% BSA–TBS for γ H2A.X (S139) (Upstate cat. No. 07-164) overnight at 4 °C in a humidified chamber; after incubation, the cells were washed three times for 5 min each with TBS, and subsequently incubated with diluted secondary antibody (1:100) (FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG from Jackson ImmunoResearch cat.111-095-144) for 30 min at room temperature in the dark. Cells were washed three times for 5 min each in TBS. For the second labeling step, a 1:100 dilution in 1% BSA–TBS of the ATM-P (S1981) antibody (Upstate 05-740) and a 1:100 diluted secondary antibody (Rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG from Jackson ImmunoResearch cat.115-025-166) were used. The incubation times and the washing conditions were similar to those used for the first labeling step. Cover-slips were mounted on slides using the ProLong antifade with DAPI (molecular probe P36935). Images were captured using an Olympus AX70 upright fluorescence microscope and analyzed with SPOT imaging software, version 4.0.4.

2.6. p53 Expression

A549 cells were seeded on plates (55 cm²) and exposed to PM₁₀ (10 μ g/cm²) for 24 h; then, cells were harvested under non-denaturing conditions to obtain lysates adding lysis buffer plus 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. After 5 min, the samples were centrifuged to obtain the supernatant that was transferred to a 96-well plate and incubated with total p53 and p53 phosphorylated at S15 (following the instructions of CST's PathScan Total p53 and phospho-p53 [S15] Sandwich ELISA Kit, Cat. 7370 and 7375, Cell Signaling Technology, Inc.) for 1 h at 37 °C. Then, the horseradish peroxidase-linked secondary antibody was added to each well for 30 min at 37 °C. The 96-well plate was read within 30 min after adding the stop solution. The p53 total and phospho-p53 S15 were determined at 450 nm in triplicate (Genios™ plus, Tecan Trading AG, Switzerland).

2.7. Senescence-associated β -galactosidase assay (SA- β -gal)

A549 cells (2 $\times$ 10⁶ cells) were seeded on 24-well culture slides with F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 24 h. Cells were exposed to PM₁₀ (10 μ g/cm²) for 24 h replacing the medium with F12K medium without serum. The activity of SA- β -gal was determined as described by Dimri et al. [28].

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde at 37 °C and, after 1 h, the cells were washed three times with PBS. Cells were incubated with the staining solution [5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆ 3H₂O, pH 6.0; 1 mg/ml, X-gal (Promega)] at 37 °C for 24 h. The degree of SA- β -gal was obtained by counting 100 cells per well under a microscope (Leica), capturing the image with a digital camera (Coolpix P5100, Nikon), and reporting it as percentage of the total number of cells scored.

2.8. Cell cycle

The cell cycle evaluation was done in according to Mroz et al. [8]. A549 cells (2 $\times$ 10⁶ cells per sample) were collected and centrifuged (1000 g for 5 min). The pellet was resuspended in 1 mL of cold PBS. The cells were fixed by adding 4 mL of absolute ethanol. RNase A (100 μ L from 200 μ g/mL DNase-free stock) was added to each sample and incubated at 37 °C for 30 min. Then, the cells were stained (propidium iodide, 100 μ L from 1 mg/mL stock) and incubated at room temperature for 10 min. Samples were analyzed on a flow cytometer (FACSort BECTON DICKINSON) using CellQuest and ModFit LT software.

2.9. Cell apoptosis assay

Apoptosis was determined by staining cells with annexin V-fluorescein isothiocyanate (Ex/Em = 495 nm/529 nm) and propidium iodide labeling [29], A549 cells (1 $\times$ 10⁶/well) were seeded in 6-well culture slides with F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 24 h. After this time, cells were exposed to PM₁₀ (10 μ g/cm²) with F12K medium without serum for 24, 48, and 72 h. After each time of PM₁₀ exposure, cells were washed with PBS and centrifuged at 200 g for 5 min. The pellet obtained was resuspended in 100 μ L of annexin V solution (Annexin V FLUOS Staining kit, Roche Diagnostics GmbH, cat.1858777) and incubated 15 min at 15 °C. Data acquisition and analysis were performed by flow cytometry (FACSort BECTON DICKINSON) using CellQuest software.

2.10. Statistical analysis

For the comet assay, length distributions from one hundred cells were used and data are median, 25th and 75th percentiles, and maximal and minimal values. The other experiments are presented as mean $\pm$ SD (n = 3). Different treatments were compared using ANOVA followed by the Bonferroni test for individual comparisons between group means.

3. Results

3.1. PM₁₀ exposure induces DNA damage in A549 cells

To investigate the effect of PM₁₀ in human A549 cells, we first examined the ability of PM₁₀ to induce DNA damage using the comet assay; a well-established method for the DNA damaged detection. In this assay, the damaged DNA migrates out of the nucleus forming a tail, which can be quantified using image analysis. Fig. 1 shows that cells exposed to 10 μ g/cm² of PM₁₀ after 24 h have an increased tail length compared to control cells (p < 0.001). Trolox treatment of cells exposed to PM₁₀ induced a significant decrease in the DNA damage.

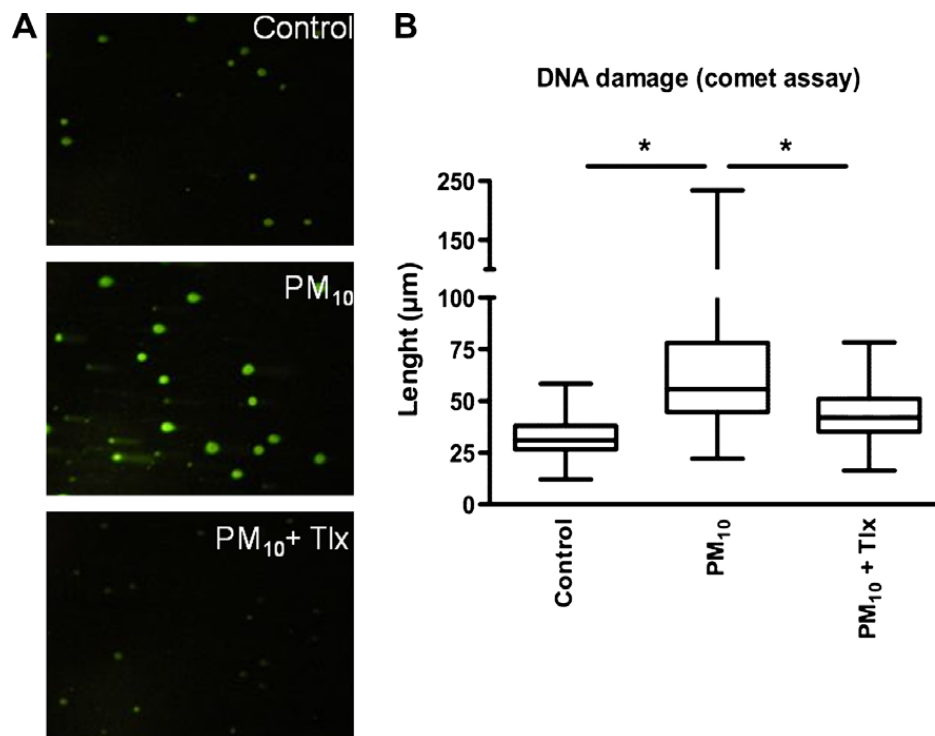


Fig. 1. (A) Comet assay on A549 cells obtained from cells exposed to airborne particulate matter (PM₁₀) (10 μg/cm²) and trolox (Tlx) (10 μM) after 24 h. (B) Length distributions were used and data are median, 25th and 75th percentiles, and maximal and minimal values (**p* < 0.001).

3.2. Double-strand breaks formation and changes in ATM/ATR kinases and 53BP1

DSBs formation is one of the most important modifications in DNA after PM₁₀ exposure. DSBs in the chromatin speedily initiate H2A.X phosphorylation, at serine 139 to generate γH2A.X. Western blot revealed an increase in γH2A.X formation (2.81-fold) and the Fig. 2 and Table 1 show the increase in this histone H2A variant indicative of DSBs in the chromatin and H2A.X phosphorylation was prevented by trolox treatment (1.27-fold). Taking into account that this phosphorylation event requires the activation of the phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like family, ATM and

ATR kinases, we decided to investigate, first, if the observed increase of γH2A.X is related to the autophosphorylation of ATM. Indeed, an increase of 1.7-fold in phosphorylated ATM protein at serine 1981 in A549 cells exposed to PM₁₀ was observed and this change was prevented by trolox (Fig. 2 and Table 1). In addition, 53BP1 plays an important role in DNA double-strand breaks repair and it is localized near DSBs. We found an over-expression of 3.64-fold after PM₁₀ exposure of this protein, which is also required for p53 accumulation [30] and trolox was able to prevent this over-expression (Fig. 2 and Table 1). Then, we investigated if changes occur in ATR protein level and found no changes in total protein but the phosphorylated ATR (phospho-ATR) at S428 had a lower protein level as compared to control A549 cells and trolox had no effect (Fig. 2 and Table 1).

3.3. ATM associates with sites of double-strand breaks

We found that phospho-ATM is associated to γH2A.X after PM₁₀ exposure as evidence of DSBs formation. When cells were exposed to PM₁₀ plus trolox, the above signal mentioned decreased as a consequence of less DSBs formation (Fig. 3).

3.4. Activation of downstream proteins by ATM and ATR proteins

We found an increase of 1.27-fold in total Chk2 protein levels (Table 1) with no changes in phosphorylated protein at threonine 68 (Fig. 4). On the other hand, we found a decrease of 17% in Chk1 protein (Table 1) and an increase of 2.5-fold in phospho-Chk1 at serine 317 after PM₁₀ exposure with no changes when trolox was added (Fig. 4 and Table 1). This result suggests that since Chk1 was able to phosphorylate C-terminal portion of Cdc25 family members, it should be possible to notice changes in Cdc25A protein. Lower protein content after PM₁₀ exposure was observed in Cdc25A protein (41%) and in phospho-Cdc25A phosphorylated at S278 (59%). Trolox treatment was unable to change this alteration (Fig. 4 and Table 1).

3.5. p53 Activation

Extensive characterizations of the signal routes that connect DNA damage with p53 have identified a cascade of kinases, including ATM, ATR, Chk1 and Chk2, that phosphorylate p53 [31]. The phos-

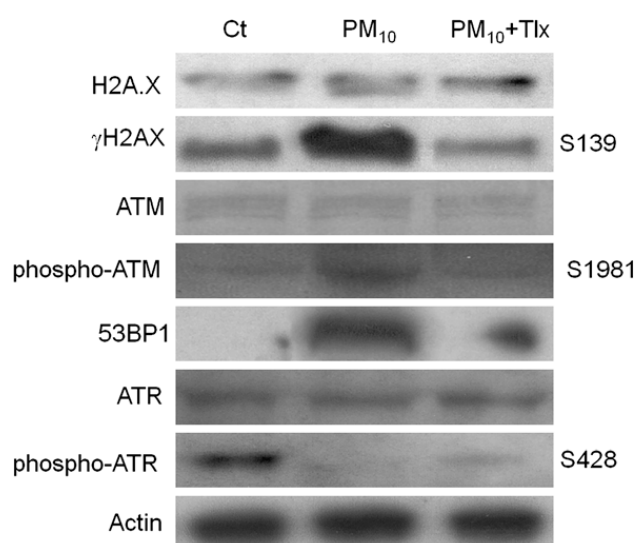


Fig. 2. Effect of airborne particulate matter (PM₁₀) exposure (10 μg/cm²) and PM₁₀ plus trolox (Tlx) (10 μM) on the expression of H2A.X/γH2A.X (S139), ATM/phospho-ATM (S1981), 53BP1, and ATR/phospho-ATR (S428) after 24 h. Results shown are representative of three independent experiments.

Table 1

Protein expression (fold over control level).

	γ H2A.X	p-ATM	53BP1	Chk2	Chk1	p-Chk1	Cdc25A	p-Cdc25A	MDM2
PM ₁₀	2.81 $\pm 0.15^a$	1.7 $\pm 0.12^a$	3.64 $\pm 1.01^b$	1.27 $\pm 0.10^c$	0.83 $\pm 0.01^c$	2.5 $\pm 0.79^c$	0.59 $\pm 0.08^a$	0.41 $\pm 0.01^a$	Nd
PM ₁₀ Tlx	1.27 $\pm 0.22^d$	1.03 $\pm 0.13^d$	1.47 $\pm 0.30^e$	0.93 $\pm 0.13^f$	0.90 ± 0.09	2.4 $\pm 0.56^e$	0.61 $\pm 0.07^a$	0.50 $\pm 0.14^d$	0.74 $\pm 0.07^d$

PM₁₀: airborne particulate matter (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); PM₁₀ + Tlx: airborne particulate matter (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) plus trolox (10 μM). Histone H2A.X phosphorylated at 139: γ H2A.X; ataxia telangiectasia mutated phosphorylated at S1981(p-ATM), tumor suppressor 53-binding protein 1, 53BP1; checkpoint kinase 2, Chk2; checkpoint kinase 1, Chk1, checkpoint kinase phosphorylated at S317, p-Chk1; cell division 25 A protein, Cdc25A; Cdc25A phosphorylated at S278, p-Cdc25A; p53-specific E3 ubiquitin ligase, MDM2; Nd, not detectable. Data are presented as mean $\pm$ DE ($n = 3$).

^a $p < 0.001$ vs control.

^b $p < 0.01$ vs control.

^c $p < 0.05$ vs control.

^d $p < 0.001$ vs PM₁₀.

^e $p < 0.05$ vs PM₁₀.

^f $p < 0.05$ vs PM₁₀.

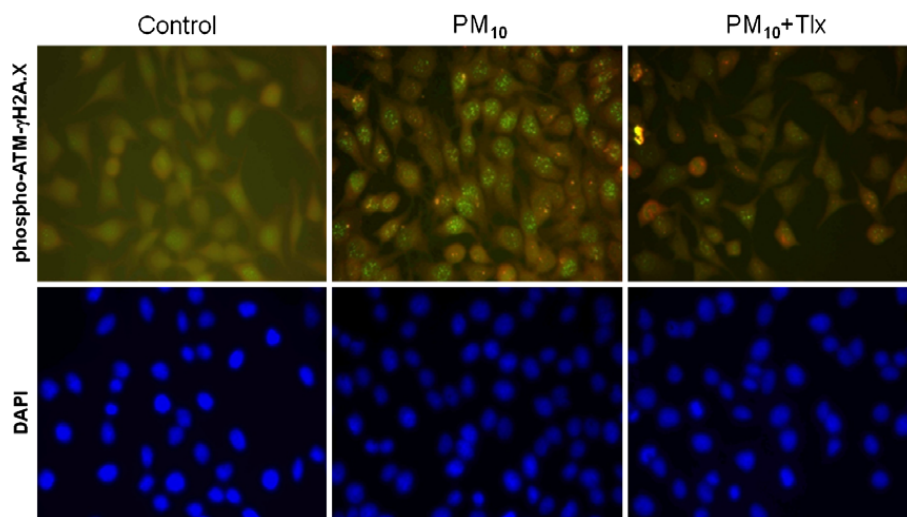


Fig. 3. Foci formation of phospho-ATM (S1981) and γ H2A.X (S139) on A549 cells exposed to PM₁₀ (10 mg/cm^2) and PM₁₀ plus trolox (Tlx) (10 μM) after 24 h. Fluorescence micrographs depict DNA stained with phospho-ATM (S1981) and γ H2A.X (S139) (top panel) and DAPI (bottom panel). The merged picture is an overlay of the two channels.

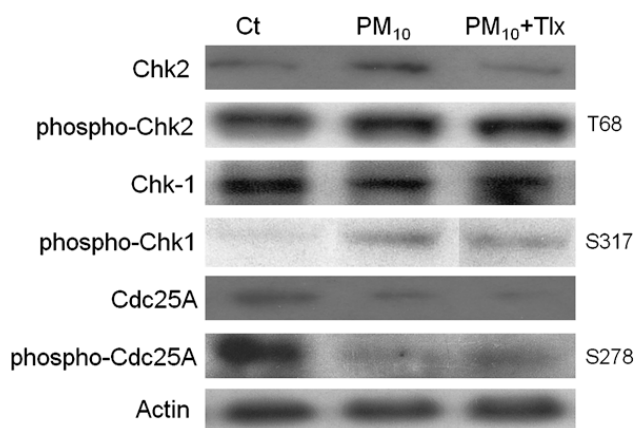


Fig. 4. Effect of airborne particulate matter (PM₁₀) exposure (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and PM₁₀ plus trolox (Tlx) (10 μM) on the expression of Chk2/phospho-Chk2 (T68), Chk1/phospho-Chk1-P (S317), Cdc25A/phospho-Cdc25A (S278) after 24 h. Results shown are representative of three independent experiments.

phorylation of p53 at serine 15 exhibits reduced binding to the inhibitor protein MDM2 promoting the functional activation of p53 in response to DNA damage [32]. To investigate if the changes in the cascade of kinases are related to the p53 accumulation, we explored the expression of p53 and MDM2. We found an increase in the total and phosphorylated p53 protein after PM₁₀ exposure avoiding this change when A549 cells were exposed to trolox (Fig. 5A). Since p53 activation is related to the loss of interaction between MDM2 and p53, and 53BP1 is required for p53 accumulation, we investigated the expression of these proteins and found that after A549 cells were exposed to PM₁₀, the MDM2 protein is absent (Fig. 5B). Trolox treatment prevented MDM2 protein loss in 74% after PM₁₀ exposure (Fig. 5B and Table 1).

3.6. PM₁₀ do not induce changes in cell cycle and apoptosis

When cells suffer DNA damage, an autophosphorylation of ATM and γ H2A.X and phosphorylation of p53 (S15) is induced. This cell-signaling pathway can lead to cell cycle arrest, senescence or apoptosis. However, after 24 h of PM₁₀ exposure, A549 cells showed an activation of the ATM/ART/Chk1/Chk2/p53 pathway but there were no changes in cell cycle distribution or apoptosis (Table 2).

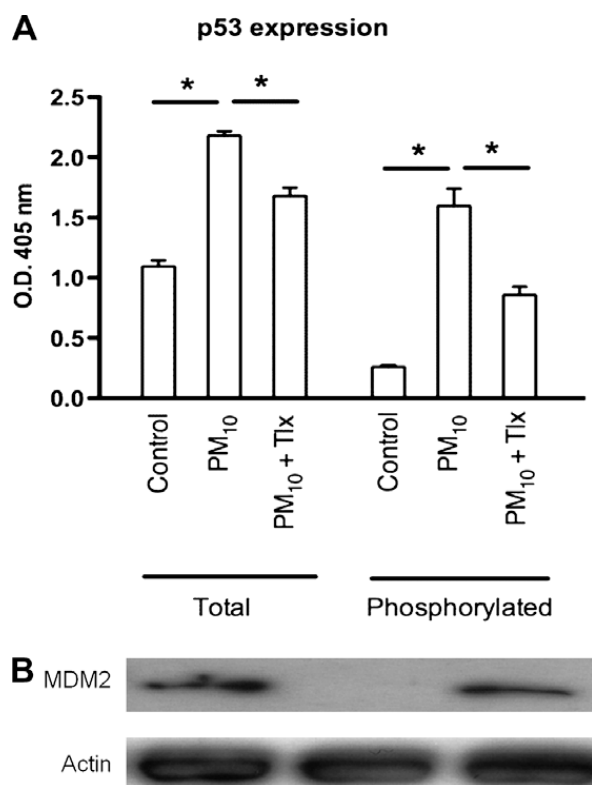


Fig. 5. (A) p53 expression (total and phosphorylated p53) on A549 cells exposed to airborne particulate matter (PM₁₀) (10 µg/cm²) and PM₁₀ plus trolox (Tlx) (10 µM) after 48 h. Data are mean ± SD (n = 3, *p < 0.001). (B) Effect of PM₁₀ exposure (10 µg/cm²) and PM₁₀ plus trolox (10 µM) on the expression of MDM2 protein. Results shown are representative of three independent experiments.

3.7. PM₁₀ exposure triggers senescence-like events after 24 h

Since p53 was described to be a major player in the induction of senescence and we found an increase in its activity, and because oxidative stress is implicated in the onset of cellular senescence, we investigated if A549 cells are induced toward senescence after PM₁₀ exposure. Staining for senescence-associated β-galactosidase expression revealed no changes after 24 h of PM₁₀ exposure (10 µg/cm²) (data not shown); however, after 48 h, there is a significant higher percentage of positive cells and senescence was significantly decreased when trolox was added (*p < 0.001) (Fig. 6).

4. Discussion

A549 cells were exposed to PM₁₀ using a concentration of 10 µg/cm² and the effect of 10 µM trolox, a hydroxyl radical scavenger, was explored to investigate if the DNA damage induced by PM₁₀ is mediated by oxidative stress.

Table 2

Cell cycle distribution and apoptosis of A549 cells after PM₁₀ exposure.

	Cell phase (%)			Apoptosis (%)
	G0-G1	G2-M	S	
CT	58.6 ± 4.6	14.4 ± 7.0	26.8 ± 10.1	0.03 ± 0.005
PM ₁₀	57.7 ± 2.7	16.9 ± 4.7	25.3 ± 7.2	0.07 ± 0.01
PM ₁₀ +Tlx	54.1 ± 7.9	20.3 ± 6.6	27.8 ± 9.9	0.02 ± 0.005

CT: control; PM₁₀: airborne particulate matter (10 µg/cm²); PM₁₀ + Tlx: airborne particulate matter (10 µg/cm²) plus trolox (10 µM). Cell cycle distribution and apoptosis after 24 h of PM₁₀ exposure were measured by cytometry flow. Data are mean ± SD of 3 independent experiments.

One of the most important characteristics of PM₁₀ is their ability to penetrate into the thoracic part of the airways, where they could have adverse effects [33]. The effects observed in this work could be attributed to the components of PM₁₀, including polycyclic aromatic hydrocarbons [34]; endotoxin [35]; metals such as copper, iron, nickel, vanadium, zinc and lead [35]. Though it is true that some components of PM₁₀ such as metals can be internalized by the cell, some compounds execute their effects even when they cannot enter to the cell. For example, the endotoxin, which executes its effects through the stimulation of Toll-like receptor 4, a receptor that is expressed in A549 cells [36] while other PM₁₀ components such as metals can enter to the cell. On the other hand, the concentration of PM₁₀ used in this study (10 µg/cm²) did not find any decline in the viability; hence, we consider it a sub-lethal concentration, a condition that is unable to induce evident or immediate damage. The present data, using this concentration, indicate that exposure of A549 cells to PM₁₀ leads to rapid induction of DSBs formation, measured by the comet assay (Fig. 1). It should be stressed that the conditions used in this work are enough to induce DNA damage even when cells showed no apoptosis. A good correspondence was seen between the rise in expression of both γH2A.X and phospho-ATM induced by PM₁₀ (Fig. 3), which suggests that ATM mediated H2A.X phosphorylation in response to oxidative stress, because trolox was able to prevent this activation. Since we found an increase in phospho-ATM after PM₁₀ exposure, we searched for changes in 53BP1 since it is a substrate for ATM. We found 53BP1 over-expression after PM₁₀ exposure and it was hindered when trolox was added (Fig. 2). This over-expression is related to ROS increase and DNA repair. Indeed, 53BP1 is associated with a number of proteins involved in DSBs repair including Mre11, phospho-ATM (S1981), and phospho-Chk2 (T68) [37]. On the other hand, the expression in phospho-ATR after PM₁₀ exposure decreased and was not modified by trolox treatment (Fig. 2). At this point, it is important to notice that ATM exists as an inactive dimer and requires autophosphorylation for its activation [38] whereas ATR is recruited and interacts with an ATR-interacting protein, as part of its mechanism of activation [39–41]. The decrease in phosphorylated ATR could be attributed to the binding between ATR and its interacting protein. These findings allow us to visualize genomic instability since PM₁₀ induces an activation of DNA damage sensors (53BP1), transducers (ATM/ATR), and effectors (γH2A.X). The ATM and ATR kinases activate their downstream target proteins by phosphorylating specific serine or threonine residues, and Chk1 and Chk2 are particularly important because they phosphorylate additional substrates to maintain chromosome stability after various DNA damaging insults. Chk2 is known to mediate diverse cellular responses to genotoxic stress. The fundamental role of Chk2 is to regulate the network of genome-surveillance pathways that coordinate cell cycle progression with DNA repair and cell survival or death. Here, we show a Chk2 protein increase with no changes in phosphorylated protein after PM₁₀ treatment. It is well-established that after DNA damage, there is a recruitment of proteins including Chk2. This increase occurred without changes

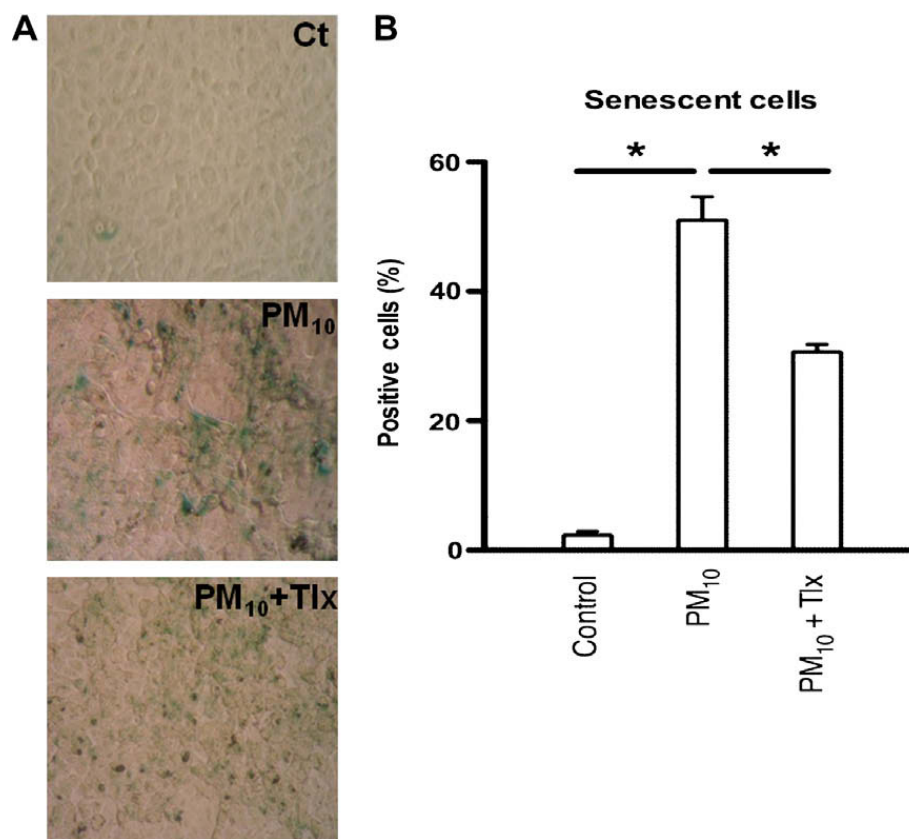


Fig. 6. (A) Senescence-like induction associated β -galactosidase activity on A549 cells exposed to airborne particulate matter (PM₁₀) (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and trolox (Tlx) (10 μM) after 48 h. (B) Percentage of μ -galactosidase positive cells counted after PM₁₀ and PM₁₀ plus Tlx (10 μM) exposure. Data are mean $\pm$ SD ($n = 3$, $p < 0.001$).

in phospho-Chk2 after 24 h of PM₁₀ exposure (Fig. 4), but it could be possible that phospho-Chk2 was under normal conditions at this point, just when the phosphorylated protein had decreased. This proposal is based on the recent report that the maximum expression of phosphorylated p53 at S15 overlaps in time with the peak of Chk2 activation but not with ATM activation and H2A.X phosphorylation, both of which crested 1–2 h after the treatment with an inhibitor of DNA topoisomerase I [42]. In fact, that report demonstrates a rapid H2A.X phosphorylation in A549 cells after exposure to a DNA topoisomerase I inhibitor, with the maximal rate occurring during the initial 2 h and peaking at 2 h of treatment [42]. However, the Chk2 activation occurs at a slower pace, peaking at 4 h [42]. In contrast, we found an increase in phospho-Chk1 (S317) after 24 h of PM₁₀ exposure with no changes when trolox was added (Fig. 4). Phospho-Chk1 is a key element in the DNA damage response pathway and plays a crucial role in G2/M checkpoint after activation by ATR. Both, Chk1 and Chk2 have important roles in this process through multiple mechanisms. For example, Chk1 controls the proper timing of mitotic onset by phosphorylating Cdc25A, which is mainly expressed in G1, but at the end of mitosis, Cdc25A levels rapidly decrease because of its degradation. In S and G phases, Cdc25A is targeted for proteasome-mediated degradation by Chk1 and Chk2. We found interestingly, a decrease in both Cdc25A and phospho-Cdc25A and trolox was unable to prevent this change (Fig. 4). Since phos-

pho-Chk1 is increased after PM₁₀ exposure and Cdc25A is decreased, we propose that phospho-Chk1 phosphorylates Cdc25A leading to its degradation, the major fate of Cdc25A in response to DNA damage. In addition, an increase in p53 phosphorylated at S15 and lack of MDM2, a key negative regulator of the tumor suppressor p53 after PM₁₀ exposure and both effects were suppressed with trolox treatment (Fig. 5). MDM2 expression is activated by p53; the p53 increase led to an up-regulation of MDM2 in cells with wild type p53 (such as A549 cells used in this study), however we observed just the opposite in this work. Nevertheless, a clear increase occurred in both total p53 and p53 phosphorylated at S15, together with an absence of MDM2, which could be attributed to the change of all the protein to its phosphorylated form attenuating MDM2-dependent export of p53 from nuclei to cytoplasm, leading to nuclear retention of p53 [43]. At this point, we demonstrated that PM₁₀ at a sub-lethal concentration has genotoxic effects as evident as DSBs, γ H2A.X foci formation, and recruitment of 53BP1; to protect the genome, cells activate ATM/ATR/Chk1/Chk2/p53 pathway. The use of trolox, which acts as hydroxyl radical scavenger, is able to prevent some of the alterations observed after PM₁₀ exposure, demonstrating the important role of ROS as mediator of PM₁₀-induced genotoxicity. The mechanism by which ROS are formed is not completely described but the transition metals from PM₁₀ may contribute to ROS formation by Fenton reactions to generate hydroxyl radicals

[44]. The trolox exposure protects the A549 cells from DNA damage avoiding the activation of ATM/ART/Chk1/Chk2/p53 pathway induced, at least in part, by hydroxyl radicals. In this regard, when DNA is not properly restored after checkpoint activation, cell cycle arrest or apoptosis could be prepared by the cell machinery to provide time to carry out the DNA repair or to protect the genome. While A549 cells exposed to PM₁₀ sense and respond against DNA damage by the activation of ATM/ART/Chk1/Chk2/p53 pathway, the DNA repair efficiency is unknown, it is possible that the effectiveness was incomplete, just as recently reported by Mehta and colleagues [45]. Interestingly, they found a 35% reduction in nucleotide excision repair capacity, and five-fold increase in mutation frequency in human cells exposed to urban PM, and a reduction in DNA repair is associated with an increase in mutagenesis and, therefore, carcinogenesis. In this work, although DNA seems to have been repaired after PM₁₀ exposure because it was possible to detect DNA damage foci in which proteins related to DNA repair pathways could be recruited, which lastly guided the cells to a senescence-like state after 48 h. The markers of cellular senescence include p16INK4a, p21CIP1/WAF1, PAI-1, phosphorylated H2A.X, activated Chk1 and Chk2 [46,47]; the three last proteins underwent expression changes after PM₁₀ exposure. In addition, the above proteins mentioned are linked to p53 expression, which is strongly related to oxidative stress. Senescent cells may be involved not only in impaired tissue regeneration but also in the inflammatory response, which is observed after PM₁₀ exposure in A549 cells [35,48]. Interestingly, DNA damage induced by benzo(a)pyrene diol epoxide is associated with the development of cancer [49], and benzo(a)pyrene is a constituent of PM₁₀ [35]. In addition, trolox treatment was able to prevent the increase in the percentage SA- β -galactosidase-positive cells by PM₁₀ in A549 cells, demonstrating the important role of ROS in the senescence-like induction. Indeed, there are reports that demonstrate ROS participation in senescence [50,51] through the involvement of p53 [52]. In spite of DSBs formation, the increase in p53 activity and senescence-like induction by PM₁₀ exposure, the cell cycle arrest is not observed. In this regard, it has been reported that those elements are not enough to maintain the cell cycle arrest [53] and other proteins, such as p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} and p16INK4a are needed to induce a permanent senescence state [54–56]. On the other hand, it is known that the inactivation of the DNA checkpoint kinases in senescence events can restore cell cycle progression S phase and they noted that efficient maintenance of cell cycle arrest in senescent cells depends on the continued activity of DNA damage checkpoint kinases, [46]. Based on the above information, we suggest that DSBs formation and ROS generation induced by PM₁₀ exposure are involved in the senescent-like phenotype, and our observations could be in the transition from reversible growth arrest but it is also possible find a permanent one if the DNA damage persists. Hence, a detailed senescence-induced mechanism must be investigated to explain why PM₁₀ exposure induces (SA)- β -galactosidase activity but not cell cycle arrest. On the other hand, if there is no cell cycle arrest even when the DNA damage and the increase in ROS formation persist, these

alterations could lead to cancer development, since a good correlation between PM₁₀ exposure and the increase on the risk of lung cancer has been observed [1–3]. Finally, the present work provides strong evidence that there is an activation of the DNA repair machine after 24 h of PM₁₀ exposure strongly related to ROS formation that could provide and an adequate environment for cancer development.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to Yazmín Segura and Raúl Quintana, participants in the field campaign. This work was supported by CONAcYT-Mexico Grants 43183-M, AC-2006-52830. Posdoctoral Fellowship to Yolanda I. Chirino from CONAcYT (CVU 49870) and a Parker B. Francis Fellowship, USA, to Claudia María García-Cuellar are acknowledged. We thank Ingrid Mascher for revising the English version of the manuscript.

References

- [1] C.A.R. Pope, D.W. Dockery, Critical review: health effects of fine particulate air pollution: lines that connect, *J. Air Waste Manage. Assoc.* 56 (2006) 709–742.
- [2] P. Vineis, K. Husgafvel-Pursiainen, Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1846–1855.
- [3] W.L. Beeson, D.E. Abbey, S.F. Knutsen, Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: results from the AHSMOG study, *Adventist Health Study on Smog, Environ. Health Perspect.* 106 (1998) 813–823.
- [4] E. Alfaro-Moreno, L. Martinez, C. García-Cuellar, J.C. Bonner, J.C. Murray, I. Rosas, S.P. Rosales, A.R. Osornio-Vargas, Biologic effects induced in vitro by PM₁₀ from three different zones of Mexico City, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 715–720.
- [5] J.C. Bonner, A.B. Rice, P.M. Lindroos, P.O. O'Brien, K.L. Dreher, I. Rosas, E. Alfaro-Moreno, A.R. Osornio-Vargas, Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19 (1998) 672–680.
- [6] P.S. Vinzents, P. Moller, M. Sorensen, L.E. Knudsen, O. Hertel, F.P. Jensen, B. Schibye, S. Loft, Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 1485–1490.
- [7] H.L. Karlsson, L. Nilsson, L. Moller, Subway particles are more genotoxic than street particles and induce oxidative stress in cultured human lung cells, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 19–23.
- [8] R.M. Mroz, R.P. Schins, H. Li, L.A. Jimenez, E.M. Drost, A. Holownia, W. MacNee, K. Donaldson, Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways, *Eur. Respir. J.* 31 (2008) 241–251.
- [9] D. Upadhyay, V. Panduri, A. Ghio, D.W. Kamp, Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29 (2003) 180–187.
- [10] H. Sato, H. Sone, M. Sagai, K.T. Suzuki, Y. Aoki, Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust, *Carcinogenesis* 21 (2000) 653–661.
- [11] T. Ichinose, Y. Yajima, M. Nagashima, S. Takenoshita, Y. Nagamachi, M. Sagai, Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles, *Carcinogenesis* 18 (1997) 185–192.
- [12] R.M. Mroz, R.P. Schins, H. Li, E.M. Drost, W. Macnee, K. Donaldson, Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NF κ B DNA binding in lung epithelial A549 cell line, *J. Physiol. Pharmacol.* 58 (Suppl 5) (2007) 461–470.
- [13] S. Soberanes, V. Panduri, G.M. Mutlu, A. Ghio, G.R. Bundinger, D.W. Kamp, p53 Mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 (2006) 1229–1238.
- [14] A. Celeste, O. Fernandez-Capetillo, M.J. Kruhlak, D.R. Pilch, D.W. Staudt, A. Lee, R.F. Bonner, W.M. Bonner, A. Nussenzweig, Histone

- H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 675–679.
- [15] T. Tanaka, X. Huang, E. Jorgensen, D. Gietl, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, A.P. Albino, ATM activation accompanies histone H2AX phosphorylation in A549 cells upon exposure to tobacco smoke, *BMC Cell Biol.* 8 (2007) 26.
- [16] I. Rappold, K. Iwabuchi, T. Date, J. Chen, Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways, *J. Cell Biol.* 153 (2001) 613–620.
- [17] J. Jin, X.L. Ang, X. Ye, M. Livingstone, J.W. Harper, Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 19322–19328.
- [18] S. Sidi, T. Sanda, R.D. Kennedy, A.T. Hagen, C.A. Jette, R. Hoffmans, J. Pascual, S. Imamura, S. Kishi, J.F. Amatrudda, J.P. Kanki, D.R. Green, A.A. D'Andrea, A.T. Look, Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3, *Cell* 133 (2008) 864–877.
- [19] U.M. Moll, O. Petrenko, The MDM2-p53 interaction, *Mol. Cancer Res.* 1 (2003) 1001–1008.
- [20] P.J. Rossner, V. Svecova, A. Milcova, Z. Lnenickova, I. Solansky, R.J. Sram, Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part I. Oxidative damage to DNA, *Mutat. Res.* 642 (2008) 14–20.
- [21] P.J. Rossner, V. Svecova, A. Milcova, Z. Lnenickova, I. Solansky, R.J. Sram, Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part II. Oxidative damage to lipids and proteins, *Mutat. Res.* 642 (2008) 21–27.
- [22] M. Moriya, Y.H. Ho, A. Grana, L. Nguyen, A. Alvarez, R. Jamil, M.L. Ackland, A. Michalczyk, P. Hamer, D. Ramos, S. Kim, J.F. Mercer, M.C. Linder, Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (2008) C708–C721.
- [23] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [24] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [25] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [26] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350–4354.
- [27] V. Girish, A. Vijayalakshmi, Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ, *Indian J. Cancer* 41 (1) (2004) 47.
- [28] G.P. Dimiri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, et al, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9363–9367.
- [29] W. Gorczyca, M.R. Melamed, Z. Darzynkiewicz, Analysis of apoptosis by flow cytometry, *Methods Mol. Biol.* 91 (1998) 217–238.
- [30] B. Wang, S. Matsuoka, P.B. Carpenter, S.J. Elledge, 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint, *Science* 298 (2002) 1435–1438.
- [31] C. Chao, S. Saito, C.W. Anderson, E. Appella, Y. Xu, Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 11936–11941.
- [32] S.Y. Shieh, M. Ikeda, Y. Taya, C. Prives, DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2, *Cell* 91 (1997) 325–334.
- [33] B. Brunekreef, B. Forsberg, Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health, *Eur. Respir. J.* 26 (2005) 309–318.
- [34] W. Hu, Z. Feng, M.S. Tang, Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis, *Carcinogenesis* 25 (2004) 455–462.
- [35] E. Alfaro-Moreno, S. Ponce-de-Leon, A.R. Osornio-Vargas, C. Garcia-Cuellar, L. Martinez, I. Rosas, Potential toxic effects associated to metals and endotoxin present in PM10: an ancillary study using multivariate analysis, *Inhal. Toxicol.* 19 (Suppl. 1) (2007) 49–53.
- [36] R. MacRedmond, C. Greene, C.C. Taggart, N. McElvaney, S. O'Neill, Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide, *Respir. Res.* 6 (2005) 116.
- [37] J. Guirouilh-Barbat, C. Redon, Y. Pommier, Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 3969–3981.
- [38] C.J. Bakkenist, M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature* 421 (2003) 499–506.
- [39] L. Zou, D. Liu, S.J. Elledge, Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 13827–13832.
- [40] V. Costanzo, J. Gautier, Single-strand DNA gaps trigger an ATR- and Cdc7-dependent checkpoint, *Cell Cycle* 2 (2003) 17.
- [41] D. Cortez, S. Guntuku, J. Qin, S.J. Elledge, ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling, *Science* 294 (2001) 1713–1716.
- [42] H. Zhao, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation, *Cell Cycle* 7 (2008) 3048–3055.
- [43] T. Shinozaki, A. Nota, Y. Taya, K. Okamoto, Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export, *Oncogene* 22 (2003) 8870–8880.
- [44] A.E. Aust, J.C. Ball, A.A. Hu, J.S. Lighty, K.R. Smith, A.M. Straccia, J.M. Veranth, W.C. Young, Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells, *Res. Rep. Health Eff. Inst.* (2002) 1–65.
- [45] M. Mehta, L.C. Chen, T. Gordon, W. Rom, M.S. Tang, Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis, *Mutat. Res.* 657 (2008) 116–121.
- [46] F. d'Adda di Fagnana, P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, S.P. Jackson, A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence, *Nature* 426 (2003) 194–198.
- [47] T. Suzuki, S. Minagawa, E. Michishita, H. Ogino, M. Fujii, Y. Mitsui, D. Ayusawa, Induction of senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine in HeLa cells, *Exp. Gerontol.* 36 (2001) 465–474.
- [48] E. Alfaro-Moreno, T.S. Nawrot, B.M. Vanaudenaerde, M.F. Hoylaerts, J.A. Vanoirbeek, B. Nemery, P.H. Hoet, Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10, *Eur. Respir. J.* 32 (2008) 1184–1194.
- [49] I. Orlow, B.J. Park, U. Mujumdar, H. Patel, P. Siu-Lau, B.A. Clas, R. Downey, R. Flores, M. Bains, N. Rizk, G. Dominguez, J. Jani, M. Berwick, C.B. Begg, M.G. Kris, V.W. Rusch, DNA damage and repair capacity in patients with lung cancer: prediction of multiple primary tumors, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 3560–3566.
- [50] A. Catalano, S. Rodilossi, P. Caprari, V. Coppola, A. Procopio, 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation, *EMBO J.* 24 (2005) 170–179.
- [51] A.C. Lee, B.E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N.S. Bae, T. Hirai, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, B.H. Howard, T. Finkel, Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7936–7940.
- [52] J. Campisi, Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism, *Trends Cell Biol.* 11 (2001) S27–31.
- [53] M.M. Sugrue, D.Y. Shin, S.W. Lee, S.A. Aaronson, Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 9648–9653.
- [54] L. Fang, M. Igarashi, J. Leung, M.M. Sugrue, S.W. Lee, S.A. Aaronson, p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53, *Oncogene* 18 (1999) 2789–2797.
- [55] J. Brugarolas, C. Chandrasekaran, J.I. Gordon, D. Beach, T. Jacks, G.J. Hannon, Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency, *Nature* 377 (1995) 552–557.
- [56] C. Deng, P. Zhang, J.W. Harper, S.J. Elledge, P. Leder, Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell* 82 (1995) 675–684.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 19/06/2009

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL de la alumna YESENNIA SANCHEZ PEREZ, matrícula 205182689, quien cumplió con los 180 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 90 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha diecinueve de junio del 2009 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

RESPUESTA DE DAÑO A DNA EN CELULAS A549 EXPUESTAS A PARTICULAS URBANAS (PM10): PARTICIPACION DEL ESTRES OXIDANTE

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 360 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobada.

JURADO

Presidente

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

Secretaria

DRA. ANDREA MARISA GABRIELA DE
VIZCAYA RUIZ

Vocal

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

Vocal

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000

Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876