



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL  
POR INVESTIGACIÓN**

**“LAS PARTÍCULAS SUSPENDIDAS (PM<sub>10</sub>) ALTERAN LA  
MAQUINARIA DE LA VÍA DE REPARACIÓN DE UNION DE  
EXTREMOS NO HOMOLOGOS EN CÉLULAS DE PULMÓN A549”**

**QUE PRESENTA EL ALUMNO**

**Javier Ivan Lozolla Ortiz**

**(2173063531)**

**Asesora Interna**

Dra. María Teresa Núñez Cardona

Profesor- Investigador

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

**Asesora Externa**

Dra. Yesennia Sánchez Pérez

Subdirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

**Ciudad de México**

**noviembre 1 de 2022**

## RESUMEN

Las partículas suspendidas (particulate matter) con un diámetro aerodinámico  $\leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) son carcinógenas para los humanos, están formadas por compuestos biológicos y químicos tanto orgánicos como inorgánicos. La exposición a  $\text{PM}_{10}$  induce daño al DNA por rupturas de doble cadena (DSB) asociadas a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de aductos en el DNA. La vía de reparación de Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) es una de las encargadas de reparar este tipo de lesiones; esta vía se divide en tres fases: fase de reconocimiento del daño, donde participan las proteínas KU70, KU80 y ADN-PKcs; fase de procesamiento, en la que están involucradas las proteínas Artemis y Pol  $\mu$  y Pol  $\lambda$  y fase de finalización reguladas por las proteínas XRCC4, Ligasa IV, XLF. Se ha descrito que las  $\text{PM}_{10}$  inhiben la vía de reparación de escisión de nucleótidos, lo que sugiere que también podrían inducir alteraciones en la vía de NHEJ. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de las  $\text{PM}_{10}$  sobre la expresión y los niveles de las proteínas KU70, KU80, Artemis y XRCC4, para ello se expusieron células epiteliales de pulmón humano (A549) a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  durante 6, 12 y 24 h. Para evaluar la expresión génica y los niveles de proteína, se extrajo el ARN y la proteína; se realizó RT-qPCR y Western Blot. Las  $\text{PM}_{10}$  disminuyeron la expresión de *Ku80* y *XRCC4* a las 6 h de exposición, no se encontraron cambios en la expresión de *Ku70* ni de *Artemis* y no se observó alteración en los niveles de dichas proteínas. A las 12 h las  $\text{PM}_{10}$  aumentaron la expresión de *Ku70* y no se observaron cambios en su proteína; la expresión de *Ku80*, *Artemis* y *XRCC4* no presentó cambios; sin embargo, los niveles de proteína de KU80 y XRCC4 disminuyeron. Se observó un aumento en la expresión de *XRCC4* a las 24 h y no se observaron cambios en los niveles de los otros genes ni en las proteínas evaluadas. Estos resultados demuestran que las  $\text{PM}_{10}$  alteran la expresión y los niveles de proteína de la vía NHEJ, lo que podría conllevar a una alteración en el reconocimiento del daño en doble cadena y durante la ligación de las cadenas reparadas.

**PALABRAS CLAVE:** *PM<sub>10</sub>, Rupturas de Doble Cadena (DSB), Mecanismos de reparación de Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ), Cáncer de Pulmón.*

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	13
OBJETIVOS .....	13
<i>Objetivo general</i> .....	13
<i>Objetivos específicos</i> .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
<i>Recolecta de PM<sub>10</sub></i> .....	14
<i>Cultivo celular y exposición a PM<sub>10</sub></i> .....	14
<i>Análisis de los niveles de expresión génica</i> .....	15
<i>Extracción y Cuantificación de proteínas</i> .....	16
<i>Análisis Western Blot</i> .....	17
<i>Análisis estadístico</i> .....	17
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN .....	22
CONCLUSIONES .....	26
REFERENCIAS.....	26

## INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire se define como una mezcla compleja de gases y de partículas suspendidas (PM por sus siglas en inglés) que se encuentran en concentraciones que pueden dañar a los humanos y al ambiente. Las PM se clasifican de acuerdo con su diámetro aerodinámico, aquellas  $\leq 10 \mu\text{m}$  se clasifican como  $\text{PM}_{10}$  y las que son  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  como  $\text{PM}_{2.5}$ . Las PM son una mezcla heterogénea y compleja de compuestos inorgánicos, orgánicos y biológicos, se caracterizan por su contenido en polvo, hollín, metales de transición, sales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), productos bacterianos (endotoxinas) y hongos (Harrison y Yin, 2000); la composición de las partículas suspendidas juega un papel importante en la genotoxicidad y en su potencial carcinogénico (Morales *et al.*, 2016). Las PM pueden ser generadas tanto de manera natural o antropogénica, por fuentes móviles o estacionarias, destacando los procesos mecánicos, evaporación de aerosoles, suspensión de polvos y reacción de gases, como las principales fuentes de emisión (Villalobos *et al.*, 2008; SEMARNAT, 2011).

En 2013 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó a la contaminación del aire y a las PM como carcinógenos para los humanos (IARC, 2016). Las partículas menores a  $10 \mu\text{m}$  pueden ingresar al organismo por inhalación y quedar depositadas en las vías respiratorias, algunas incluso alcanzan las regiones de los bronquiolos respiratorios o los sacos alveolares (Londoño y Vasco, 2008). Algunos componentes de las PM destacan por su carcinogenicidad, como el Benzo [a] pireno, Benzo [a] antraceno o metales como Cadmio, Cromo y Arsénico, y su abundancia en el ambiente, siendo claves para el desarrollo de neoplasias (IARC, 2016).

La exposición prolongada a PM se asocia con el cáncer de pulmón (Pope *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2021), el cual, es responsable de 2.2 millones de casos y 1.8 millones de muertes, lo que lo posiciona como el segundo cáncer con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer; aproximadamente el 14% de las muertes por cáncer de pulmón son atribuidas a las PM (Sung *et al.*, 2021).

Entre los efectos a nivel celular y molecular, derivados de la exposición a PM destacan la inflamación, el estrés oxidante, el daño al ADN (rompimientos de cadena sencilla y de doble cadena), la inestabilidad genómica y las alteraciones en las vías para la reparación del ADN (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009; Santibáñez-Andrade *et al.*, 2017; Quezada-Maldonado *et al.*, 2022). Las PM contribuyen con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el subsecuente estrés oxidante. Las ROS son una de las principales causas de daño al ADN porque causan rompimiento de una cadena o doble cadena (DSB), formación de 8-OHdG y una subsecuente formación de micronúcleos (Vattanasit *et al.*, 2014; Chirino *et al.*, 2010). Si bien el estrés oxidante es un factor para el daño en ADN, las DSB también pueden inducirse como resultado indirecto de la formación de aductos voluminosos. Este tipo de lesiones en el ADN puede inducir apoptosis celular, inactivación de genes o aberraciones cromosómicas (Niu *et al.*, 2020; Rossner *et al.*, 2014).

Las DSB se pueden reparar mediante dos vías: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Christmann *et al.*, 2003). Más del 90%

de las DSB son reparadas por NHEJ debido a que actúa durante todo el ciclo celular y no requiere de una plantilla de ADN lo que facilita su reparación (Quezada-Maldonado *et al.*, 2021). Si bien en este tipo de reparación los extremos de las cadenas se colocan juntas y se pegan sin que se restaure la secuencia, es un mecanismo simple y rápido de reparación (Lagunas-Rangel, 2018).

Diversas proteínas están involucradas en la vía NHEJ; una vez que se da la ruptura de la doble cadena de ADN, las proteínas KU70/80 se unen a los extremos de las cadenas de ADN para formar el complejo KU-ADN y reconocer el daño, posteriormente en este complejo se unen las proteínas ADN-PKcs con el objetivo de mantener los extremos estables, prevenir la resección y fosforilar a la histona H2A.X generando  $\gamma$ -H2A.X (marcador de DSB) (Meek *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2006). En el siguiente paso de la reparación, se une la enzima Artemis para formar el complejo Artemis/ADN-PKcs, y que los extremos queden alineados mediante su actividad como endonucleasa o exonucleasa. Las polimerasas  $\mu$  y  $\lambda$ ) miembros de la familia Pol X (Pol  $\xi$ ) se encargan de sintetizar los nucleótidos faltantes de ADN, y el complejo XRCC4/ligasa IV une los extremos de las cadenas (Rossner *et al.*, 2011).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de las PM<sub>10</sub> en la expresión y niveles de proteína KU70, KU80, Artemis y XRCC4 en células epiteliales de pulmón A549.

## REVISIÓN DE LITERATURA

La contaminación del aire se define como la presencia en la atmósfera de sustancias no deseables, en concentraciones, tiempo y circunstancias tales que pueden afectar la salud y el bienestar de las personas y seres vivos (Londoño y Vasco, 2008). La calidad del aire es el resultado de fenómenos complejos como son las características geográficas de la zona, cantidad de contaminantes emitidos de manera natural y actividades meteorológicas; aunado a esto, las actividades antropogénicas participan de manera importante y dependen principalmente de procesos de combustión provenientes de los hogares, las emisiones de los vehículos de motor de combustión, las instalaciones industriales y los incendios forestales, entre otras fuentes más (PROAIRE, 2011).

Los contaminantes del aire se clasifican con base en su origen de la forma siguiente:

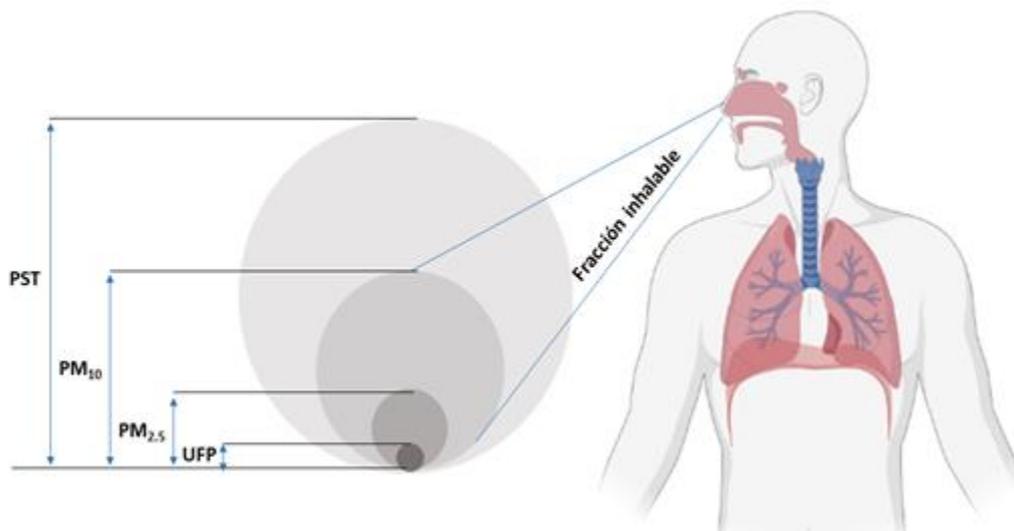
- Contaminantes primarios. Aquéllos que son emitidos directamente a la atmósfera por alguna fuente de emisión. Los contaminantes que integran este grupo son: óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), partículas suspendidas (PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>) e Hidrocarburos.
- Contaminantes secundarios. Son aquéllos generados en el aire como consecuencia de la transformación y reacciones químicas que sufren los contaminantes primarios en la atmósfera, entre los cuales está el ozono (O<sub>3</sub>), dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, lluvia ácida y la contaminación fotoquímica (SEMARNAT, 2013); las PM también pertenecen a este grupo (Burton *et al.*, 1996; Harrison y Msibi 1994).

Actualmente se han establecido seis contaminantes criterio y son aquéllos normados por lo que se determina un límite máximo permisible de concentración en el aire, con la finalidad de proteger la salud humana y asegurar el bienestar de la población. Entre estos contaminantes están el ozono (O<sub>3</sub>), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), partículas suspendidas (PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>) y plomo (Pb). De los contaminantes presentes en la atmósfera los que tienen mayor impacto sobre la salud son el ozono y las partículas suspendidas menores a 10 µm (PM<sub>10</sub>) (Rivera-Hidalgo *et al.*, 2016).

Las partículas suspendidas son una mezcla compleja y heterogénea de diversos materiales sólidos y líquidos; de acuerdo con su origen pueden variar en tamaño, forma y composición. Debido a que las PM no tienen una forma totalmente esférica su tamaño se define conforme a su diámetro aerodinámico el cual es un equivalente al diámetro de una partícula hipotética esférica de densidad unitaria que tienen la misma velocidad de sedimentación gravitacional que la partícula en cuestión, independientemente de su tamaño, forma o densidad (U.S. EPA. 2004). Las partículas con diámetro aerodinámico mayor a 50 µm se denominan PST (partículas suspendidas totales); las de diámetro aerodinámico menor o igual a 10 µm se denominan PM<sub>10</sub> y de diámetro menor o igual a 2.5 µm se les designa PM<sub>2.5</sub>, finalmente, las que tiene un diámetro menor a 0.1 µm se denomina partículas ultrafinas (UFP) (Santibáñez-Andrade *et al.*, 2019) (figura 1).

El diámetro aerodinámico de las aeropartículas determina el tiempo en que estas permanecen en suspensión, así, las partículas de mayor tamaño son las que se depositan más rápidamente, mientras que las partículas pequeñas pueden permanecer en suspensión durante horas o días (PROAIRE, 2011). Las partículas cuyo diámetro aerodinámico es menor o igual a 10 micrómetros son especialmente dañinas para la salud de la población. Es decir, mientras menor sea su tamaño mayor será el daño que inducen debido a que tienen la capacidad de ingresar a zonas profundas del aparato respiratorio de los humanos (Rivera-Hidalgo *et al.*, 2016).

Diversos estudios se han encargado de caracterizar la composición de las partículas suspendidas de diversas regiones, demostrando la presencia de compuestos orgánicos, inorgánicos y biológicos. La composición de las partículas varía dependiendo de la zona y época del año, entre sus componentes principales se encuentra material orgánico (Ej. Proveniente de asaderos de carbón, actividades de construcción, quema de residuos de madera y residuos domiciliarios), material geológico que puede ser provocado por caminos sin pavimentar, terrenos baldíos y trituración de polvo, carbono elemental (ineficiencia de los motores de vehículos), elementos traza, entre otros (Canales-Rodríguez *et al.*, 2014).



**Figura 1. Clasificación de las PM de acuerdo con su diámetro aerodinámico.** El material particulado se clasifica en Partículas Suspendidas Totales (PST), partículas suspendidas con diámetro aerodinámico menor o igual a  $10\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ), partículas suspendidas con diámetro aerodinámico menor o igual a  $2.5\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) y partículas ultrafinas con diámetro aerodinámico menor o igual  $0.1\mu\text{m}$ . Como se observa en la imagen las fracciones más grandes contienen a las partículas de menor diámetro; UFP son parte de  $\text{PM}_{2.5}$ , que a su vez son parte de  $\text{PM}_{10}$  y estas son parte de las PST (figura modificada de Englert, 2004).

Además de estos componentes, en las  $\text{PM}_{10}$  de la Ciudad de México se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como Benzo (a) antraceno, Benzo (a) pireno, Naftaleno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Benzo (b) fluranteno, entre otros; metales como Aluminio, Silicio, Fósforo, Azufre, Cloro, Potasio, Calcio, Titanio, Cromo, Cromo, Manganeso, Hierro, Níquel, Cobre, Zinc y Plomo y endotoxinas (Chirino *et al.*, 2015; Rojano *et al.*, 2014). La composición de las PM tiene implicaciones por los daños en los sistemas biológicos, por ejemplo, las endotoxinas están fuertemente relacionados con procesos inflamatorios (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009; Vattanasit *et al.*, 2014); los HAP están relacionados con la formación de aductos y DSB (Quezada-Maldonado *et al.*, 2022; Tung *et al.*, 2014) y a los metales se les asocia con la generación de ROS a través de reacciones de Fenton (Chirino *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2016).

De acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos naturales (SEMARNAT), en México se emiten aproximadamente 889,745 y 602,553 toneladas anuales de  $\text{PM}_{10}$  y  $\text{PM}_{2.5}$ . Entre las principales fuentes de emisión destacan las fuentes de área (Ej. combustión agrícola y doméstica de biomasa e incendios forestales) con un 68 % para  $\text{PM}_{10}$  y 65 % para  $\text{PM}_{2.5}$ , seguida de las fuentes fijas (procesos industriales de manufactura) con un 22 % para  $\text{PM}_{10}$  y 21 % para  $\text{PM}_{2.5}$  y por último las fuentes móviles con un 10 % para  $\text{PM}_{10}$  y 14 % para  $\text{PM}_{2.5}$  (SEMARNAT, 2016).

Actualmente, para prevenir los efectos de la contaminación en la salud de los humanos, se han formalizado normas de emisión a nivel mundial y en México, en las que se establecen los niveles máximos permisibles para las partículas

suspendidas (tabla 1). Si bien, en México estos niveles están por encima de los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se espera que con el paso de los años los niveles sean alcanzados (DOF, 2021).

**Tabla 1. Niveles permisibles de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>, en México y en el mundo.**

		Media de 24h	Media anual
Niveles permisibles a nivel mundial (WHO, 2021)	PM <sub>10</sub>	45 µg/m <sup>3</sup>	15 µg/ m <sup>3</sup>
	PM <sub>2.5</sub>	15 µg/ m <sup>3</sup>	5 µg/m <sup>3</sup>
Niveles permisibles en México (NOM-020-SSA1-2021) (DOF, 2021)	PM <sub>10</sub>	70 µg/m <sup>3</sup>	36 µg/m <sup>3</sup>
	PM <sub>2.5</sub>	41 µg/m <sup>3</sup>	10 µg/m <sup>3</sup>

En 2013 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a la contaminación del aire y a las PM como carcinógenas para los humanos (Grupo 1). El grupo de trabajo encontró que las pruebas epidemiológicas eran suficientes en humanos y se consideraron los mecanismos toxicológicos descritos hasta ese momento. En estudios humanos existe evidencia mecanicista sobre el aumento de la frecuencia de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas, así como estudios en animales y en líneas celulares que mostraban efectos a nivel del ADN (IARC, 2016).

Los efectos a la salud dependen del tipo de contaminante, el grado de exposición, el estado nutricional y de salud, así como de la carga genética del individuo. Las PM pueden ingresar en la parte torácica de las vías respiratorias, dando como resultado efectos adversos a la salud (PROAIRE, 2011; Brunekreef y Forsberg, 2005). El diámetro aerodinámico de las partículas es un factor importante que determina su capacidad de penetración y retención en diversas regiones de las vías respiratorias. Mientras que las PM<sub>10</sub> penetran y se alojan fácilmente a lo largo del tracto respiratorio hasta los bronquios, las PM<sub>2.5</sub> y UFP causan daño en las paredes alveolares y también a nivel sistémico, tanto por lesiones en el tejido pulmonar como por la posibilidad de que ingresen al torrente sanguíneo y depositarse en otros órganos (DOF, 2021).

Entre los efectos a la salud relacionados con las PM se encuentran trastornos al sistema nervioso central, problemas respiratorios como reducción de la función pulmonar, el asma, enfermedades cardiovasculares; cáncer de pulmón y de vejiga (Rivera-Hidalgo *et al.*, 2016; Castaño-Vinyals *et al.*, 2008; Tecer *et al.*, 2008).

Actualmente el cáncer de pulmón es el segundo diagnosticado y la principal causa de muerte por esta enfermedad, con un estimado de 2.2 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes (2020). Del total de muertes causadas por esta neoplasia, se atribuye alrededor de 14% a la contaminación del aire exterior (Sung *et al.*, 2021). Diversos estudios epidemiológicos han destacado la asociación de la exposición a

largo plazo a PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> sobre la mortalidad y la incidencia con el cáncer de pulmón; donde un incremento de 10 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>2.5</sub> se asocia con un riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón del 8 y 9% y una incidencia del 16%, por otro lado un incremento de 10 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>10</sub> se asocia con un riesgo de mortalidad del 8% y una incidencia del 22% (Pope *et al.*, 2002; Hamra *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2021).

Los mecanismos por los cuales las PM producen sus efectos citotóxicos y genotóxicos no están dilucidados completamente, pero se ha observado que tienen una estrecha relación con la composición química y biológica. Diversos estudios han demostrado el papel de las PM en la citotoxicidad celular al aumentar los niveles de ROS, generar estrés oxidante y provocar lesiones en el ADN mediante la oxidación de bases (formación de 8-oxoG) o rupturas de las cadenas de ADN. Se han atribuido los metales presentes en las PM como uno de los principales componentes de las PM, responsables del estrés oxidante (Niu *et al.*, 2020; Danielsen *et al.*, 2009; Chirino *et al.* 2010; Alfaro-Moreno *et al.*, 2002).

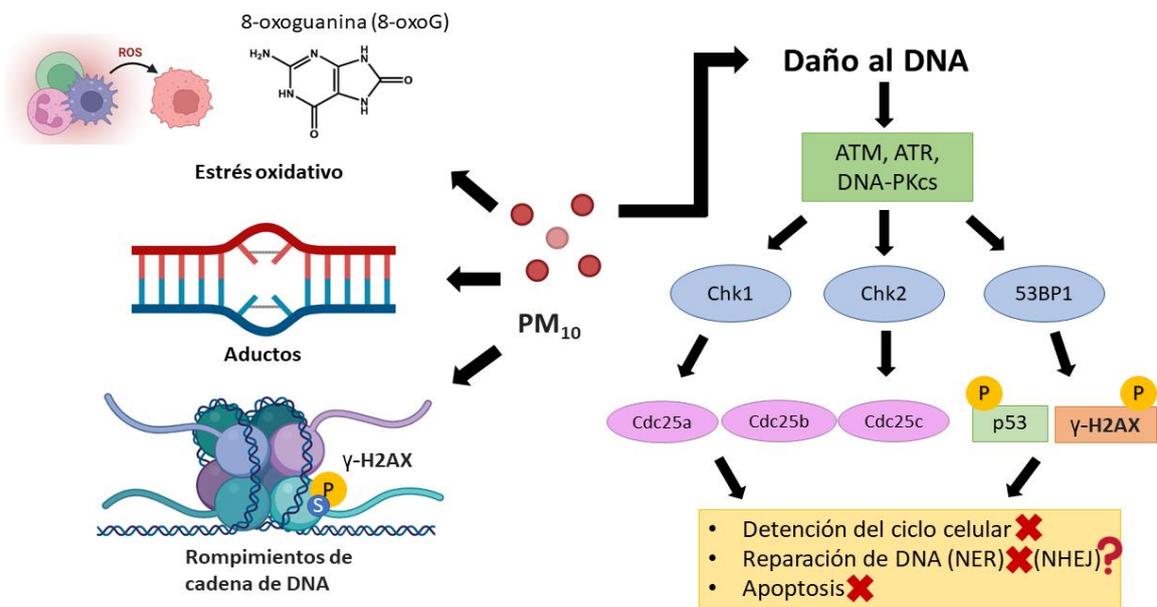
Otro de los daños al ADN asociados a la exposición a PM, es la formación de aductos voluminosos derivados del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Una de las principales vías para reparar este tipo de aductos es la vía de reparación por escisión de nucleótidos, sin embargo, se ha demostrado que en presencia de PM<sub>10</sub> la vía se ve inhibida como consecuencia de la disminución de XPA (proteína involucrada en el reconocimiento del daño) y aumento de la fosfatasa WIP1; de acuerdo con estos antecedentes, se ha propuesto que las PM<sub>10</sub> pueden afectar otras vías de reparación como la vía de Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) (Quezada-Maldonado *et al.*, 2022).

Adicionalmente, se ha señalado la formación de rupturas de doble cadena (DSB) como una de las modificaciones más importantes al ADN inducida por PM; asociado a este daño se genera la fosforilación de la histona H2A.X en serina 139 (γ-H2A.X) (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009), la cual es un marcador de DSB y a partir del cual se puede iniciar la respuesta ante el daño e inducir la reparación (Mukherjee *et al.*, 2006) (Figura 2).

El reconocimiento de daño al ADN es necesario para la inducción de la señalización y subsecuente respuesta celular para el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN dañado, o que las células inicien el proceso de apoptosis. Los procesos antes mencionados, están mediados por un grupo de proteínas quinasa como: Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), Ataxia Relacionada con Telangiectasia (ATR) y la Subunidad Catalítica de la Proteína Quinasa dependiente del ADN (DNA-PKcs) (Christmann *et al.*, 2003). Las proteínas ATM y ATR activan las quinasas Serina/Treonina Checkpoint, Chk1 y Chk2, las cuales están involucradas en los puntos de control de daño al ADN, lo que permite retrasar la progresión del ciclo celular o inducir la muerte celular. Chk2 es una proteína activada principalmente por ATM en respuesta a DSB; por su parte Chk1 es activada por ATR (Bartek & Lukas., 2003). Chk1 y Chk2 tienen varios efectores incluidas las proteínas de la familia de división celular 25 (Cdc25), que tienen actividad de fosfatasa relacionada con la regulación del ciclo celular (Jin *et al.*, 2008). Además, el dominio de unión del ADN de p53, 53BP1, es clave para que la proteína p53 participe en el mantenimiento de

la integridad genómica. Se ha demostrado que 53BP1 se colocaliza rápidamente con  $\gamma$ -H2A.X y está fuertemente regulado por ATM (Rappold *et al.*, 2001).

Se ha reportado que las  $PM_{10}$  inducen un aumento en los niveles de proteína de ATM fosforilada en serina 1981, lo que se asocia con focos  $\gamma$ -H2A.X y un aumento en los niveles de proteína 53BP1, lo que se asoció con el estrés oxidante, debido a que estos cambios fueron prevenidos en presencia de un antioxidante (Trolox). Adicionalmente, se ha reportado un incremento en p53 y en la fosforilación de Chk2 y de p53 (Gualtieri *et al.*, 2011; Sanchez-Perez *et al.*, 2009). Bajo condiciones celulares normales, estos cambios deben inducir la detención del ciclo celular para que se lleve a cabo la revisión y posterior reparación del ADN dañado, o si el daño no se puede reparar, que la célula inicie el proceso de muerte celular, cada uno de estos eventos están mediados por diferentes vías sin embargo, se ha reportado que en las células expuestas a  $PM_{10}$  no activan estos procesos celulares (Santibañez-Andrade *et al.*, 2021; García-Cuellar *et al.*, 2020; Sanchez-Perez *et al.*, 2009; Quezada-Maldonado *et al.*, 2022) (figura 2)



**Figura 2. Alteraciones a nivel de ADN inducidas por  $PM_{10}$ .** Entre los efectos destaca Estrés Oxidativo, Formación de Aductos y DSB. La inducción de daño al ADN activa vías relacionadas con la detención del ciclo celular, reparación de ADN o Apoptosis, sin embargo estos efectos no han sido observados (figura modificada de Christmant *et al.*, 2003).

Uno de los daños más severos al ADN es la formación de rupturas de doble cadena (DSB), éstas surgen por múltiples causas ya sea por agentes exógenos como las partículas, radiación UV o por agentes endógenos tales como la replicación del ADN (Lieber *et al.*, 2003).

La formación de DSB inducida por PM<sub>10</sub> se ha asociado principalmente a la presencia de ROS o la formación de aductos voluminosos en el ADN. Las ROS tienen una alta afinidad con el ADN, y se unen a las bases nitrogenadas sufriendo un ataque electrofílico por las ROS, lo que generara cortes en el ADN, posteriormente cuando un segundo radical libre reacciona con la hebra antiparalela del ADN se induce la formación de DSB (Zorrilla-García *et al.*, 2004).

Los aductos en el ADN también están relacionados con la formación de DSB, debido al enlace covalente de moléculas como los HAPs o aminas aromáticas (presentes en las PM) con el ADN. Este tipo de aductos tiene la capacidad de distorsionar las hebras de ADN al interactuar con los enlaces fosfodiéster de la cadena, lo que conduce a la pérdida del citoesqueleto y posteriormente la formación de DSB (Klauning & Kamendulis, 2010). Si las DSB no son reparadas adecuadamente podrían conducir a la muerte celular o a la inestabilidad genómica, resultado de la pérdida de cromosomas o translocaciones, incrementando la posibilidad de mutaciones (Chávez & Gómez *et al.*, 2010).

Existen dos vías para la reparación de DSB: la vía de Recombinación Homóloga (HR) y la vía de Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ); la primera es una vía más precisa y con menor probabilidad de errores debido a que utiliza la cromátida hermana como molde (solo en la fase de síntesis) para la reparación del daño, asegurando que se restaure la secuencia de ADN, sin embargo solo se utiliza cuando los cromosomas de la célula se encuentran alineados y cerca uno del otro (Christmann *et al.*, 2003; Lagunas-Rangel, 2018) . Por otro lado, la vía NHEJ repara el ADN de forma menos precisa, sin embargo, lo realiza en menor tiempo y durante todo el ciclo celular, lo que confiere una ventaja para la sobrevivencia de la célula y la continuación de su ciclo celular, de hecho, más del 90% de las DSB son reparadas por esta vía (Mao *et al.*, 2008; Lieber *et al.*, 2008; Quezada-Maldonado *et al.*, 2021)

La vía de NHEJ funciona en tres fases bien definidas, las cuales se describen en los párrafos siguientes:

#### *Fase de reconocimiento del daño.*

Esta fase inicia con la unión del complejo KU70/KU80 a los extremos rotos de la cadena. Este complejo con forma de anillo sirve como andamiaje para la unión del resto de las proteínas de la vía. El heterodímero KU70/KU80 muestra afinidad independiente de la secuencia de los extremos bicatenarios y al unirse al ADN recluta y activa a la proteína ADN-PKcs; además, el complejo KU es capaz de interactuar con la nucleasa (ADN-PKcs-Artemis), las polimerasas (Pol  $\mu$  y Pol  $\lambda$ ) y la ligasa (XRCC4-Lig4) (D'Andrea, 2015; Lieber *et al.*, 2008). La unión del complejo ocurre a los pocos segundos de producirse el DSB. Posteriormente el complejo KU70/KU80 se desliza al interior de la hebra permitiendo la unión ADN-PKcs con la cadena de ADN y haciendo un "puente molecular" entre las dos cadenas rotas. ADN-PKcs es una quinasa serina/treonina que estabiliza los extremos rotos, se autofosforila en residuos de serina y se encarga de la fosforilación de H2A.X en serina 139 ( $\gamma$ H2AX) (Mukherjee *et al.*, 2006; DeFazio *et al.*, 2002) (Figura 3).

### *Fase de procesamiento*

Una vez producido el daño los extremos deben de ser transformados en extremos religables, para esto, Artemis se recluta al sitio del daño e interactúa con ADN-PKcs asegurando que los extremos queden alineados mediante su actividad como exonucleasa 5'-3', independiente de ADN-PKcs y actividad endonucleasa dependiente de ADN-PKcs (Ávila, 2016; Ma *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2005). Una vez procesados los extremos pueden generarse huecos que tienen que ser rellenados por la ADN polimerasa, específicamente polimerasa mu y lambda (Pol  $\mu$  y Pol  $\lambda$ ) (Ramsdem, 2011; Zhao *et al.*, 2020).

### *Fase de Finalización*

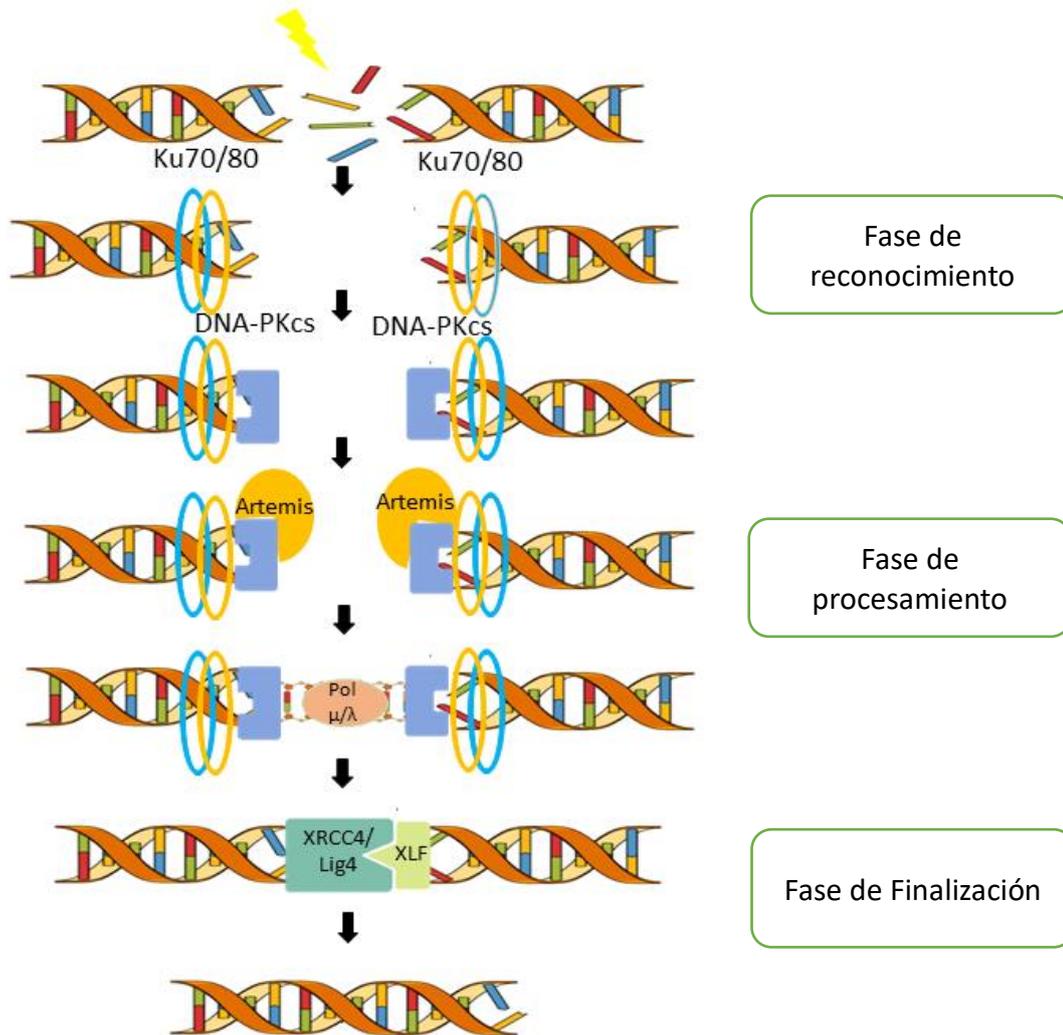
Por último, en la fase de finalización, el complejo XRCC4/ligasa IV/XLF se encarga de unir los extremos. XRCC4 estabiliza la actividad de LigIV al servir como andamiaje e interactuar con el complejo KU (Rossner *et al.*, 2011; Lieber, 2008). XLF destaca por estimular la actividad de NHEJ, probablemente al regular la actividad de LigIV (Yang y Wang, 2017).

Es importante destacar que en la vía de reparación NHEJ se llevan a cabo tres procesos claves: 1) Actividad de nucleasa para la eliminación del ADN dañado mediante ADN-PKcs y Artemis. 2) La actividad de polimerasas, para la síntesis de nuevos nucleótidos donde participa Pol  $\mu$  y Pol  $\lambda$ . 3), y la actividad ligasa mediante XRCC4, LigIV y XLF.

Pocos estudios se han encargado de evaluar los componentes de la vía de reparación NHEJ durante la exposición a PM<sub>10</sub>. Estudios epidemiológicos señalan que mujeres expuestas a PM provenientes de quema de biomasa, presentaron un aumento en los niveles de proteínas involucradas en el reconocimiento del daño (específicamente KU70), y por lo tanto en la vía NHEJ. Por otro lado, en linfocitos de sangre periférica se ha demostrado que las PM<sub>2.5</sub> aumentan los niveles de expresión de *Ku70* y *XRCC4*, (los genes se referencian en letra cursiva) pero disminuyen los niveles de *Ku80* lo que sugiere una reducción en la capacidad de reparación de la vía NHEJ (Mondal *et al.*, 2010; Rossner *et al.*, 2011).

En estudios *in vitro* realizados con fibroblastos de pulmón embrionario, se reportó que las PM<sub>2.5</sub> podría reducir la capacidad de reparación de la vía, esto como consecuencia de la desregulación de las proteínas encargadas de reconocer el daño al ADN asociado al complejo KU70/KU80 (las proteínas se referencian en letra mayúscula) (Rossner *et al.*, 2014). En modelos animales la exposición a BaP, que es uno de los principales componentes de las PM, disminuye la expresión de *Ku80* y *ADN-PKcs* lo que resulta en una reparación aberrante de ADN debido al el mecanismo de toxicidad (Tung *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las PM inducen daño a ADN, que provocan alteración en la vía de reparación de NHEJ, sin embargo aún falta por dilucidar completamente si las PM<sub>10</sub> alteran la vía de reparación NHEJ y cuáles serían los posibles mecanismos por los cuales se llevaría a cabo tal proceso.



**Figura 3. Esquema de la vía NHEJ.** El mecanismo de reparación NHEJ actúa en tres fases: Fase de reconocimiento, Fase de Procesamiento y Fase de Ligación; en estas participan distintas proteínas como KU70, KU80, ADN-PKcs, Artemis, Pol μ y Pol λ, XRCC4, Lig4 y XLF (Modificado de Ávila, 2016).

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las PM10 alteran la expresión y los niveles de proteína de los componentes de la vía NHEJ y cuál es su mecanismo?

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar el impacto de las PM<sub>10</sub> en la expresión y en los niveles de proteína de los componentes de la vía NHEJ en células de pulmón A549.

### **Objetivos específicos**

- Determinar los niveles de expresión y de proteína de KU70 en células A549 expuestas a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 6, 12 y 24 h.
- Determinar los niveles de expresión y de proteína de KU80 en células A549 expuestas a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 6, 12 y 24 h.
- Determinar los niveles de expresión y de proteína de Artemis en células A549 expuestas a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 6, 12 y 24 h.
- Determinar los niveles de expresión y de proteína de XRCC4 en células A549 expuestas a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 6, 12 y 24 h.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Recolecta de $\text{PM}_{10}$**

Las  $\text{PM}_{10}$  se colectaron en una zona urbano-residencial de la Ciudad de México (Ciudad Universitaria). Para el muestreo de estas partículas se utilizaron colectores de partículas de grandes volúmenes (GMW modelo 1200 VFC HVPM<sub>10</sub>; Sierra Andersen, Smyrna GA, USA), empleando filtros de nitrato de celulosa con poro de 3  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Goettingen, Germany). El muestreo se realizó por períodos de 24 h (1.13  $\text{m}^3/\text{min}$ ), tres días por semana. Los filtros se guardaron a 4°C en un desecador antes de remover las partículas. Las PM se recolectaron raspando la membrana de nitrocelulosa y se colocaron en frascos de vidrio libres de endotoxina, se guardaron a 4°C en un desecador y se protegieron de la luz, hasta su uso. Entre los componentes inorgánicos de las  $\text{PM}_{10}$  utilizadas destacan metales de transición como Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, P, Pb, S, Si, Ti, y Zn (Monroy-Bordon, 2020).

### **Cultivo celular y exposición a $\text{PM}_{10}$**

Para este proyecto se utilizó la línea celular A549, cuyo origen corresponde a células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón, de acuerdo con la ATCC (American Type Culture Collection). Cabe destacar que este es un modelo ampliamente utilizado en el desarrollo de proyectos enfocados en evaluaciones toxicológicas, en especial se ha utilizado como modelo para determinar los efectos de algunos contaminantes del aire (Mattsson *et al.*, 2009; Chirino *et al.*, 2010; Danielsen *et al.*, 2011). Las células se cultivaron en medio F12-K (Gibco, 21127022) suplementado con suero bovino fetal (10%) (Gibco, 16000044) en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y a 37°C. Se realizó la siembra de células en placas de 6 y 12 pozos (para proteína y ARN respectivamente) y después de alcanzar una confluencia del 70% (24h), las células fueron expuestas a  $\text{PM}_{10}$  a una concentración final en relación dosis/área de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , la cual corresponde a una concentración subletal que no afecta la viabilidad celular (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009) y que simula 5 días de exposición a PM en ambiente (Li *et al.*, 2003). Como control positivo de generación de DSB, las células fueron expuestas a Doxorrubicina a una concentración de 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich, D1515). Los cultivos se evaluaron a las 6, 12 y 24 h de exposición a las

PM<sub>10</sub>, comparando los resultados con células control (células con medio F12-K suplementado con 10% FBS).

### **Análisis de los niveles de expresión génica**

#### Extracción de ARN:

Posterior a los tiempos de exposición se extrajo el ARN. Para ello se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con 1ml de PBS (Phosphate Buffered Saline), se añadió 1ml reactivo TRIzol (Invitrogen, 15596026) y se raspó el pozo con una punta de una pipeta, la suspensión fue transferida a un tubo de 1.5 ml e incubado durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de Cloroformo (Sigma, C2432) a cada tubo y se agitaron durante 15 segundos para luego ser incubados a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm a 4 °C por 15 minutos para hacer la separación por fases. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se transfirió a un tubo nuevo. Luego a cada tubo se le añadió 500 µl de isopropanol (Sigma, I9516) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para ser centrifugados a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, se lavó el botón con 1 ml de Etanol al 70% (Millipore 64175) y se resuspendió el botón para posteriormente ser centrifugados a 7,000 rpm a 4 °C. Por último, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 40 µl de agua libre de ARNsas, las muestras se calentaron a 60 °C por 10 minutos, se hicieron alícuotas del ARN extraído y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. La concentración y pureza de ARN fue evaluada en un espectrofotómetro Nanodrop-100 (ThermoFisher Scientific, Nanodrop Technologies) tomando 1 µl de cada muestra.

#### Síntesis de cADN;

La síntesis de cADN se realizó mediante el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific). Para esto se descongelaron los componentes 10X RT Buffer, 25X dNTP Mix (100mM) y 10X RT Random Primers, se mezclaron, se centrifugaron rápidamente y se colocaron en una gradilla refrigerada a -20 °C. Se tomaron 300 µl de ARN de cada muestra llevándola a un volumen final de 10 µl con agua libre de ARNsas manteniéndola en una gradilla refrigerada a -20 °C.

Se preparó la RT Master Mix de la siguiente manera: 3.2 µl de Agua libre de ARNsas, 2.0 µl de 10X RT Buffer, 0.8 µl 25X dNTP Mix (100mM), 2.0 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de Inhibidor de ARNsas y 1.0 µl de MultiScribe Reverse, para un volumen final de 10.0 µl. Posteriormente los 10 µl de Mix fueron añadidos a los 10 µl de ARN se mezclaron en vortex y se centrifugaron rápidamente. Los tubos se colocaron en un termociclador de acuerdo con el siguiente programa: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C.

#### qRT-PCR

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron mediante el kit Real Q Plus 2x Master Mix (Amplicon, A325406). Para esto cada reacción se realizó con los componentes siguientes: 10 µl de Real Plus Q 2x Master Mix, 0.4 µl de Primer Forward, 0.4 µl de

Primer Reverse, 7.2 µl de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 18 µl (cada ensayo se realizó por triplicado).

Se tomó el volumen necesario de cada componente para hacer los ensayos por triplicado y añadir 6 µl de cADN (5 ng/µl) para un volumen final de 60 µl. Los tubos se mezclaron en vortex y se centrifugaron rápidamente a 6000 rpm durante 5 s. Posteriormente se colocaron 20 µl de cada muestra en una placa de 96 pozos. La placa se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar burbujas.

La reacción se llevó a cabo en el sistema PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific), mediante el siguiente programa: desnaturalización (95 °C por 10s), amplificación (35 ciclos con una etapa de 95 °C durante 15 s, segunda etapa de 60 °C durante 60 s) y disociación (95°C por 15 s, otra de 60°C por 60s y una última de 95°C por 15 s). Los cambios de expresión se analizaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando GAPDH como control interno. La secuencia de oligos utilizados para el análisis se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Primers para genes de la vía de reparación NHEJ**

Gen	Proteína codificada	Primer Forward	Primer Reverse
<i>XRCC6</i>	KU70	CCACAGGAAGAAGAGTTGGA	CTGCTCTGGAGTTGCCATGA
<i>XRCC5</i>	KU80	CGACAGGTGTTTGCTGAGAA	TCACATCCATGCTCACGATT
<i>DCRE1C</i>	Artemis	CCGCTTCGATAGGGAGAACC	TCAAGCTGCACTCCAACCTT
<i>XRCC4</i>	XRCC41	GGCCTGATTCTTCACTACCTGA	TAGCGGCTGCTGACTTGAAA
<i>GAPDH</i>	GAPDH	GCAAATTCCATGGCACCGTC	AGCATCGCCCCACTTGATTT

### **Extracción y Cuantificación de proteínas**

Posterior a los tiempos de exposición las células se lavaron con 1.0 ml de PBS y se realizó la lisis celular con 120 µl de buffer RIPA (20 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1% NP-40) mezclado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Inhibitor Halt Proteasa & Phosphatasas, 78441) y se mantuvieron en agitación constante durante 10 minutos y en hielo. Posteriormente, cada pozo fue raspado con un raspador de células y el lisado se colocó en tubos de 1.5 ml para su centrifugación a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteína fue determinada mediante el método de Ácido Bicinconínico (Sigma). Para esto se prepararon las muestras tomando 1.0 µl de proteína y adicionando 9.0 µl de Tris 10mM pH 7.4, la cuantificación se realizó por triplicado. En una placa de 96 pozos se cargó por triplicado la curva de albumina de suero fetal bovino (BSA), de 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 µg/µl, posteriormente se cargaron los 10.0 µl de muestra de proteína. En cada pozo se agregaron 200 µl de reactivo de trabajo (BCA + CuSO<sub>2</sub>, en una relación 100:2). La placa se calentó a 90 °C durante 10 minutos. Finalmente, la concentración de proteína se cuantificó en un lector de placas Tecan Infinite M200 PRO.

### **Análisis Western Blot**

La determinación de los niveles de proteínas se realizó mediante Western Blot, para esto se utilizaron 20.0 µg de proteína de cada tratamiento; la electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, para KU70 y XRCC4 se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (tamaño de poro: 0.45 µm) (PVDF) (Immobilon-P, Milipore) y para KU80 y Artemis se transfirió a membrana de nitrocelulosa (0.2 µm) (BioRad, 1620112); usando un sistema de transferencia semiseco (Trans-Blot-Turbo, transfer system (Bio Rad, 1704155)). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de albumina de suero bovino en TBS (Tris-Buffered Saline)-Tween 0.1% en agitación constante durante una hora, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario 1:1000 (anti-KU70, Cell Signaling, 4104 y anti- XRCC4, Invitrogen, PA5-82264), anticuerpo primario 1:500 (anti-KU80, Invitrogen, MA5-12933 y anti-Artemis, Invitrogen, PA5-102814) y anticuerpo primario 1:3000 (anti-GAPDH, Cell Signaling, 32233), durante toda la noche a 4°C; como proteína de control de carga se utilizó GAPDH. Al día siguiente se lavaron en agitación las membranas con TBS-Tween al 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-Rabbit 1:3000 (Ku70, XRCC4 y Artemis) y anti-mouse 1:3000 (Ku80 y GAPDH) ligados a HRP. Para finalizar el procedimiento, las membranas se incubaron con sustrato de peroxidasa quimioluminiscente (Milipore, WBKLS0100). Las proteínas se revelaron utilizando un lector de luminiscencia UVP ChemiDoc-It<sup>53</sup> Imager y para determinar los cambios inducidos por las PM, se realizó un análisis de densitometría mediante el Software ImageJ bundled with 64-bit Java 8.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA (Dunnett's multiple comparisons test). Se consideró como diferencia estadísticamente significativa aquellas con un  $p < 0.05$  en cada tratamiento comparado contra las células control.

## **RESULTADOS**

*Las PM<sub>10</sub> modifican la expresión de los componentes de la vía NHEJ en células A549*

### *XRCC6 (Ku70)*

Las PM<sub>10</sub> y la doxorubicina, comparadas con el grupo control, no generaron cambios en la expresión de *Ku70* a las seis horas (0.94 y 0.98 vs 1.00, respectivamente) (figura 4A). A las 12 horas, las PM<sub>10</sub> aumentaron la expresión de *Ku70* (1.16 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) y el tratamiento con doxorubicina no generó cambios significativos (0.94 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). A las 24 h, las PM<sub>10</sub> no cambiaron la expresión de *Ku70* (0.97 vs 1.00;  $p < 0.05$ ), mientras que se observó una disminución de su expresión en células tratadas con doxorubicina (0.64 vs 1.00;  $p < 0.05$ ).

### *XRCC5 (Ku80)*

Las PM<sub>10</sub> disminuyeron la expresión de *Ku80* a las seis horas, comparado con el grupo control (0.85 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) y la doxorubicina también disminuyó la expresión de este gen (0.81 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) (figura 4B). Las PM<sub>10</sub> no indujeron cambios significativos en la expresión de *Ku80* a las 12 y 24 (0.82 y 1.02 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente), mientras que la doxorubicina, a las 12 y 24 horas disminuyó la expresión de *Ku80* comparado con el grupo control (0.68 y 0.43 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente).

### *DCRE1C (Artemis)*

No se observaron diferencias en la expresión de *Artemis* en células expuestas a PM<sub>10</sub> durante seis y 12 horas, con respecto a su grupo control (1.07 y 0.93 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente) (figura 4C). Por otro lado, la exposición a doxorubicina durante seis y 12 horas disminuyó la expresión de *Artemis* (0.82 y 0.75 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente). A las 24 h las PM<sub>10</sub> presentaron diferencias estadísticas con respecto al grupo control, tampoco se observaron cambios con doxorubicina (1.08 y 0.85 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente).

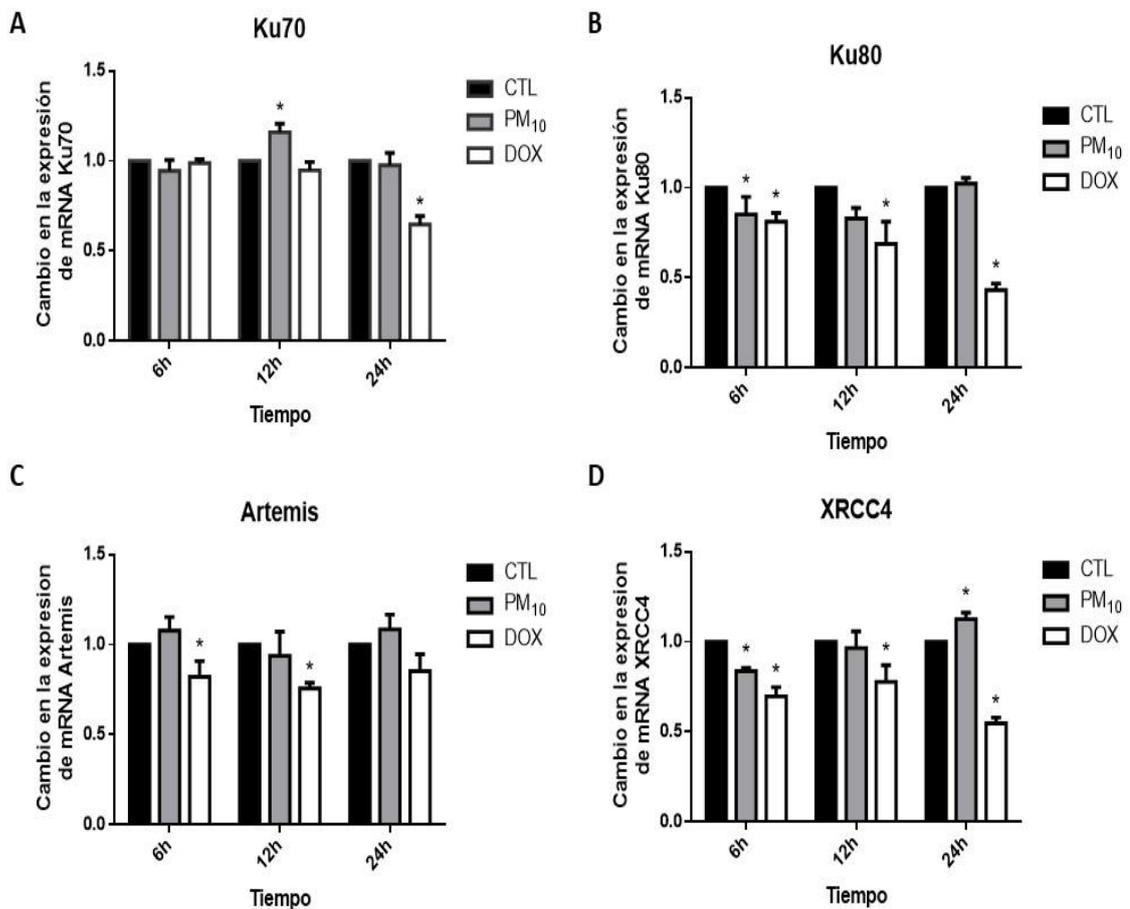
### *XRCC4 (XRCC4)*

Las PM<sub>10</sub> indujeron disminución significativa a las 6 h en la expresión de *XRCC4* comparado con el grupo control (0.83 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). La doxorubicina también disminuyó la expresión de este gen (0.69 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) (figura 4D). A las 12 h, las PM<sub>10</sub> no indujeron cambios en la expresión de *XRCC4* (0.96 vs 1.00;  $p < 0.05$ ); mientras que la doxorubicina disminuyó su expresión respecto al grupo control (0.77 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). Se observó un aumento en la expresión de *XRCC4*, en células expuestas a PM<sub>10</sub> durante 24 horas (1.12 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) y una disminución de la expresión de *XRCC4* en células expuestas a doxorubicina con respecto al grupo control (0.54 vs 1.00;  $p < 0.05$ ).

### *Las PM<sub>10</sub> modifican los niveles de las proteínas de la vía NHEJ en células A549*

#### KU70

Las PM<sub>10</sub> no alteraron los niveles de proteína de KU70 a las seis horas (1.01 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) (Figura 5A). La doxorubicina aumentó los niveles de la proteína KU70 comparado con el grupo control (1.14 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en los niveles de proteína KU70 en células expuestas a PM<sub>10</sub> y doxorubicina a las 12 horas (0.97 y 0.91 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente) y 24 horas (1.00 y 0.92 vs 1.00,  $p < 0.05$ , respectivamente).



**Figura 4.** Las PM<sub>10</sub> alteran la expresión de los componentes de la vía NHEJ. Se midió la expresión de *Ku70* (A), *Ku80* (B), *Artemis* (C) y *XRCC4* (D) en células A549 expuestas a PM<sub>10</sub> (10 µg/cm<sup>2</sup>) y Doxorubicina (0.25 µg/ml) durante seis, 12 y 24 horas. Los resultados cuantitativos se expresaron después de ser normalizados con GAPDH como control interno. El cambio de expresión se determinó por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ; (\* $p \leq 0.05$ ) indica diferencias estadísticamente significativas del tratamiento con respecto al grupo control.

#### KU80

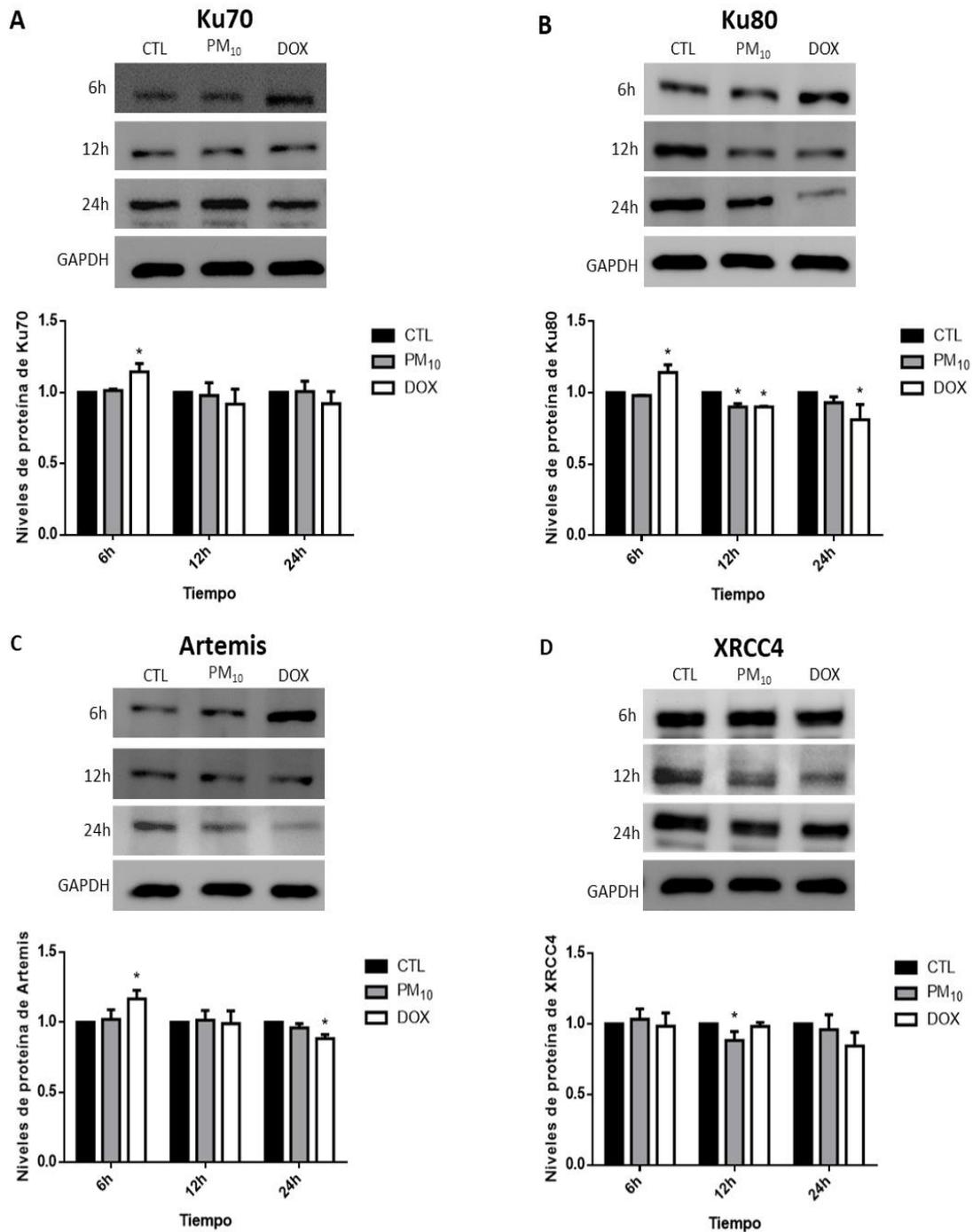
Las PM<sub>10</sub> no modificaron los niveles de proteína de KU80 (0.98 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) a las 6 h y la doxorubicina aumentó los niveles de proteína de KU80 comparado con el grupo control (1.14 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) (figura 5B). A las 12 h, las PM<sub>10</sub> disminuyeron los niveles de proteína KU80 comparado con su grupo control (0.90 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). La doxorubicina también disminuyó los niveles de KU80 (0.90 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). Las PM<sub>10</sub> no generaron diferencias en los niveles de proteína de KU80 (0.93 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) por 24 h. La exposición a doxorubicina disminuyó los niveles de proteína KU80 comparado con el grupo control (0.81 vs 1.00;  $p < 0.05$ ).

## Artemis

Las PM<sub>10</sub> no indujeron cambios en los niveles de la proteína Artemis a las 6 h (1.02 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) (Figura 5C) y la exposición a doxorubicina aumentó los niveles de la proteína Artemis (1.16 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en los niveles de proteína Artemis después de la exposición a PM<sub>10</sub> y doxorubicina durante 12 h comparado con el grupo control (1.01 y 0.99 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente). Las PM<sub>10</sub> no cambiaron los niveles de la proteína Artemis a las 24 h (0.96 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) y la exposición a doxorubicina disminuyó los niveles de esta proteína (0.88 vs 1.00;  $p < 0.05$ ).

## XRCC4

No se observaron diferencias en los niveles de la proteína XRCC4 en células expuesta a PM<sub>10</sub> o doxorubicina a las seis horas (1.03 y 0.98;  $p < 0.05$ , respectivamente) (Figura 5D). Las PM<sub>10</sub> disminuyeron los niveles de proteína XRCC4 (0.88 vs 1.00;  $p < 0.05$ ) a las 12 h, mientras que la doxorubicina no generó cambios con respecto a su grupo control (0.98 vs 1.00;  $p < 0.05$ ). A las 24 h no se observaron cambios en los niveles de proteína de XRCC4 ni en células expuestas a PM<sub>10</sub> o a doxorubicina (0.95 y 0.84 vs 1.00;  $p < 0.05$ , respectivamente).



**Figura 5.** Las PM<sub>10</sub> desregulan los niveles de proteínas de la vía NHEJ. Se analizaron los niveles de las proteínas KU70 (A), KU80 (B), Artemis (C) y XRCC4 (D). Las células A549 fueron expuestas a PM<sub>10</sub> (10µg/cm<sup>2</sup>) y a Doxorubicina (0.25 µg/ml) durante 6, 12 y 24 h. Los resultados cuantitativos obtenidos a través del análisis densitométrico se expresaron después de normalizar con GAPDH. (\**p* ≤ 0.05) indica diferencias estadísticamente significativas del tratamiento con respecto al grupo control.

## DISCUSIÓN

La exposición prolongada a PM<sub>10</sub> se relaciona con el aumento en la incidencia y el riesgo de muerte por neoplasias como el cáncer de pulmón; debido a que tienen la capacidad de ingresar en las vías respiratorias provocando efectos adversos a la salud (Xu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2021; Hamra *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de las PM<sub>10</sub> sobre uno de los principales mecanismos de reparación de daño de doble cadena del ADN, con el fin de continuar con la descripción de los mecanismos toxicológicos que podrían estar asociados a la carcinogenicidad de este contaminante.

Para la realización del presente trabajo de investigación se utilizaron células de pulmón A549, las cuales son un modelo toxicológico ampliamente utilizado para determinar los efectos de la contaminación del aire (Mattsson *et al.*, 2009; Chirino *et al.*, 2010; Danielsen *et al.*, 2011). Estas células se expusieron a una concentración de 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> que está considerada como una concentración subletal, que no afecta la viabilidad celular, pero que ocasiona diversos daños a nivel celular y molecular entre los cuales destaca su capacidad de inducir daño en el ADN (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009). Además, dicha concentración equivale a cinco días de exposición a este contaminante, en humanos (Li *et al.*, 2003), por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían ayudar a inferir el impacto de las PM<sub>10</sub> en exposiciones ambientales.

Entre los tipos de daño al ADN, las rupturas de doble cadena es uno de los principales (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009; Danielsen *et al.*, 2009; Bocchi *et al.*, 2019; Niu *et al.*, 2020) y se sabe que más del 90% de estas lesiones son reparadas por medio de la vía de reparación de Unión de Extremos no Homólogos (Quezada-Maldonado *et al.*, 2021).

En diferentes modelos celulares se ha evaluado el funcionamiento de la vía NHEJ a partir de tiempos tempranos de exposición, por ejemplo, en células DT40 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, capaz de generar ROS, se observó que las DSB se reparaban desde la primera hora de exposición (Sharma *et al.*, 2016). Por otro lado, en fibroblastos pulmonares neonatales de humanos (CCD-34Lu) expuestos a radiación ionizante, la mayoría de las DSB (~60%) fueron reparadas durante las primeras horas de exposición (0.5-6h), mientras que a las 24 horas de exposición, el número de focos γ-H2A.X se redujo significativamente (Bee *et al.*, 2013). En estudios *in vivo* se observó que en ratones expuestos a BaP, el daño en doble cadena se detectó desde las cuatro horas de exposición en conjunto con las proteínas que comienzan a actuar en la vía (Tung *et al.*, 2014). Es por esto último, el interés de evaluar tanto la expresión y niveles de proteína de la vía NHEJ desde las seis hasta las 24 horas de exposición, en el que la mayoría de los daños deberían ser procesados y reparados.

Al evaluar la expresión de los genes involucrados en esta vía, se encontró que, si bien las PM<sub>10</sub> inducen el aumento de la expresión de *Ku70* que es uno de los componentes involucrados en el reconocimiento de este tipo de daño, no se generan cambios en su proteína, por lo que probablemente no se esté efectuando el reconocimiento adecuado del daño en el ADN. Adicionalmente, en esta etapa de

reconocimiento se observó, que tanto la expresión como los niveles de la proteína de KU80, otro de los componentes de reconocimiento, se encuentran disminuidos, lo cual podría llevar a una inadecuada formación del heterodímero con KU70 y en consecuencia, el daño podría no ser reconocido adecuadamente. Rossner *et al.*, (2014) reportaron que después de la exposición a PM<sub>2.5</sub>, los niveles de  $\gamma$ -H2A.X aumentan, sin embargo, se da una ligera inducción en los niveles de proteína de KU70 y KU80 atribuyendo dichos efectos a la habilidad de BaP y la materia orgánica extraída para generar DSB y favorecer la presencia de translocaciones cromosómicas.

En el caso de la doxorrubicina, utilizada como control positivo de daño, en el presente estudio, se observó que los niveles de proteína, tanto de KU70 como de KU80, aumentaron lo cual puede indicar que se están reconociendo las DSB. Resultados similares fueron reportados por Schonn *et al.* (2011) quien en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT29, en tiempos tempranos de exposición, observaron un aumento en los niveles de proteína de KU70 y KU80 mientras que en tiempos prolongados, los niveles de proteína disminuyeron (Schonn *et al.*, 2011).

En modelos animales expuestos a BaP se observó la formación de DSB, pero una disminución en la expresión de *Ku70* y una tendencia a la disminución de *Ku80* (Tung *et al.*, 2014), este trabajo sugiere que los HAPs presentes en las PM<sub>10</sub>, podrían estar modificando la expresión de estos componentes. Por otra parte, las PM<sub>10</sub> utilizadas en el presente trabajo contienen distintos metales que son capaces de inducir estrés oxidante al generar OH<sup>\*</sup> a través de reacciones de Fenton (Monroy-Bordon, 2020; Chirino *et al.*, 2010) lo que podría estar alterando los niveles de las proteínas de reconocimiento, específicamente de KU80, porque se ha demostrado que las ROS producidas por diversos metales, disminuyen los niveles de KU70/KU80, así como su capacidad de unión al ADN (Park *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2022). Adicionalmente, se ha reportado que las ROS aumentan la degradación de KU80 vía proteosoma, lo cual se identifica a través del aumento de KU80 ubiquitinado (Park *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2022), por lo que es necesario estudiar a KU80 ubiquitinado asociado a la exposición a PM<sub>10</sub> ya que probablemente esto determinaría si la disminución de la proteína en células expuestas a PM<sub>10</sub> se asocia con la ubiquitinación de KU80 y su degradación vía proteosoma. Por lo tanto, los metales además de estar relacionados directamente a la generación del daño al ADN (Kanaapen *et al.*, 2002; Borgie *et al.*, 2015), también estarían alterando las proteínas de reparación involucradas en la eliminación de este tipo de daño.

En contraste, existe un estudio epidemiológico en el que se reportó que aumentaban los niveles de KU70 en mujeres que cocinaban con combustibles de biomasa vegetal (Leña, Carbón), con respecto a aquellas que cocinaban con estufas de gas convencional, indicando el probable reconocimiento del daño y la posterior activación de la vía de NHEJ (Mondal *et al.*, 2010).

Por otro lado, un análisis realizado en linfocitos de sangre periférica, se reportó un incremento en la expresión de *Ku80*, en individuos expuestos a PM<sub>2.5</sub> (Rossner *et al.*, 2011). Con base en estos trabajos, se puede decir que la biomasa de leña esta

enriquecida con hidrocarburos, sin embargo, las PM<sub>10</sub> utilizadas en este trabajo, son de origen antropogénico y además de los HAP, contiene metales y compuestos de origen animal, lo que sugiere que las PM inducen sinergismos y antagonismo, por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio, podrían ser distintos a los reportados por Mondal *et al.* (2010) Y Rossner *et al.* (2011), debido a la composición de las partículas utilizadas, además de las fuentes de emisión y los tiempos de exposición. En este sentido y comparando los resultados con el control positivo de daño, la doxorubicina, al ser un solo componente induce el daño y puede ser reparado adecuadamente mediante el funcionamiento de la vía NHEJ. Por el contrario, las PM al contener una mezcla compleja de componentes, algunos de estos podrían estar induciendo el daño y a su vez otros compuestos generan alteraciones en las proteínas de reparación.

Los componentes involucrados en el reconocimiento del daño son esenciales no solo para la vía de reparación NHEJ, ya que existen reportes que sugieren que la disminución en la expresión de *Ku70* aumenta la expresión del gen *p53* lo que se traduce en un aumento en la apoptosis celular dependiente de *p53* (Lamaa *et al.*, 2016). Además, la inactivación de *KU80* da como resultado células poliploides que están extremadamente comprometidas en proliferación celular y que en última instancia sufren apoptosis debido a la acumulación de daño en el ADN (Li *et al.*, 2002), lo cual hace evidente la estrecha relación de dichos componentes de la vía durante la reparación y la supervivencia celular.

Se ha demostrado que la proteína Sirtuina modifica la capacidad de reparación de ADN al unirse a *KU70* modulando la reparación a través de su acetilación (Jeong *et al.*, 2007), por lo que sería importante analizar el complejo SIRT-*KU70* durante la exposición a PM<sub>10</sub> para evaluar si la expresión de SIRT está desregulando los niveles de *KU70* mediante su acetilación-desacetilación lo que podría influir en el reconocimiento de daño (DSB). Por otra parte, las alteraciones observadas en la vía NHEJ también podrían ser generadas mediante la participación de ARNs largos no codificantes.

Específicamente un ARN largo no codificante llamado LRIK, el cual juega un papel importante en la vía de reparación NHEJ, porque interactúa con el heterodímero *KU70/80* durante el proceso de reparación y promueve su unión con los sitios DSB, facilitando el ensamblaje de los componentes río abajo de la vía (Wang *et al.*, 2020). Adicionalmente, se han identificado microARNs que también actúan en esta vía, específicamente el miARN-145 que modula la expresión de ADN-PKcs desestabilizando el mARN y con ello disminuyen los niveles de la proteína (Sudhanva *et al.*, 2022). Trabajos previos han demostrado que las PM<sub>10</sub> desregulan a este tipo de ARNs no codificantes (Quezada-Maldonado *et al.*, 2018; Santibáñez-Andrade *et al.*, 2021) por lo que sería interesante estudiarlos en relación con su participación en la reparación de daños en doble cadena.

Al evaluar la expresión y niveles de la proteína de Artemis, componente de procesamiento del ADN dañado, las PM<sub>10</sub> no indujeron cambios significativos en la expresión y niveles de esta proteína, lo que podría asociarse con la inhibición del reconocimiento de DSB como consecuencia de la disminución en los niveles de la proteína de *KU80*; de tal manera que, si no hay un adecuado reconocimiento del

daño en el ADN, la expresión y los niveles de proteínas río abajo de la vía no se estarían activando, por el contrario, se observó que durante la exposición a la doxorubicina, los niveles de proteína Artemis aumentaron significativamente, lo que indica que los extremos estarían siendo reconocidos y subsecuentemente procesados por dicha proteína. Artemis se ha identificado como una proteína supresora de tumores pues la deficiencia de esta proteína puede estar relacionada con procesos carcinogénicos (Morio & Kim, 2003), por lo que este resultado es muy importante y es necesario profundizar al respecto.

Las PM<sub>10</sub> disminuyeron la expresión y los niveles de proteína de XRCC4, el cual es un componente involucrado en la fase de finalización de la reparación del ADN, por lo que la disminución de XRCC4 sugiere que podría estar dándose una ligación inadecuada de los extremos rotos al disminuir la eficiencia de ligasa IV. Resultados similares fueron reportados por Li *et al.* (2015) quienes en células Hela incubadas con cadmio, un metal presente en las PM<sub>10</sub> y carcinógeno para los humanos (DOF, 2014; IARC 2016) y posteriormente irradiadas con rayos-X, encontraron una disminución en la fosforilación de ADN-PKcs, seguido de la disminución en los niveles de XRCC4 y Lig IV (Li *et al.*, 2015), por lo cual, los metales de transición presentes en las PM<sub>10</sub> además de provocar DSB estarían alterando a este componentes de la vía de reparación NHEJ. Los resultados anteriores podrían deberse al estrés oxidativo que experimentan las células expuestas a las PM<sub>10</sub>, pues está demostrado que este es capaz de disminuir los niveles de XRCC4 y aumentar los niveles de  $\gamma$ -H2AX y 8-OHdG (Bane *et al.*, 2022).

Se ha demostrado que en individuos expuestos a PM<sub>2.5</sub> se presenta un aumento en los niveles de proteína de XRCC4 en linfocitos de sangre periférica (Rossner *et al.*, 2014); dichos resultados difieren a lo reportado en este trabajo y podría estar relacionado con la fracción de PM utilizada y los tiempos de exposición (aguda y crónica) de cada trabajo. Dado que KU80 y XRCC4 presentan el mismo patrón en la expresión y niveles de proteína, es muy probable que la vía este siendo inhibida como consecuencia de la disminución en la capacidad de reconocer y ligar los extremos rotos, favoreciendo el mecanismo mutagénico y carcinogénico de las PM<sub>10</sub>.

La alteración en los componentes de la vía NHEJ disminuye la capacidad de reparación de DSB, al no ser reconocidos y ligados los extremos rotos, como consecuencia de la exposición a PM<sub>10</sub>, podría favorecer la presencia de focos de  $\gamma$ -H2A.X y la acumulación de daño en el ADN. Después de la formación de DSB en el ADN se activan las quinasas ATM, ATR y ADN-PKcs (Christmann *et al.*, 2003; Blackford & Jackson, 2017) y posteriormente las quinasas Checkpoint, Chk1 y Chk2, con la finalidad de retrasar el ciclo celular o promover la apoptosis (Jin *et al.*, 2008); sin embargo, la concentración de PM<sub>10</sub> utilizada, al ser una concentración subletal, (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009) no provoca muerte celular a pesar de la formación de DSB, lo que estaría promoviendo procesos como la inestabilidad genómica. Una pieza clave para la supervivencia celular son los sistemas de reparación de ADN; sin embargo, la incapacidad de las células para corregir el daño al ADN, incluida la reparación errónea de DSB, favorecen procesos como la inestabilidad genómica y el riesgo de desarrollar cáncer (Yoshioka *et al.*, 2021). Las PM<sub>10</sub> no solo estarían

inhibiendo NHEJ sino también se ha demostrado que son capaces de alterar la vía de reparación NER al desregular XPA, una proteína involucrada en el reconocimiento del daño (Quezada-Maldonado *et al.*, 2022); por lo que las PM<sub>10</sub> presentan un potencial carcinogénico para el desarrollo de neoplasias como lo es el cáncer de pulmón.

Con estos resultados es difícil concluir si el funcionamiento de vía de reparación NHEJ está siendo inhibida o si las rupturas de doble cadena están siendo reparadas correctamente, por lo que se necesita profundizar en el estudio de la vía y en otro tipo de experimentos como la formación de complejos protéicos, modificaciones pos-traduccionales, formación de micronúcleos, ensayos cometa, entre otros, que permitan definir con mayor precisión los efectos de PM<sub>10</sub> sobre la capacidad de reparación de los daños en doble cadena.

## CONCLUSIONES

Las PM<sub>10</sub> inducen la formación de DSB, además de alterar la expresión y los niveles de proteína de los componentes de la vía NHEJ, específicamente KU80 y XRCC4, por lo que el reconocimiento y la ligación de los extremos rotos en la vía de reparación NHEJ de células A549 probablemente son inhibidos. Si bien con estos resultados es imposible concluir si la vía se inhibe o si los extremos rotos están siendo reparados adecuadamente, permite un primer abordaje para conocer qué es lo está pasando con los componentes de la vía durante la exposición a PM<sub>10</sub> y determinar si estas últimas estarían participando en el mecanismo mutagénico y carcinogénico en las células de pulmón.

## REFERENCIAS

Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Bonner, J. C., Murray, J. C., Rosas, I., & Osornio-Vargas, Á. R. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM<sub>10</sub> from three different zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives*, 110 (7), 715-720.

Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martínez, L., García-Cuellar, C., Nawrot, T. S., & Osornio-Vargas, A. R. (2009). Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environmental Research*, 109 (5), 528-535.

Ávila, M. J. F. (2016). Regulación de la reparación de los cortes de doble cadena en el ADN: papel de la nedilación de proteínas. Universidad de Sevilla, España 226 pp. (Tesis de Doctorado).

Bane, K., De Souza, J., Rojewale, A., Katkam, R. R., Fernandes, G., Sawant, R. & Sachdeva, G. (2022). Dysregulation of X-ray repair cross-complementing 4 expression in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Reproduction*, 163(2), 95-105.

Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421-429.

Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66(6), 801-817.

- Bee, L., Fabris, S., Cherubini, R., Mognato, M., & Celotti, L. (2013). The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression. *PLoS One*, *8*(7), e69061.
- Bocchi, C., Bazzini, C., Fontana, F., Pinto, G., Martino, A., & Cassoni, F. (2019). Characterization of urban aerosol: Seasonal variation of genotoxicity of the water-soluble portion of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1</sub>. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *841*, 23-30.
- Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., & Dagher, Z. (2015). Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environmental Research*, *136*, 352-362.
- Brunekreef, B., & Forsberg, B. (2005). Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *European Respiratory Journal*, *26*(2), 309-318.
- Burton, R. M., Suh, H. H., & Koutrakis, P. (1996). Spatial variation in particulate concentrations within metropolitan Philadelphia. *Environmental Science & Technology*, *30*(2), 400-407.
- Canales-Rodríguez, M. Á., Quintero-Núñez, M., Castro-Romero, T. G., & García-Cuento, R. O. (2014). Las partículas respirables PM<sub>10</sub> y su composición química en la zona Urbana y rural de Mexicali, Baja California en México. *Información Tecnológica*, *25*(6), 13-22.
- Castaño-Vinyals, G., Cantor, K. P., Malats, N., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., & Kogevinas, M. (2008). Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. *Occupational and Environmental Medicine*, *65*(1), 56-60.
- Chávez, J. D., & Gómez, G. D. (2010). Vías de reparación del ADN: nuevos blancos en la terapia contra el cáncer. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, *15*(4), 221-227.
- Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Segura-García, Y., & García-Cuellar, C. M. (2010). PM<sub>10</sub> impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters*, *193*(3), 209-216.
- Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Rosas, I., & García-Cuellar, C. M. (2015). Sampling and composition of airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) from two locations of Mexico City. *Data in Brief*, *4*, 353-356.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, *193*(1-2), 3-34.
- D'Andrea, A. D. (2015). DNA repair pathways and human cancer. *The Molecular Basis of Cancer*. 47-66.
- Danielsen, P. H., Loft, S., Kocbach, A., Schwarze, P. E., & Møller, P. (2009). Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *674* (1-2), 116-122.
- Danielsen, P. H., Møller, P., Jensen, K. A., Sharma, A. K., Wallin, H., Bossi, R., & Loft, S. (2011). Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chemical Research in Toxicology*, *24*(2), 168-184.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *The EMBO Journal*, *21*(12), 3192-3200.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2021. NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2021, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a las partículas suspendidas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>. Valores normados para la concentración de partículas suspendidas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población. 139-148.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2014. NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente y criterios para su evaluación.

Englert, N. (2004). Fine particles and human health: a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 235-242.

García-Cuellar, C. M., Chirino, Y. I., Morales-Bárceñas, R., Soto-Reyes, E., Quintana-Belmares, R., Santibáñez-Andrade, M., & Sánchez-Pérez, Y. (2020). Airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) inhibits apoptosis through PI3K/AKT/FoxO3a pathway in lung epithelial cells: The role of a second oxidant stimulus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 473.

Gualtieri, M., Øvrevik, J., Møllerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H. J., & Holme, J. A. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 713(1-2), 18-31.

Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., & Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. 122(9), 906-911.

Harrison, R. M., & Msibi, I. M. (1994). Validation of techniques for fast response measurement of HNO<sub>3</sub> and NH<sub>3</sub> and determination of the [NH<sub>3</sub>][HNO<sub>3</sub>] concentration product. *Atmospheric Environment*, 28(2), 247-255.

Harrison, R. M., & Yin, J. (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?, *Science of the Total Environment*, 249(1-3), 85-101.

IARC, 2016. International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs on evaluation of carcinogenic risk to humans: outdoor air pollution. 109 p.

Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S. H., Min, B. H., Lee, K. M. & Lee, K. H. (2007). SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Experimental & Molecular Medicine*, 39(1), 8-13.

Jin, J., Ang, X. L., Ye, X., Livingstone, M., & Harper, J. W. (2008). Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19322-19328.

Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2010). Carcinogenicity. *Elsevier*. Indiana University, Indianapolis, USA 117-138.

Lagunas-Rangel, F.A. (2018). Daño y reparación del ADN. *Revista Ciencia*, 69(4), 7-11.

Lamaa, A., Le Bras, M., Skuli, N., Britton, S., Frit, P., Calsou, P., & Millevoi, S. (2016). A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p53 mRNA translation and function. *EMBO Reports*, 17(4), 508-518.

Li, G., Nelsen, C. & Hendrickson, E. A. (2002). Ku86 is essential in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 832-837.

- Li, N., Hao, M., Phalen, R. F., Hinds, W. C. & Nel, A. E. (2003). Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical Immunology*, 109(3), 250-265.
- Li, W., Gu, X., Zhang, X., Kong, J., Ding, N., Qi, Y., & Huang, D. (2015). Cadmium delays non-homologous end joining (NHEJ) repair via inhibition of DNA-PKcs phosphorylation and downregulation of XRCC4 and Ligase IV. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 779, 112-123.
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1-5.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., & Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 4(9), 712-720.
- Londoño, C. A. E., & Vasco, G. J. M. (2008). Relación entre las partículas finas (PM<sub>2.5</sub>) y respirables (PM<sub>10</sub>) en la ciudad de Medellín. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 7(12), 23-42.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V (D) J recombination. *Cell*, 108(6), 781-794.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 7(18), 2902-2906.
- Mattsson, Å., Jernström, B., Cotgreave, I. A., & Bajak, E. (2009). H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo [a] pyrene and dibenzo [a, l] pyrene diol epoxides. *Chemico-Biological Interactions*, 177(1), 40-47.
- Meek, K., Dang, V., & Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Advances in Immunology*, 99, 33-58.
- Mondal, N. K., Mukherjee, B., Das, D., & Ray, M. R. (2010). Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 697(1-2), 47-54.
- Monroy-Bordon P. E. (2020). Efecto diferencial de PM<sub>10</sub> colectadas en dos años distintos en la ciudad de México sobre los niveles y capacidad de translocación nuclear de hmsb6, hmsb2 y hmlh1 de la vía de reparación de bases mal apareadas. (Tesis de Licenciatura)
- Morales, M. E., Derbes, R. S., Ade, C. M., Ortego, J. C., Stark, J., Deininger, P. L. & Roy-Engel, A. M. (2016). Heavy metal exposure influences double strand break DNA repair outcomes. *Plos One*, 11(3), 1-21.
- Morio, T., & Kim, H. (2008). Ku, Artemis, and ataxia-telangiectasia-mutated: signalling networks in DNA damage. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(4), 598-603.
- Mukherjee, B., Kessinger, C., Kobayashi, J., Chen, B. P., Chen, D. J., Chatterjee, A., & Burma, S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, 5(5), 575-590.
- Niu, B. Y., Li, W. K., Li, J. S., Hong, Q. H., Khodahemmati, S., Gao, J. F., & Zhou, Z. X. (2020). Effects of DNA damage and oxidative stress in human bronchial epithelial cells

exposed to PM<sub>2.5</sub> from Beijing, China, in winter. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4874.

Park, D., Lim, J. W., & Kim, H. (2022).  $\alpha$ -Lipoic Acid Inhibits Apoptosis by Suppressing the Loss of Ku Proteins in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Epithelial Cells. *Nutrients*, 14(15), 3206.

Park, Y., Choi, J., Lim, J. W., & Kim, H. (2015).  $\beta$ -Carotene-induced apoptosis is mediated with loss of Ku proteins in gastric cancer AGS cells. *Genes & Nutrition*, 10(4), 1-11.

Pope lli, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*, 287(9), 1132-1141.

PROAIRE. (2011). Programa para mejorar la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2011-2020. 391p. [http://proaire.edomex.gob.mx/mexico\\_2011\\_2020#:~:text=El%20Programa%20para%20Mejorar%20la,generaci%C3%B3n%20de%20contaminantes%20criterio%2C%20t%C3%B3xicos.](http://proaire.edomex.gob.mx/mexico_2011_2020#:~:text=El%20Programa%20para%20Mejorar%20la,generaci%C3%B3n%20de%20contaminantes%20criterio%2C%20t%C3%B3xicos.) Fecha de consulta: 15/09/2022

Quezada-Maldonado, E. M., Chirino, Y. I., Gonsebatt, M. E., Morales-Bárceñas, R., Sánchez-Pérez, Y., & García-Cuellar, C. M. (2022). Nucleotide excision repair Pathway activity is inhibited by airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) through XPA deregulation in lung epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2224.

Quezada-Maldonado, E. M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y. I. & García-Cuellar, C. M. (2021). Airborne Particulate Matter induces oxidative damage, DNA adduct formation and alterations in DNA repair pathways. *Environmental Pollution*, 1-12.

Quezada-Maldonado, E. M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., & García-Cuellar, C. M. (2018). miRNAs deregulation in lung cells exposed to airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) is associated with pathways deregulated in lung tumors. *Environmental Pollution*, 241, 351-358.

Ramsden, D. A. (2011). Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(12), 2509-2519.

Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T., & Chen, J. (2001). Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage–signaling pathways. *Journal of Cell Biology*, 153(3), 613-620.

Rivera-Hidalgo, C., Sánchez-Rojas, F., & Andrade-Robles, M. Á. (2016). Contaminación atmosférica de la Zona Metropolitana del Valle de México y sus efectos en la salud. *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa*, 160 p.

Rojano, R., Arregoces, H., & Restrepo, G. (2014). Composición elemental y fuentes de origen de partículas respirables (PM<sub>10</sub>) y Partículas Suspendidas Totales (PST) en el área Urbana de la Ciudad de Rihacha, Colombia. *Información Tecnológica*, 25(6), 3-12.

Rossner Jr, P., Rossnerova, A., Beskid, O., Tabashidze, N., Libalova, H., Uhlirova, K. & Sram, R. J. (2014). Nonhomologous DNA end joining and chromosome aberrations in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 763, 28-38.

Rossner Jr, P., Uhlirova, K., Beskid, O., Rossnerova, A., Svecova, V., & Sram, R. J. (2011). Expression of XRCC5 in peripheral blood lymphocytes is upregulated in subjects from a heavily polluted region in the Czech Republic. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 713(1-2), 76-82.

Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y. I., Osornio-Vargas, Á. R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruiz, C., Vázquez-López, I., & García-Cuellar, C. M. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM<sub>10</sub>) of urban air pollutants. *Cancer Letters*, 278(2), 192-200.

Santibáñez-Andrade, M., Chirino, Y. I., González-Ramírez, I., Sánchez-Pérez, Y., & García-Cuellar, C. M. (2019). Deciphering the code between air pollution and disease: The effect of particulate matter on cancer hallmarks. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 136.

Santibáñez-Andrade, M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y. I., Morales-Bárceñas, R., & García-Cuellar, C. M. (2021). Long non-coding RNA NORAD upregulation induced by airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) exposure leads to aneuploidy in A549 lung cells. *Chemosphere*, 266, 128994.

Schonn, I., Hennesen, J. & Dartsch, D. C. (2011). Ku70 and Rad51 vary in their importance for the repair of doxorubicin-versus etoposide-induced DNA damage. *Apoptosis*, 16(4), 359-369.

SEMARNAT. (2011). Guía metodología para la estimación de emisiones de PM<sub>2.5</sub>. INE-SEMARNAT, 105p. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/225459.pdf>. Fecha de Consulta: 3/8/2022

SEMARNAT. (2013). Calidad del aire: Una práctica de vida. 28p. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2013/CD001593.pdf>. Fecha de Consulta: 26/9/2022

SEMARNAT. (2016). Inventario Nacional de Emisiones de México (INEM). <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/inventario-nacional-de-emisiones-de-contaminantes-criterio-inem>. Fecha de consulta: 14/9/2022

Sharma, V., Collins, L. B., Chen, T. H., Herr, N., Takeda, S., Sun, W., & Nakamura, J. (2016). Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*, 7(18), 25377.

Sudhanva, M. S., Hariharasudhan, G., Jun, S., Seo, G., Kamalakannan, R., Kim, H. H., & Lee, J. H. (2022). MicroRNA-145 Impairs Classical Non-Homologous End-Joining in Response to Ionizing Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks via Targeting DNA-PKcs. *Cells*, 11(9), 1509.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.

Tecer, L. H., Alagha, O., Karaca, F., Tuncel, G., & Eldes, N. (2008). Particulate matter (PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10-2.5</sub>, and PM<sub>10</sub>) and children's hospital admissions for asthma and respiratory diseases: a bidirectional case-crossover study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(8), 512-520.

Tung, E. W., Philbrook, N. A., Belanger, C. L., Ansari, S., & Winn, L. M. (2014). Benzo [a] pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo [a] pyrene-induced toxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 760, 64-69.

- U. S. EPA. (2004). Air quality criteria for particulate matter. *Citeseer, Princeton*. <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recorddisplay.cfm?deid=87903>. Fecha de Consulta: 6/7/2022
- Vattanasit, U., Navasumrit, P., Khadka, M. B., Kanitwithayanun, J., Promvijit, J., Autrup, H. & Ruchirawat, M. (2014). Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(1), 23-33.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K. & Weinberg, R. A. (2001). hSIR2SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107(2), 149-159.
- Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Flores-Márquez, A. R., Guzmán-Rincón, J., Munive-Colín, Z., Hernández-Mena, L. & Waliszewski, S. M. (2008). Materia orgánica extraída de las aeropartículas de la Ciudad de México y sus efectos genotóxicos. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(2), 105-109.
- Wang, D., Zhou, Z., Wu, E., Ouyang, C., Wei, G., Wang, Y. & Chen, R. (2020). LRIK interacts with the Ku70–Ku80 heterodimer enhancing the efficiency of NHEJ repair. *Cell Death & Differentiation*, 27(12), 3337-3353.
- Wang, J., Pluth, J. M., Cooper, P. K., Cowan, M. J., Chen, D. J., & Yannone, S. M. (2005). Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair*, 4(5), 556-570.
- World Health Organization (WHO). (2021) Ambient (outdoor) air pollution. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health). Fecha de consulta: 22/9/2022
- Xu, X., Ha, S., Kan, H., Hu, H., Curbow, B. A., & Lissaker, C. T. (2013). Health effects of air pollution on length of respiratory cancer survival. *BMC Public Health*, 13(1), 1-9.
- Yang, S., & Wang, X. Q. (2017). XLF-mediated NHEJ activity in hepatocellular carcinoma therapy resistance. *BMC Cancer*, 17(1), 1-10.
- Yoshioka, K. I., Kusumoto-Matsuo, R., Matsuno, Y., & Ishiai, M. (2021). Genomic Instability and Cancer Risk Associated with Erroneous DNA Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12254.
- Yu, P., Guo, S., Xu, R., Ye, T., Li, S., Sim, M. R., & Guo, Y. (2021). Cohort studies of long-term exposure to outdoor particulate matter and risks of cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Innovation*, 2(3), 100143.
- Zhang, X., Zhu, Y., Geng, L., Wang, H., & Legerski, R. J. (2009). Artemis is a negative regulator of p53 in response to oxidative stress. *Oncogene*, 28(22), 2196-2204.
- Zhao, B., Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2020). Polymerase  $\mu$  in non-homologous DNA end joining: importance of the order of arrival at a double-strand break in a purified system. *Nucleic Acids Research*, 48(7), 3605-3618.
- Zorrilla García, A. E., Eirez Izquierdo, M., & Izquierdo Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1), 51-57.