



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA



UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO FARMACOLOGÍA

“Efecto del material particulado (PM₁₀) sobre los niveles del transportador MDR1 y su impacto sobre la citotoxicidad del cisplatino en células de carcinoma pulmonar A549”

T E S I S

Que presenta:

QFI. Rubén Emmanuel Martínez Moctezuma

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias con especialidad en Farmacología

Directores de tesis:

Dra. Yesennia Sánchez Pérez

Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

Ciudad de México.

Enero, 2023

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Epigenética y Medio Ambiente del Instituto Nacional de Cancerología.

Bajo la dirección de la Dra. Yesennia Sánchez Pérez y el Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo.

El desarrollo del presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca No. 788170.

AGRADECIMIENTOS

Para Elisa, por amarme de la forma más pura y simple, por sus atenciones y oraciones que ahora hacen falta, pero sobre todo por ser más que una abuela y ser también una madre para mí, un abrazo al cielo.

A Irma, por siempre estar al pendiente de mí, por su indudable entrega y confianza en cada uno de mis proyectos personales. Por ser mi luz y mi calma, te quiero mucho mamá.

A mis hermanos, Ivett, Viani y César, por ser mi soporte y alivio diario, gracias por las risas y consejos. Sé que nunca estaré solo porque los tengo conmigo.

A mi familia, por enseñarme que el amor es un lenguaje universal que sobrepasa el tiempo y la distancia, gracias por no dejarme abandonar mis sueños y dar todo lo posible para que yo estuviera bien.

A mis amigos del INCAn, Nefte, Jorge, Silvia, Adriana, Yan y Javier, por las pláticas, comidas y consejos que me ayudaron a hacer más amena mi estancia en el hospital. Especialmente muchas gracias a Dennis por ser más que un amigo y ser una guía durante todo el proyecto, además de ser el origen del presente trabajo.

A mis amigos del CINVESTAV, Dante, Fernanda, Brenda, Ingrid y Frida por hacer que nuestra estancia en el centro fuera algo más, por todas la alegrías y momentos que hemos compartido.

A mis amigos, Alejandra, Kelly, Jocelyn, Andrea, Diego, por compartir su amistad conmigo y siempre tener un consejo y un abrazo para mí, gracias por hacer de la Ciudad de México mi segundo hogar.

A mis amigos de Oaxaca Maday, Monroy, Daniela, Cozy, Sam, Mar, Andrea, Nichte, Alesí y Karla por enseñarme que a pesar de la distancia siempre puedo contar con ustedes, por hacer cada reencuentro único y por recordarme siempre quien soy.

A la Dra. Yesennia por ser mi mentora y ayudarme a crecer durante mi estancia en el hospital, por su apertura y disposición a escuchar y asesorar cada una de mis propuestas. Así mismo gracias al Dr. Miguel, Dr. Raúl y Dra. Marel por sus consejos y observaciones. A la Bióloga Rocío por su entrenamiento y apoyo durante muchos de mis experimentos que me ayudaron a realizar y concluir este trabajo.

Al Dr. Javier por sus observaciones y consejos para mejorar el presente trabajo así mismo a las técnicas Lis y Martha por su amabilidad.

Al Dr. Benjamín y al Dr. Carlos por su disposición y guía para la realización de este proyecto.

Proliferación y supervivencia. ¡Infinitas gracias a todos!

RESUMEN

Las aeropartículas contaminantes (PM) ingresan al organismo por vías respiratorias causando daño a la salud por diversos mecanismos moleculares, las PM₁₀ generan daño al DNA ¹, alteración en los mecanismos de reparación de DNA ², cambios en la respuesta antioxidante de las células ³ y cambios en la apoptosis ⁴. Así mismo se ha descrito que las PM incrementan la mortalidad de cáncer de pulmón y esto podría deberse a que las PM₁₀ modifican la respuesta tumoral a la quimioterapia. Uno de los mecanismos involucrados en la quimioresistencia es a través de proteínas de transporte de membrana como MDR1, la cual tiene un sitio de unión inespecífico que le permite el transporte de diversos sustratos, entre ellos fármacos antineoplásicos como el cisplatino. Considerando los cambios moleculares que causan las PM es posible que interfieran en la respuesta citotóxica del cisplatino. En el presente trabajo exploramos dicha posibilidad en estudios *in vitro*.

Todos los procedimientos fueron realizados con la línea celular A549 obtenidas a través de la ATCC. Se determinó la Concentración Inhibitoria 50% (IC₅₀) del cisplatino mediante el ensayo MTT, así como una concentración a la cual las PM₁₀ no disminuyeran la viabilidad celular. Se contó con 4 grupos de exposición los cuales siguieron diferentes esquemas de exposición, se contó con un grupo libre de tratamiento (control), otro que fue expuesto únicamente a PM₁₀, otro que solo fue expuesto a la IC₅₀ de cisplatino (21.07 µM) y un cuarto grupo expuesto a ambos tratamientos. Al finalizar el protocolo de exposición determinamos viabilidad celular mediante citometría de flujo y niveles de la Proteína MDR1 por *Western Blot*. Los ensayos se realizaron por triplicado y se realizaron los análisis estadístico a través de GraphPad Prism 6.

Se encontró la IC₅₀ de cisplatino 21.07 µM, CI95%: 19.02–23.34 µM, al igual que se demostró que la exposición a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 72 horas no modifica la viabilidad celular. Cuando se exponen las células a PM₁₀ seguido por la IC₅₀ de cisplatino observamos una previsión de la muerte del 4% comparada con la mortalidad obtenida cuando solo se administra la IC₅₀ de cisplatino. En ninguno de los tratamientos observamos cambios en los niveles de MDR1.

A pesar de que la exposición previa con PM₁₀ disminuye la actividad del sistema antioxidante y la actividad del sistema de reparación de DNA NER, la citotoxicidad del cisplatino no se ve aumentada, lo que sugiere que las PM₁₀ generan cambios en las células que las protegen de morir por efecto del cisplatino.

Con base en nuestros resultados concluimos que la exposición aguda a PM₁₀ disminuye ligeramente la citotoxicidad del cisplatino, por lo que exposiciones crónicas de PM₁₀ podrían señalar cómo estas disminuyen la respuesta tumoral al tratamiento quimioterapéutico.

ABSTRACT

Contaminant aeroparticles (PM) enter the body through the respiratory system causing damage to the health by different molecular mechanisms. The PM produces DNA damage, alterations in the DNA repair systems, changes in the antioxidant response of the cells, and alters in apoptosis. There's also evidence that related increments in the levels of PM with more mortality in lung cancer and this can be because the PM modifies the antitumoral response to chemotherapy. One of the mechanisms implicated in chemoresistance is through membrane protein transporters like MDR1, this protein has a nonspecific union site that helps the traffic of different substrates, some of which are antineoplastic drugs like cisplatin. Considering molecular changes caused by PM is it possible that PM can modify the cytotoxic response to cisplatin. In this work, we explore this possibility through *in vitro* assays.

All the procedures were performed with the A549 cell line obtained through the ATCC. We determined the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of cisplatin through an MTT assay and a concentration of PM₁₀ that doesn't interfere with cellular viability. We had four different groups that follow different protocols of exposition, we had a group free of treatments (control), another that only was exposed to PM₁₀, another group with only exposure to cisplatin (21.07 µM), and finally a group that received both treatments. At the end of the exposition protocol, we determined cellular viability by flow cytometry and levels of MDR1 protein by Western Blot. All the assays were made in triplicate and analyzed through GraphPad Prism 6.

We found the IC₅₀ of cisplatin 21.07 µM, CI95%: 19.02–23.34 µM, also we demonstrated that the exposition to 10µ g/cm² of PM₁₀ for 72 hours doesn't modify the cellular viability. The cells were exposed to 10µ g/cm² de PM₁₀ and then to the IC₅₀ of cisplatin we saw a prevision of 4% of death compared to when we only exposed the cells to the IC₅₀ of cisplatin. There are no changes in protein levels of MDR1 in any treatment.

Although that, the previous exposure to PM₁₀ decreased the activity of the antioxidant system and the DNA repair system, and the cytotoxicity of the cisplatin doesn't upgrade, this suggests that the PM₁₀ makes changes in the cell that protects against death by the effect of the cisplatin.

With our results, we concluded that the acute exposition decreases lightly the cytotoxicity of cisplatin. Chronic expositions can show us how these particles decrease the antitumoral response to the chemotherapeutic treatment.

| | |
|---|-----------|
| <i>Introducción</i> | 1 |
| Contaminación Ambiental | 1 |
| El Material Particulado | 4 |
| Cáncer de Pulmón | 7 |
| Quimioresistencia a cisplatino | 10 |
| Alteración en la acumulación de cisplatino | 12 |
| Inactivación citosólica del cisplatino | 14 |
| Alteración de la reparación del DNA | 15 |
| <i>Justificación</i> | 16 |
| <i>Hipótesis</i> | 17 |
| <i>Objetivo General</i> | 17 |
| <i>Objetivos específicos</i> | 17 |
| <i>Metodología</i> | 18 |
| Cultivo celular | 18 |
| Determinación curva de crecimiento celular | 18 |
| Determinación IC ₅₀ | 19 |
| Determinación de concentración PM ₁₀ | 19 |
| Protocolo de exposición | 20 |
| Viabilidad celular mediante citometría de flujo | 22 |
| Western Blot | 22 |
| Análisis estadístico | 23 |
| <i>Resultados</i> | 24 |
| <i>Discusión</i> | 28 |
| <i>Conclusiones</i> | 36 |
| <i>Perspectivas</i> | 36 |
| <i>Referencias</i> | 37 |

Introducción

Contaminación Ambiental

La contaminación del aire se define como la presencia sostenida de sustancias que por sus concentraciones pueden resultar dañinas para la salud de los seres vivos y el ambiente ⁵. El aire está compuesto en su mayor parte por nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, gases nobles y agentes contaminantes, los cuales pueden originarse por fenómenos climatológicos, desastres naturales o producto de la actividad humana ⁶.

Si bien existen una gran cantidad de agentes contaminantes, para evaluar la calidad del aire solo se miden seis, los cuales son considerados criterio. Esta denominación se originó durante la elaboración del acta de calidad de aire realizada por la EPA (*Environmental Protection Agency*) en los años 70, en donde se reconoció el daño que generan estos seis contaminantes a la salud humana y al ambiente ⁷, además de establecer los límites permisibles de estos. Los contaminantes criterio son: O₃, CO, SO₂, NO₂, PM₁₀ y PM_{2.5} ⁸; siendo PM las aeropartículas contaminantes; y son utilizados para determinar la calidad de aire de un sitio.

A nivel nacional, la calidad de aire es monitoreada a través de estaciones que registran la presencia y concentración de estos contaminantes. Estas estaciones se encuentran distribuidas alrededor de casi todo el país, con excepción de Quintana Roo y Baja California Sur. La red más grande de monitoreo se encuentra en la Zona Metropolitana del Valle de México, con 23 estaciones ⁹. Los límites permisibles para cada contaminante criterio son dictados por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). En la tabla 1 se muestran los límites para cada contaminante criterio en cuanto a lo que marca la NOM para nuestro país.

Tabla 1. Normas Oficiales Mexicanas que determinan los límites aceptados de los contaminantes del aire.

| Contaminante | Norma | Descripción |
|---|-------------------|--|
| Dióxido de azufre (SO ₂) | NOM-022-SSA1-2019 | 0.040 ppm, máximo promedio de 24 horas. |
| Monóxido de carbono (CO) | NOM-021-SSA1-2021 | 9.0 ppm, máximo anual como promedio móvil de 8 horas |
| Dióxido de nitrógeno (NO ₂) | NOM-023-SSA1-2021 | 0.106 ppm, máximo diario promedio móvil de 1 hora 0.021 ppm, promedio horario anual |
| Ozono (O ₃) | NOM-020-SSA1-2014 | 0.090 ppm, promedio horario 0.065 ppm, máximo diario promedio móvil de 8 horas. |
| Partículas menores a 10 micrómetros (PM ₁₀) | NOM-025-SSA1-2021 | 70 µg/m ³ , promedio 24 horas 36 µg/m ³ , promedio anual |
| Partículas menores a 2.5 micrómetros (PM _{2.5}) | | 41 µg/m ³ , promedio 24 horas 10 µg/m ³ , promedio anual |

La contaminación del aire es un problema que afecta a ciudades altamente contaminadas como la Ciudad de México. De hecho, en el año 2020 la Ciudad de México se encontró entre las 50 ciudades con peor calidad del aire en el mundo ¹⁰. Dos ejemplos de las repercusiones de la contaminación del aire en ciudades altamente contaminadas son: El suceso de Londres en el año de 1952, en el que se presentó un episodio de contaminación del aire que causó una elevada muerte repentina de sus ciudadanos ¹¹. Además de un evento importante reportado en la Ciudad de México que mostró una correlación entre un aumento en la hospitalización de niños con asma en el Hospital Infantil de México y un incremento de los niveles de ozono en el ambiente ¹².

A pesar de que existen sectores que pueden verse más afectados a este tipo de contaminación, ya sea por profesión ¹³, sector social ¹⁴, estado de salud o edad, todos estamos expuestos a la contaminación, es por ello la importancia de regular

y controlar la emisión de contaminantes, ya que, según la OMS el 90% de la población mundial respira aire contaminado ¹⁵.

En el 2016 cerca de 7 millones de muertes prematuras estuvieron asociadas a la contaminación del aire ⁵, y existe evidencia que la relaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ¹⁶ y respiratorias ^{17,18}. Así mismo, la contaminación del aire ha sido reconocida como un agente carcinogénico de grupo 1 de acuerdo a la IARC ^{19,20}. Este reconocimiento se ha otorgado al aire contaminado, incluidas las PM₁₀ y PM_{2.5}.

El Material Particulado

El material particulado (*Particulate matter*), aeropartículas contaminantes o las PM son un mezcla compleja de partículas que se encuentran suspendidas en la atmosfera en forma de sólidos o gotas de líquidos ²¹ las cuales provienen de fuentes directas o se forman a través de reacciones dentro de la atmosfera, teniendo un origen de fuentes naturales (erupción volcánica) o antropogénico (actividades industriales) ²².

Las PM en consecuencia están conformadas por diversos componentes de naturaleza inorgánica; con metales como: fierro, cobre, zinc y vanadio. De origen orgánico en donde están presentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) tal como: benzopireno (BaP), benzofluoranteno y benzoperileno. Además, presentan productos de origen biológico como las endotoxinas bacterianas ²³. La concentración y composición de las PM varía dependiendo del sitio geográfico, temporada del año y durante el tiempo que permanecen en la atmósfera, ya que las actividades humanas así como los fenómenos naturales de la zona caracterizarán a los componentes presentes en las PM, otro factor que modifica la concentración y composición de los componentes son las estaciones del año ²⁴.

Este fenómeno puede presentarse en una misma ciudad, como la Ciudad de México. Por ejemplo, en un estudio realizado en el año 2009 se caracterizó la composición del PM en la zona norte de la ciudad, siendo los principales componentes químicos: CO, EC, SO₄²⁻, NO₃, NH₄⁺, Si, Fe y Ca ²⁵, sin embargo en el 2015 Chirino reportó la abundancia de otros compuestos como; Al, P, S, Cl, K, Pb, Cr, Ti, Mn, Ni, Cu; además de los previamente descritos en un estudio posterior, en el que se analizaron PM de la zona de Xalostoc, que se encuentra ubicada al norte de la Ciudad de México, la cual se caracteriza por ser una zona industrial ²⁶.

Las PM se clasifican según el tamaño aerodinámico equivalente de las partículas. Esta agrupación por equivalencia se debe a que las PM no tienen una forma definida. Por ello se agrupan en moléculas según el diámetro y la distribución

que tendría una partícula esférica en el aire ²⁷. De acuerdo con esto existen las PM₁₀ cuando el tamaño aerodinámico es menor a 10 µm, PM_{2.5} para un tamaño menor a 2.5 µm y PM_{0.1} para partículas menores a 0.1 µm.

Si bien, existen partículas contaminantes con otros tamaños más grandes, estas fracciones no son relevantes. Las PM₁₀ y las PM_{2.5} tienen la capacidad de ingresar a las vías respiratorias profundas de los humanos, e inducir efectos adversos en la salud, debido a su composición. Por ello las PM₁₀ y PM_{2.5} son consideradas como contaminantes criterio y se tiene establecido los límites permisibles en el aire, tanto por la OMS como por las normas mexicanas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Directrices de límites permitidos diarios y anuales de PM_{2.5} y PM₁₀ propuestos por la OMS y México.

| CONTAMINANTE | PM ₁₀ | PM _{2.5} |
|---|--|---|
| Niveles máximos permisibles mundial (WHO., 2021) | 45 µg/m ³ media diaria. 15 µg/m ³ media anual | 15 µg/m ³ media diaria 5µg/m ³ media anual |
| Niveles máximos permisibles en México (NOM-020-SSA1-2021) | 70 µg/m ³ media diaria 36 µg/m ³ media anual. | 41 µg/m ³ media diaria 10 µg/m ³ anual. |

Según el tamaño de partículas, las PM puede depositarse a diferentes niveles del sistema respiratorio. Las PM₁₀ y PM_{2.5} ingresan al organismo a través de la respiración. Las PM₁₀ se depositan en las vías respiratorias superiores mientras que las PM_{2.5} y las partículas ultrafinas pueden viajar hasta los bronquiolos terminales y alveolos donde se incorporan a la circulación sanguínea ya que atraviesan la barrera aire-sangre. De esta forma pueden llegar a cualquier órgano y causar daño ²⁸. Debe considerarse que dentro del material particulado PM₁₀ están presentes también el material particulado PM_{2.5} y PM_{0.1}, tal que, los efectos causados por las PM se deben a la suma de todas ellas.

Si bien, el reconocimiento de la IARC a las PM como carcinógeno reside en estudios donde se describe una relación entre un aumento en la concentración de

exposición a PM y un aumento en la incidencia de cáncer de pulmón en residentes de zonas altamente contaminadas; como ciudades industrializadas o densamente pobladas ^{29,30}; también hay evidencia que demuestra la relación entre un aumento en la concentración de las PM y un incremento de la mortalidad de pacientes con cáncer de pulmón ³¹⁻³³.

Mediante estudios toxicológicos, se ha descrito que las PM₁₀ inducen daño al DNA ¹, inestabilidad genómica ³⁴, alteración en los mecanismos de reparación ², cambios en la respuesta antioxidante de las células ^{3,35}; así como alteración en procesos apoptóticos ⁴. Considerando la composición heterogénea del material particulado se debe reconocer que las PM actúan por diferentes mecanismos a través de sinergismos y antagonismos y que la consecuencia de estos cambios moleculares conlleva al desarrollo de distintas enfermedades.

Es por ello que se reconoce a las PM como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer ^{34,36}. Si bien, existe evidencia que demuestra que las PM participan en el desarrollo de distintas neoplasias ³⁷, particularmente en el desarrollo de cáncer de pulmón ^{38,39}, hasta este momento se desconoce como las PM podrían intervenir sobre tumores ya establecidos, como el hecho de que las PM puedan tener impacto en la respuesta a los fármacos antineoplásicos, considerando las alteraciones que las PM generan a las células.

Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón se origina por el crecimiento descontrolado de células epiteliales y se clasifica en dos grandes grupos, según las características macroscópicas de las células del tumor. Existe el Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*), que agrupa entre un 85-90% de los casos de cáncer de pulmón y puede ser diferenciado del Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (SCLC, *Small Cell Lung Cancer*) por el aspecto que tienen las células tumorales al ser observadas bajo un microscopio, ya que en el SCLC las células tienen un tamaño considerablemente pequeño ⁴⁰.

A su vez el NSCLC también puede ser categorizado en función del tipo de célula epitelial de origen ^{41,42}. Cuando las células producen moco se genera adenocarcinoma, surgido de tejido pulmonar periférico, este subtipo histológico es el más frecuente en los pacientes representando un 70-80% de los casos (Rafiemanesh et al., 2016). En caso de que provenga de células que recubren las vías respiratorias se trata de carcinoma de células escamosas, estas se encuentran cerca de un bronquio principal. Cuando el tumor no tiene su origen en ninguna de las células anteriores se considera carcinoma de células grandes, surgido de tejido pulmonar periférico.

El cáncer de pulmón se estratifica en diferentes etapas considerando el tamaño del tumor (T), si este se ha extendido a nódulos (N) linfoides y si se presentan metástasis (M) (**Figura 1**) (Bade & Dela Cruz, 2020; Gridelli et al., 2015). La estadificación nos permite reconocer la progresión de la enfermedad en los pacientes con cáncer de pulmón y con ello establecer el mejor tratamiento para su padecimiento ⁴⁰.

FASES DEL CÁNCER DE PULMÓN

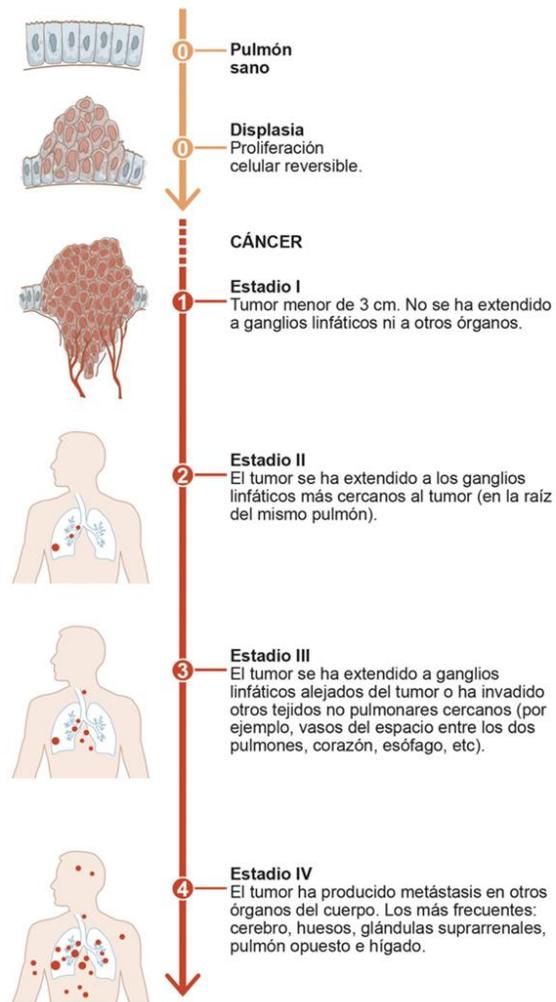


Figura 1. Estadificación del cáncer de pulmón según los parámetros TNM. (Tomado de Zarogoulidis *et al*, 2013*).

Si bien, el cáncer de pulmón es la tercera neoplasia con mayor incidencia a nivel mundial, ocupa el primer lugar en mortalidad. En México, el cáncer de pulmón ocupa el 3er lugar en incidencia y el 5to en mortalidad ⁴⁶. La elevada mortalidad que presenta esta neoplasia se debe a distintos factores, uno de ellos es el diagnóstico. Generalmente el cáncer de pulmón se diagnostica en los estadios más avanzados de la enfermedad (III y IV) lo que complica el buen pronóstico para los pacientes ⁴⁷. Dadas las características sintomáticas de los pacientes el cáncer puede ser confundido con otros padecimientos del sistema respiratorio. Otro factor importante en el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón son las comorbilidades que

presentan los pacientes, debido a que muchos de los pacientes con cáncer de pulmón también suelen padecer enfermedades cardiovasculares.

Así mismo, una elevada mortalidad puede estar relacionada con la falta de eficacia del tratamiento lo cual puede llevar a una falla terapéutica. Esta falla puede deberse a una mala elección del tratamiento; así como a resistencia a los fármacos suministrados ⁴⁸. Además, también intervienen factores como el estilo de vida, los hábitos alimenticios ⁴⁹.

Aunque el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón es el tabaquismo, existe también un aumento de casos en pacientes con cáncer de pulmón no fumadores, los cuales han sido vinculados a la contaminación ambiental y la exposición a las PM ⁵⁰, siendo el adenocarcinoma el principal subtipo histológico relacionado a la exposición a las PM ⁵¹. Los tumores asociados a la exposición a PM son distintos a los asociados a tabaquismo ⁴², sus características están aún por ser definidas, pero podrían presentar una respuesta diferente al tratamiento farmacológico y en consecuencia un tratamiento específico.

Quimioresistencia a cisplatino

El cáncer de pulmón puede ser tratado bajo diferentes esquemas, la elección del tratamiento más adecuado dependerá del estadio clínico del tumor, así como de las características propias del tumor, esta elección tiene soporte en guías nacionales e internacionales de tratamiento ^{44,52}. Sin embargo, en la mayoría de los casos la quimioterapia será administrada como tratamiento único o de apoyo. En la quimioterapia se utilizan fármacos de origen sintético destinados a generar la muerte de las células cancerosas ⁴⁰.

Entre los agentes quimioterapéuticos indicados para el tratamiento de cáncer de pulmón se encuentra el cisplatino (**Figura 2**). El mecanismo de acción por el cual el cisplatino ejerce su efecto citotóxico no está completamente definido, sin embargo, se ha descrito que es el resultado de la formación de aductos intra e intercatenarios en el DNA. Debido a que el fármaco tiene una mayor afinidad por las purinas, se une preferencialmente al átomo N7 de residuos de guanina, por ello los aductos más comunes son: 1,2-(GpG) y d(ApG) ⁵³.

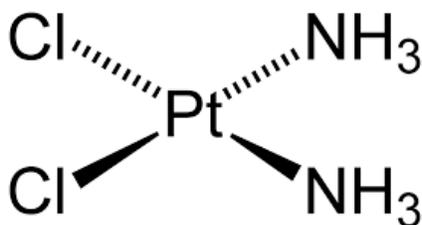


Figura 2. Estructura del cisplatino. La molécula del cisplatino es un complejo de coordinación de platino el cual está unido a dos grupos amino y dos cloruros. Es un agente alquilante que se une a biomoléculas como el DNA, lípidos y proteínas.

Los aductos formados serán responsables de detener la proliferación celular y conducir a la apoptosis por dos vías distintas: apoptosis mitocondrial vía p53 y cascada apoptótica inducida por caspasa-8 dependiente del ligando Fas/Fas ⁵⁴

Por su bajo costo el cisplatino es el tratamiento indicado en la mayoría de los casos ya sea solo o en combinación. Sin embargo, puede presentarse resistencia a este tratamiento. En el área clínica se reconocen dos tipos de resistencia: la innata y la adquirida ⁵⁵. La resistencia adquirida es frecuente y resulta de una primera exposición al fármaco que resulta en una pérdida de eficacia cuando se requiere emplear para una remisión. Mientras que, en la resistencia innata, el tumor no se ve afectado por el tratamiento con cisplatino desde su primer administración y está relacionado a condiciones particulares del paciente y de su tumor que impiden que el fármaco ejerza su efecto citotóxico. Esto puede tener un origen desde el nacimiento del individuo o bien por un agente que modifique los sistemas biológicos de las células de forma que estén establecidos los mecanismos de resistencia al cisplatino previo a su administración ⁵⁶.

Un paciente puede ser sensible o resistente al cisplatino de acuerdo con el periodo de uso entre la primera y segunda incidencia, sí el tiempo es mayor a 2 años en un 70% de los casos el tratamiento es efectivo, sin embargo, sí el tiempo de uso es menor a dos años es muy probable que el tumor no responda al tratamiento ⁵⁷.

Los mecanismos de resistencia al cisplatino son diversos, por lo que la resistencia puede deberse a la interacción entre ellos mismos más que la presencia de alguno de forma individual. Estos procesos se enumeran y muestran en la figura 3 ⁵⁵.

- Alteración en la acumulación de cisplatino
- Inactivación citosólica del cisplatino
- Alteración de los sistemas de reparación del DNA

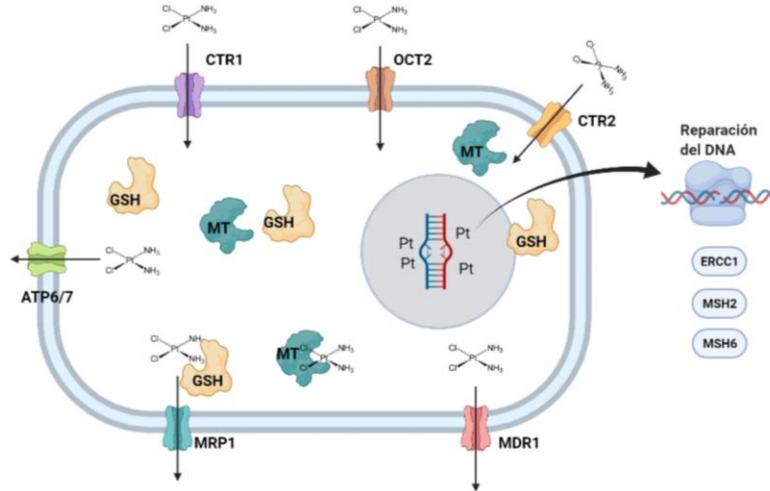


Figura 3. Mecanismos moleculares de resistencia al cisplatino. Disminución de la concentración intracelular por el transporte de cisplatino, aumento de la conjugación de cisplatino con moléculas antioxidantes y aumento de la reparación de aductos del cisplatino por mecanismos de reparación del DNA.

Alteración en la acumulación de cisplatino

A un pH fisiológico, el cisplatino se hidrata con facilidad, cambiando su estructura química por el reemplazo de una molécula de amonio por una molécula de agua (**Fig 4**), dando como resultado una molécula con carga neutra que puede difundirse por la membrana plasmática por difusión pasiva aprovechando un gradiente de mayor a menor concentración ⁵⁸.

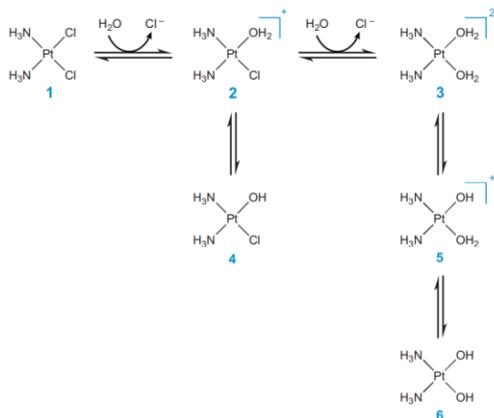


Figura 4. Mecanismo de hidratación del cisplatino

Además de la difusión pasiva, existen otras formas de transporte del cisplatino. Sin embargo, el mecanismo principal de transporte del cisplatino se da a través de transportadores de membrana. Entre los transportadores de ingreso del cisplatino a las células destacan los transportadores de cobre (CTR1 y CTR2) y los transportadores de cationes orgánicos (OCT) ⁵⁹.

Para que el cisplatino ejerza su efecto debe entrar al citosol de las células, por lo que una alteración en la concentración intracelular de cisplatino puede resultar en un incremento o disminución del efecto citotóxico del fármaco ⁶⁰. La resistencia a cisplatino está dada por dos situaciones; ya sea por una disminución de la entrada del cisplatino o un incremento en la salida del fármaco de la célula.

CTR1 es el principal transportador de entrada para cisplatino. Su inhibición produce a una disminución en la entrada de cisplatino en las células ⁶¹. Mientras que al realizar un knockdown del transportador CTR2 se mejora el influjo de cisplatino a la célula; así como su efecto citotóxico ⁶². Además, una disminución en la expresión del gen SLC31A1 que codifica para el transportador CTR1 resulta en resistencia al cisplatino ⁵⁷.

Adicionalmente, la familia de transportadores orgánicos (OCT) también participan en el transporte de cisplatino, permitiendo la entrada de este a las células. Las proteínas derivadas del gen SLC22 son las principales involucradas en este mecanismo, siendo OCT1, OCT2 y OCT3 los transportadores más destacados ⁶³

Por otro lado, un aumento en la eliminación de cisplatino evita que este permanezca en el citosol y en consecuencia disminuya su efecto citotóxico. Esta eliminación puede estar mediada por transportadores de membrana dependientes de ATP, ya sean de la familia tipo "P" o "ABC"⁶⁴.

El cisplatino se extruye mediante los transportadores ATP7A y ATP7B los cuales pertenecen a los transportadores dependientes de ATP de tipo "P". A su vez son proteínas encargadas de la eliminación de cobre de las células. Un descenso en la expresión de estos, ha sido asociado con enfermedades como la enfermedad

de Wilson y Menkes ⁶⁵. Por su parte, niveles altos de ATP7A han sido descritos en tumores NSCLC resistentes a cisplatino ⁶⁶.

Otros transportadores de interés para la extrusión del cisplatino son los derivados de la familia ATP-Binding cassette (ABC), como los pertenecientes a la subfamilia C, que engloba proteínas asociadas de resistencia a múltiples fármacos (MRP's). Estos transportadores son responsables de la eliminación de cisplatino conjugado con glutatión (GSH). La sobreexpresión de MRP1 y MRP2 (también conocida como cMOAT o Transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico) está asociada a un incremento en la resistencia al tratamiento con cisplatino ^{67,68}.

Otra proteína perteneciente a la familia ABC es MDR1 (Multidrug resistance Protein 1), la cual es una proteína de transporte de membrana que en condiciones fisiológicas normales está encargada de la eliminación de xenobióticos en cerebro y sistema digestivo ⁶⁴. Está codificada por el gen ABCB1, y un aumento en los niveles de esta proteína se han relacionado con resistencia a cisplatino ⁶⁹ así como a otros fármacos como vincristina, doxorubicina, paclitaxel y etopósido⁷⁰.

Un aumento en la expresión de MDR1 puede deberse a una desregulación del gen ABCB1, a nivel epigenético, la metilación de su gen, conduce a un aumento de la transcripción de MDR1, así mismo ABCB1 puede estar regulado por factores de transcripción como NF- κ B o AP-1 ⁷¹. A nivel de proteína la regulación de MDR1 está mediada por cambios postraduccionales como la glicosilación, fosforilación y ubiquitinación ⁷².

Inactivación citosólica del cisplatino

Después de que el cisplatino se hidrata, se genera una molécula altamente electrofílica que no solo es capaz de reaccionar con centros nucleofílicos presentes en el DNA, o proteínas, sino también con otras moléculas presentes como son moléculas del sistema antioxidante como glutatión o metalotioneínas ⁶³.

Un aumento en la concentración de glutatión reducido al igual que un incremento en los niveles de las enzimas responsables de la síntesis y conjugación

de glutatión: glutatión cisteína ligasa, glutatión sintetasa, glutatión s-transferasa participan en la disminución de la eficacia del cisplatino ⁷³. Además, este mecanismo de resistencia funciona en conjunto con la excreción de cisplatino a través de los transportadores MRP1 MDR2, los cuales son transducidos por los genes ABCC1 y ABCC2 respectivamente ⁵⁶.

Alteración de la reparación del DNA

Cuando se reconocen daños en el DNA existe diversos mecanismos de reparación del DNA que buscan solucionar estos errores y evitar la muerte celular ⁷⁴. Debido a que el principal mecanismo citotóxico del cisplatino es el daño al DNA por la formación de aductos intracatenarios e intercatenarios ⁵³; los aductos formados deben superar la tasa de recuperación del DNA para lograr que el daño generado conduzca a la apoptosis. Por ello, un aumento en la actividad de los mecanismos de reparación del DNA puede conducir a la ineficacia del fármaco ^{60,75}.

Las proteínas MSH2, MLH1, MSH6 pertenecientes al sistema de reparación de errores de emparejamiento o *Miss Match Repair* (MMR), reconocen el aducto formado por el cisplatino, pero son incapaces de remover el aducto por sí mismas, por ello se produce la muerte de la célula cancerosa ⁷⁶. Se ha descrito que una disminución en la expresión de estas proteínas podría estar involucrada en la resistencia del tratamiento ⁷⁷.

Los aductos de cisplatino son reconocidos por el sistema de escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés Nucleotide Excision Repair) ^{53,78}. Este sistema está conformado por más de 30 proteínas que reconocen el daño, establecen una estructura de reconocimiento en el sitio, escinden los nucleótidos dañados y los sustituyen por nuevos ⁷⁹. Este es el principal mecanismo de reparación de aductos formados por cisplatino, y se han asociado niveles altos de ERCC1; la cual es una proteína de reconocimiento; con resistencia a cisplatino ^{80,81}.

Justificación

Se ha establecido una relación fuerte entre la exposición a la contaminación del aire con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y respiratorias. Así mismo se ha reconocido el daño a la salud que causan los componentes de la contaminación del aire de forma individual.

Existe la evidencia suficiente para vincular la exposición a PM₁₀ con el desarrollo de cáncer de pulmón, principalmente con el subtipo histológico adenocarcinoma. El cual pertenece al NSCLC el cual es el subtipo de cáncer de pulmón que representa un 80-90% de los casos de cáncer. A su vez, el subtipo histológico adenocarcinoma es el tumor mayoritario entre estos pacientes.

Las PM₁₀ no solo son un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón, también se ha demostrado que existe una estrecha relación entre un incremento tanto de incidencia como de la mortalidad de pacientes con cáncer de pulmón en zonas con alta concentración de PM ^{32,33,82}.

Este incremento en la mortalidad de los pacientes podría estar relacionada con factores como la presencia de comorbilidades, así como con la falla terapéutica. Hasta el momento se desconoce cómo las PM modifican tumores preexistentes y las repercusiones que podría generar en la evolución y tratamiento del cáncer de pulmón en pacientes que viven en zonas altamente contaminadas. Debido a los cambios moleculares que generan las PM, estas podrían intervenir en el desarrollo de quimioresistencia al cisplatino, ya que interfieren en mecanismos moleculares de resistencia al cisplatino como alteración en los mecanismo de reparación de DNA; así como mecanismos antioxidantes.

Por lo anterior, es necesario establecer sí el material particulado podría generar resistencia al cisplatino y explorar los mecanismos moleculares por los cuales las PM modificarían la respuesta al cisplatino en células de cáncer de pulmón de seres humanos.

Hipótesis

Las PM₁₀ incrementan los niveles de la proteína transportadora MDR1 generando resistencia a cisplatino en células de carcinoma pulmonar A549.

Objetivo General

Determinar el efecto de PM₁₀ sobre los niveles de la proteína transportadora MDR1 y su impacto sobre la citotoxicidad del cisplatino en células de carcinoma pulmonar A549.

Objetivos específicos

- a) Evaluar los niveles de MDR1, en células A549 expuestas a material particulado (PM₁₀).
- b) Evaluar el efecto del material particulado (PM₁₀) sobre la citotoxicidad del cisplatino en células A549.
- c) Determinar si el material particulado (PM₁₀) reduce la citotoxicidad de cisplatino a través del aumento de niveles de MDR1 en células A549 y su impacto en apoptosis.

Metodología

Cultivo celular

Todos los procedimientos fueron realizados en la línea celular humana, derivadas de adenocarcinoma pulmonar (A549), la cual se obtuvo de la *American Type Cell Culture* (ATCC) con número de catálogo CCL-185. Las células fueron cultivadas con medio F-12 Kaighn's (GIBCO, 21127-030) modificado y suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Suerum*, FBS; GIBCO, 16000044). Los ensayos fueron realizados con pases tempranos de la células, considerando como mínimo para uso el tercer pase y como máximo el décimo pase. La línea celular A459 es útil para el estudio de cáncer de pulmón de células no pequeñas pues tienen un comportamiento similar a las células pulmonares epiteliales alveolares de tipo II, las cuales están encargadas de recubrir la superficie del pulmón y tienen la función de producir surfactantes a través de los cuerpos lamelares. Además, es de tipo adenocarcinoma por lo que las células A459 son un buen modelo para el estudio del cáncer de pulmón de células no pequeñas ⁸³.

Determinación de la curva de crecimiento celular

Se determinó que 4000 células es una adecuada densidad para los ensayos que se realizaron en placas de 96 pozos, para ello se sembraron 4000 y 5000 células A549 por pozo en placas de 96 pozos (Thermo Scientific, 167425); cada pozo tiene un área de 0.33 cm². Se permitió el crecimiento celular por 120 horas, simulando las condiciones de temporalidad de nuestro ensayo de exposición. El medio de cultivo se sustituyó cada 48 horas por medio fresco para permitir la administración de nutrientes. Al finalizar las 120 horas de crecimiento, se adicionó MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Invitrogen, M6494) y 4 horas después se agregó DMSO (Dimetilsulfóxido) para disolver los cristales de formazán. La viabilidad se determinó mediante absorbancia utilizando dos longitudes de onda

(570 y 650 nm) con ayuda del programa lcontrol en el equipo TECAN infinite M200 PRO. La adición de MTT permitió cuantificar la viabilidad de forma indirecta pues este ensayo establece la actividad metabólica mediante un ensayo colorimétrico basado en la transformación del tetrazolio en cristales de formazán, por la actividad de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. Así mismo, se trasladó esta densidad celular en placas de 6 pozos siendo 120, 000 células la que mostraron una mejor densidad celular.

Determinación de la IC₅₀ del cisplatino

Primero se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀ *Inhibitory Concentration* por sus siglas en inglés), del cisplatino (Sigma, P4394), a través del ensayo MTT. Para ello se sembraron 4000 células A549 por pozo en placas de 96 pozos (0.33 cm²), las cuales fueron tratadas por 48 horas con diferentes concentraciones de cisplatino (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100 y 120 µM), al finalizar la exposición, se adicionó MTT y 4 horas después se agregó DMSO (Dimetilsulfóxido) para disolver los cristales de formazán. La viabilidad se determinó mediante absorbancia utilizando dos longitudes de onda (570 y 650 nm). La primera de estas se empleó para eliminar el ruido ocasionado por el rojo fenol incluido en el medio de cultivo F12K, mientras que la segunda es la longitud que excita al formazán generado por las células viables.

Determinación de la concentración PM₁₀

El material particulado se obtuvo a través de recolección usando un colector de aire de alto volumen (GMW modelo 1200 VFC HVPM10 Sierra Andersen) con un flujo constante de 1.13 m³/min. El sitio de recolección fue la zona sur de la Ciudad de México que está situado en la Zona Metropolitana del Valle de México y es considerado de carácter residencial. Para la recuperación de PM₁₀ se usaron filtros

de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 3.0 μm (Sartorius AG). Las PM fueron obtenidas de la membrana de manera suave con un bisturí. Las PM_{10} fueron guardadas en frascos libres de endotoxinas a 4 °C en la oscuridad hasta su uso. El material particulado PM_{10} pertenece al año 2017 y procede de la suma de la recolección mensual a lo largo de todo el año, y la caracterización de los componentes de las PM se describió previamente (72).

Para determinar si la exposición a PM_{10} modifica la viabilidad celular se realizó nuevamente un ensayo de viabilidad por medio de MTT. Este procedimiento fue realizado con diferentes concentraciones de PM_{10} (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), para encontrar una concentración a la cual las PM_{10} no tienen impacto sobre la viabilidad celular, para ello se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante MTT a 72 con las concentraciones de PM_{10} mencionadas.

Protocolo de exposición

Una vez obtenida la IC_{50} del cisplatino y la concentración de las PM_{10} que no afectara la actividad metabólica mitocondrial, las células fueron expuestas a ambos tratamientos, esto se realizó considerando 4 grupos como se muestra en la tabla 3. El grupo control no recibió ningún tratamiento, así mismo se contó con un grupo que solo fue expuesto a PM_{10} y otro que solo fue expuesto a la IC_{50} de cisplatino, el cuarto grupo recibió PM_{10} + IC_{50} de cisplatino y fue el determinante para medir el efecto de las PM_{10} sobre la respuesta citotóxica del cisplatino. Para todos los grupos se sembraron 120,000 células por pozo en placas de 6 pozos (Thermo Scientific, 140675). Después de un periodo de adherencia (24 horas) se realizó la exposición a PM_{10} (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para los grupos correspondientes. 24 horas después y sin cambiar el medio de cultivo se añadió la IC_{50} del cisplatino para los grupos que recibían este tratamiento. Este procedimiento fue efectuado retirando 1 mL de medio de cultivo al cual se le añadió la IC_{50} de cisplatino. Finalmente, al transcurrir 120 horas desde el sembrado se realizó el ensayo correspondiente para determinar

viabilidad celular y niveles de la proteína transportadora MDR1 de todos los grupos (figura 5).

Tabla 3 Grupos experimentales con esquemas de tratamiento, la x representa que recibió el tratamiento.

| GRUPO | Exposición a PM ₁₀ | Exposición a IC ₅₀ de cisplatino |
|---|-------------------------------|---|
| Control | | |
| PM ₁₀ | X | |
| IC ₅₀ de cisplatino | | X |
| PM ₁₀ + IC ₅₀ de cisplatino | X | X |

(Fig. 5)

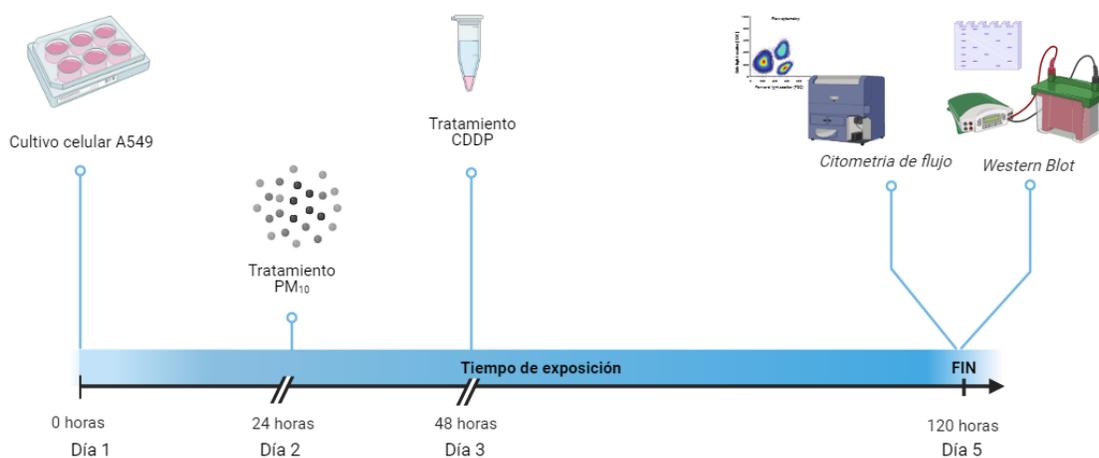


Figura 5. Protocolo de exposición de las células A549 a PM₁₀ y cisplatino (IC₅₀). Cada día representa 24 horas, por ello los desenlaces se realizan a las 120 horas después del sembrado inicial.

Viabilidad celular mediante citometría de flujo

Además de evaluar la viabilidad celular por el ensayo de MTT, también evaluamos la viabilidad celular mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio como marcador. Esta molécula se une a las células cuya membrana está disrumpida y se une a ácidos nucleicos, diferenciando células viables de apoptóticas. Para ello se siguió el protocolo de exposición descrito previamente. Para llevar a cabo esta evaluación, al finalizar el tratamiento, las células fueron despegadas con tripsina-EDTA (ATCC, 30-2101) y transferidas a tubos de citometría de flujo. Las muestras se centrifugaron por 3 minutos a 1200 rpm y se realizó un lavado con PBS con 2% de SFB (GIBCO, 7011-044). Finalmente, se resuspendió el botón celular en la solución de PBS con SFB al 2% y se adicionó yoduro de propidio a una concentración final de 10 µg/ml. Después de un periodo de incubación de 15 minutos, las muestras fueron leídas con el citómetro de flujo (FACScanto™ II Becton Dickinson Software: FACSDiva V.6.1.3).

Niveles de la proteína transportadora MDR1 por Western Blot

Los niveles de la proteína transportadora de membrana MDR1 se determinaron mediante Western Blot, y se utilizó como un control positivo de la presencia de MDR1, proteínas extraídas de la línea HepG2. Después del tiempo de exposición de los diferentes tratamientos previamente mencionados, se extrajeron las proteínas de membrana empleando el amortiguador de RIPA modificado (Tris 50 mM pH 7.5, SDS al 1 %, Tritón X-100 al 1% y NaCl 150 mM) más un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail). La cuantificación de proteínas se realizó a través del método de ácido bicinonínico, utilizando una curva de albúmina como estándar (Thermo Fisher, 23209). Para el proceso de electroforesis se cargaron 30 µg de proteína por pozo en geles de poliacrilamida de dos fases (10% y 6%) por una hora y media a un voltaje constante (150 V). La transferencia de las proteínas se llevó a cabo en

membranas de fluoruro de polivinilideno de 0.45 μm (PDVF, Millipore, IPVH00010), utilizando el protocolo estándar de transferencia (30 min a 1 A y 25V) del equipo (Bio-Rad Trans-Blot Turbo) que permite una transferencia semiseca. Las membranas fueron bloqueadas durante una hora en agitación constante con una solución filtrada de albúmina al 5% en TBS-Tween al 0.1%. Los anticuerpos primarios fueron incubados en una dilución 1:1000 para GAPDH (Cell signaling, 32233) y 1:1000 para MDR1 (Santa Cruz, sc-55510) durante toda la noche a 4°C con agitación constante, previamente se cortó la membrana en dos secciones para realizar la incubación simultánea. Después de la incubación se realizaron lavados con TBS-Tween 20 al 0.1%. Seguido por incubación con el anticuerpo secundario antimouse conjugado con HRP (Amersham, NXA931) 1:2000 por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante, el cortado de membrana permitió realizar una incubación simultánea libre de interferencias. Finalmente se detectó a las proteínas MDR1 y GAPDH a través de quimioluminiscencia empleando el kit Immobilon™ Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore, WBKLS0100) y las bandas fueron observadas en el equipo UVP ChemiDoc-It Imager UVP. La densitometría se realizó mediante el software imageJ versión 8.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6 para el análisis de datos, se realizaron ensayos de varianza de una sola vía (ANOVA) y la prueba Tukey como análisis pos hoc, las diferencias fueron consideradas significativas con una $p < 0.05$. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Resultados

Determinación de la IC₅₀ del cisplatino

Se determinó la IC₅₀ del cisplatino a través de la construcción de una curva concentración respuesta (figura 6) por medio del ensayo de MTT en células A549, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino por un periodo de 48 horas. Una vez obtenida la curva se realizó una regresión no lineal que evalúa el grado de correlación entre el log de la concentración administrada vs el porcentaje de viabilidad obtenida, de esta forma se obtuvo la IC₅₀ que representa la pendiente en el comportamiento lineal de la curva sigmoidea. La IC₅₀ del cisplatino para células A549 expuestas al fármaco por 48 horas tiene una concentración de 21.07Mm, con un intervalo de confianza de 95% (CI95%) de 19.02–23.34 Mm.

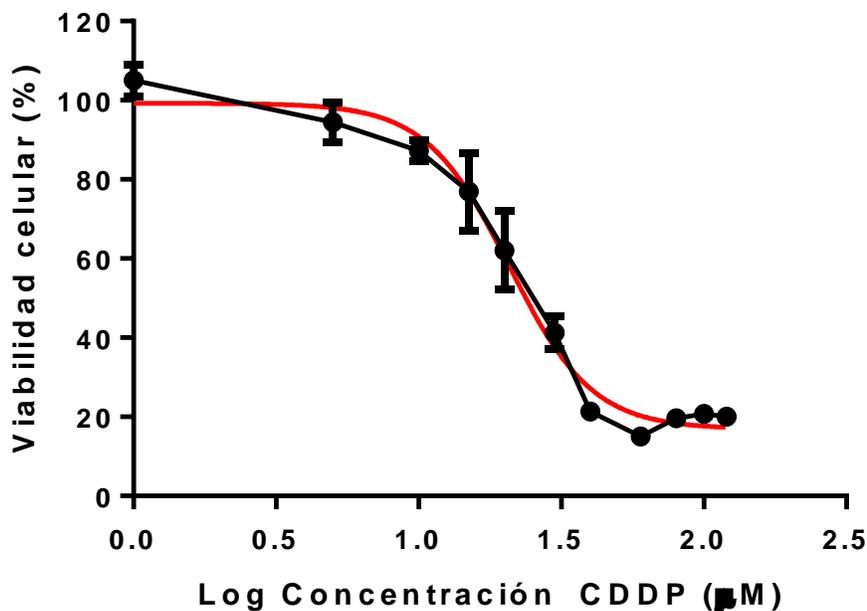


Figura 6. El cisplatino presenta una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de 21.07 Mm. Curva concentración de cisplatino contra viabilidad de células A549 expuestas a distintas concentraciones de cisplatino. La línea roja corresponde al ensayo de regresión no lineal, mientras que la línea negra representa a los datos obtenidos con su respectiva desviación estándar. La curva se construyó a partir de 3 experimentos independientes y los resultados poseen un intervalo de confianza del 95% (CI95%) de 19.02 a 22.67 µM.

Determinación de citotoxicidad de las PM₁₀

Los ensayos de viabilidad celular en células A549 expuestas a PM₁₀ por 72 horas demostraron que la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ disminuye un 11.46% la viabilidad de células A549 (figura 7), una concentración mayor (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) disminuye un 36.4 % la viabilidad y una concentración menor (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) disminuye un 7.12% la viabilidad de las células A549. El análisis de múltiples comparaciones de Tukey nos demostró que la administración de PM₁₀ disminuye la viabilidad de las células A549, sin embargo, no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la administración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ o 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en cuanto a la disminución de la viabilidad celular.

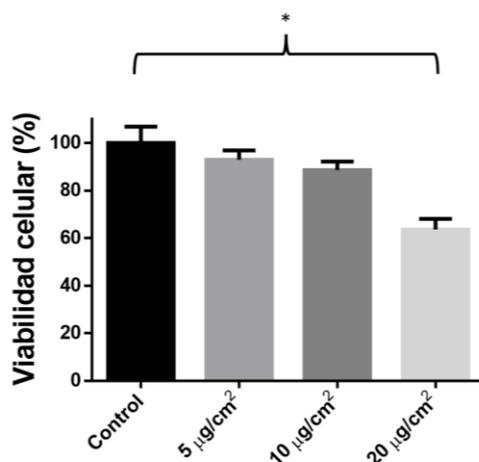


Figura 7. Las PM₁₀ disminuyen la viabilidad de células A549. Curva concentración de PM₁₀ contra viabilidad de células A549 expuestas a distintas concentraciones de PM₁₀. Se realizaron 3 ensayos independientes a los cuales se les determinó la media. Los asteriscos representan diferencia significativa entre los grupos con un valor de $*p < 0.05$, mientras que ns significa que no hay diferencia significativa. Análisis de varianza de solo una vía (ANOVA) y multifactorial Tukey.

Viabilidad celular mediante citometría de flujo

Los resultados anteriores permitieron determinar la concentración IC_{50} del cisplatino (21.07Mm), así como la concentración óptima de PM_{10} ($10 \mu g/cm^2$). A través de citometría de flujo se encontró que la IC_{50} calculada de cisplatino mediante MTT induce una mortalidad del 51.69%; mientras que la administración PM_{10} no disminuye la viabilidad celular de forma significativa con respecto a las células que no fueron sometidas a ningún tratamiento (figura 8). Cuando se expusieron las células a PM_{10} seguido de la IC_{50} de cisplatino se encontró una viabilidad celular de 55.43%, que comparado con el grupo con exposición solo a la IC_{50} de cisplatino (51.69) representa un 4% menos de mortalidad.

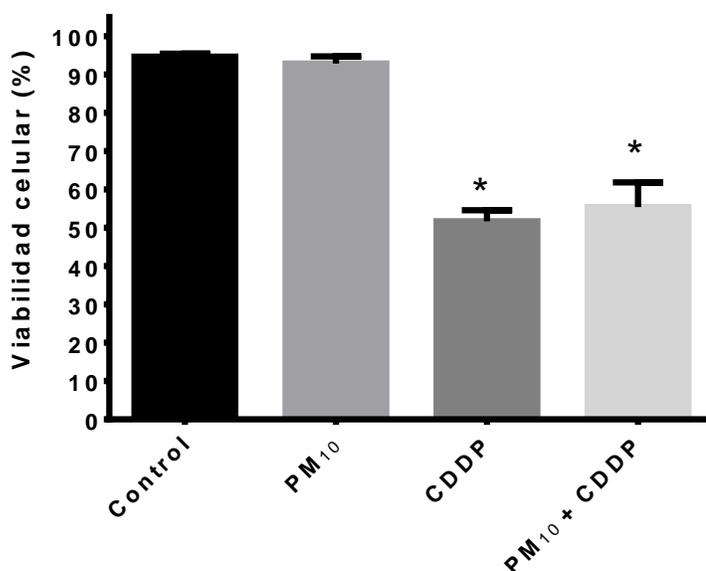


Figura 8. La administración combinada de PM_{10} + cisplatino (IC_{50}) disminuye la mortalidad inducida por cisplatino. Se sometieron células A549 a diferentes esquemas de tratamiento considerando 4 grupos: control, PM_{10} , cisplatino (IC_{50}) y PM_{10} + cisplatino (IC_{50}). La viabilidad celular se ve disminuida cuando se administra la IC_{50} de cisplatino y la combinación de PM_{10} + cisplatino (IC_{50}). Los asteriscos representan diferencia con respecto al control con un valor de $*p < 0.05$. Análisis de varianza de solo una vía (ANOVA) y multifactorial Tukey.

Niveles de la proteína transportadora MDR1 por Western Blot

La proteína transportadora de membrana MDR1 se encuentra en células A549 en bajas cantidades, como se puede observar en el Western Blot (figura 9A control). No se observan cambios significativos en los niveles de MDR1, ni tampoco en el balance de la proteína glicosilada o desglucosilada en ninguno de los grupos tratados.

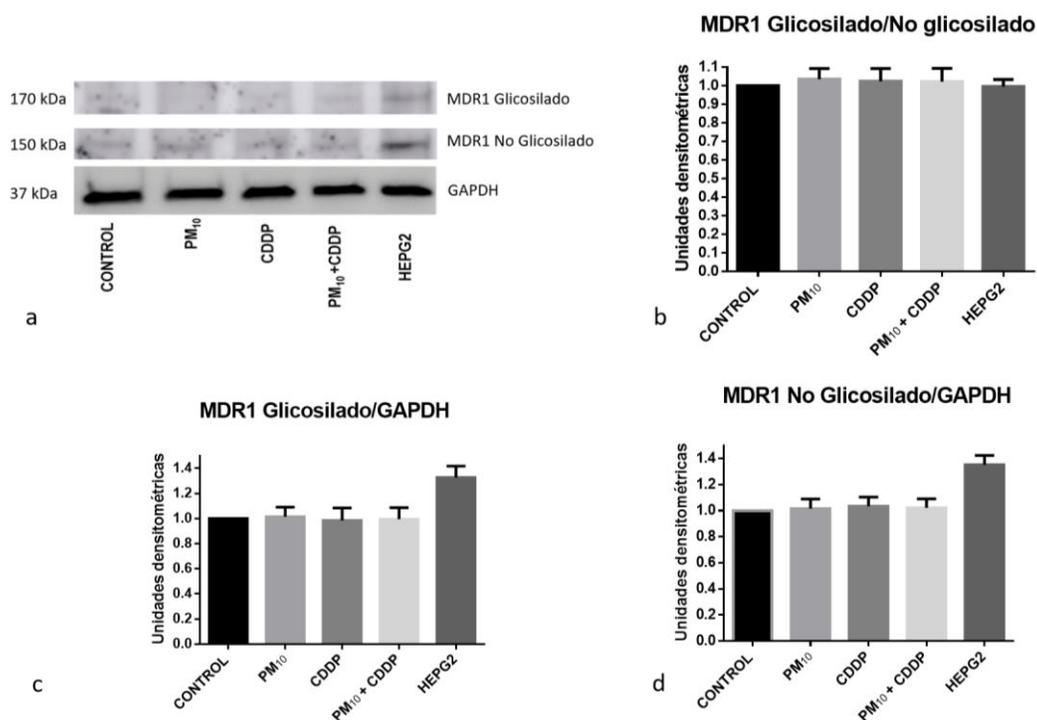


Figura 9. La exposición a PM₁₀ o cisplatino no modifica los niveles de la proteína transportadora de membrana MDR1 en células A549. a) Western blot de la proteína MDR1 para los diferentes grupos: control, PM₁₀, cisplatino (IC₅₀) y PM₁₀ + cisplatino (IC₅₀). La línea celular HepG2 se utilizó como control positivo de MDR1 y GAPDH se utilizó como control de carga. b) Balance de la proteína MDR1 glicosilada y no glicosilada para los diferentes grupos. Valores normalizados a través de GAPDH como control de carga. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**p* < 0.05) Análisis *post-hoc* Tukey. c) MDR1 glicosilada d) MDR1 no glicosilada para los diferentes grupos: control, PM₁₀, cisplatino (IC₅₀) y PM₁₀ + cisplatino (IC₅₀). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**p* < 0.05) Análisis *post-hoc* Tukey.

Discusión

En las últimas décadas se ha observado un aumento en el número de casos de pacientes con cáncer de pulmón no relacionadas a tabaquismo (Malhotra et al., 2016b; Mu et al., 2013) los cuales han sido vinculados a otro tipo de factores de riesgo como la contaminación del aire y particularmente a las PM⁸⁵ ya que existe evidencia epidemiológica que demuestra que un aumento de 10 µg/m³ en los niveles permisibles de exposición a material particulado diarios, aumenta la incidencia de este tipo de cáncer^{37,86}. Además, también hay evidencia que relaciona la exposición a las PM y un aumento en la mortalidad de pacientes con cáncer de pulmón^{31,39,82}. Incluso el riesgo de muerte se extiende cuando los pacientes están expuestos a incrementos en los niveles de PM₁₀ durante los estadios tempranos de su enfermedad⁸⁷. Este incremento en la mortalidad es preocupante considerando que la esperanza de vida para los pacientes con cáncer de pulmón es corta, después de 5 años del diagnóstico solamente entre el 10 al 20% de los pacientes continuaran con vida^{41,43,52}, así mismo según datos de GLOBOCAN el cáncer de pulmón es el cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial⁴⁶.

El aire que respiran los habitantes de la Ciudad de México es de mala calidad. Durante el 2019 se registraron 271 días con mala calidad de aire. De los cuales en 230 días la mala calidad del aire se debió a un incremento en las concentraciones tanto de las PM₁₀ como de las PM_{2.5}⁸⁸. Además, en ese año se excedió casi 5 veces el promedio anual tanto de PM₁₀ (70 µg/m³) como de PM_{2.5} (27.7 µg/m³) de los valores recomendados por la OMS, que establece un promedio anual de 15 µg/m³ para PM₁₀ y 5 µg/m³ para PM_{2.5}. Considerando que la normativa mexicana (NOM-020-SSA-2021) establece límites superiores a los establecidos por la OMS, debe considerarse que los pacientes mexicanos se encuentran expuestos a concentraciones superiores de PM₁₀ lo cual los pone en una situación de mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón y también un mayor riesgo de muerte.

Si bien, la evidencia epidemiológica ha establecido una relación entre la exposición a las PM con una aumento en la incidencia y la mortalidad por cáncer de

pulmón, los estudios toxicológicos han permitido entender los mecanismos moleculares por los cuales la exposición a material particulado podría intervenir en el desarrollo de cáncer de pulmón. Se ha demostrado cómo las PM₁₀ generan daño al DNA ^{1,89}, inestabilidad genómica ³⁴, alteración en mecanismos de reparación del DNA dañado ⁹⁰, disminución de la respuesta antioxidante de las células ³ y evasión de apoptosis ⁴. En conjunto estos mecanismos contribuyen al proceso de carcinogénesis de un tumor, pero de momento se desconoce las repercusiones que podrían causar las PM en tumores preestablecidos, generando tumores más resistentes o agresivos que repercutan en el pronóstico de los pacientes con cáncer.

Existen una gran cantidad de factores que contribuyen a la elevada mortalidad del cáncer de pulmón, entre ellos está el diagnóstico tardío. En México solo un 0.6% de los casos son diagnosticados en una etapa temprana, por lo que gran parte de los pacientes son diagnosticados en una etapa avanzada ⁹¹ lo que condiciona el tratamiento a la terapia paliativa ⁴⁸. Por otra parte, la falla terapéutica es un factor fundamental en la elevada tasa de mortalidad de pacientes con cáncer de pulmón ⁹². La falla terapéutica puede deberse a una mala elección del tratamiento o bien a la resistencia a este ⁹³. La quimioresistencia es un fenómeno que se presenta en pacientes con cáncer que no responden al tratamiento quimioterapéutico ya que su neoplasia evade los mecanismos citotóxicos de los fármacos administrados ⁹⁴. Debido al impacto que tiene las PM sobre mecanismos celulares, es posible que las PM interfieran en el tratamiento antineoplásico por su acción sobre mecanismos de resistencia.

El cisplatino es uno de los fármacos más empleados en el tratamiento de tumores sólidos, además, es de primera elección para el tratamiento de cáncer de pulmón en cualquiera de los estadios de la enfermedad, cuando se opta por administrar quimioterapia. Su uso es amplio debido a su bajo costo, sin embargo, la elevada quimioresistencia ha complicado su administración. Existen diversos mecanismos moleculares por los cuales un paciente puede presentar quimioresistencia al cisplatino, siendo los más importantes los relacionados a la regulación de la concentración intracelular del fármaco, ya sea por el transporte del

fármaco a la célula o la conjugación del cisplatino con moléculas antioxidantes ⁶³, así como los mecanismos implicados en la reparación de DNA dañado ⁷⁸.

El presente trabajo es uno de los primeros esfuerzos en establecer una relación entre la exposición a PM con la pérdida de eficacia del tratamiento quimioterapéutico. Anteriormente se observó como una exposición por 3 a 5 semanas a PM_{2.5} modifica la respuesta citotóxica de la doxorubicina en células BEAS2B⁹⁵ la suma de estos resultados podrían ayudar a explicar la elevada mortalidad de pacientes con cáncer de pulmón.

Para poder determinar si la exposición a PM₁₀ modifica la respuesta citotóxica del cisplatino, fue necesario establecer un parámetro que nos permitiera medir el efecto citotóxico del fármaco, este parámetro es la IC₅₀ que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de crecimiento de una población, además de ser la pendiente dentro de una curva sigmoidea de la respuesta biológica de los fármacos, ya que no existe una relación dosis respuesta lineal sino exponencial ⁹⁶. Los resultados de viabilidad celular obtenidos demostraron que las células A549 responden al tratamiento con cisplatino con una IC₅₀ de 21.07 μ M. Este resultado coincide con lo reportado en la literatura en donde sugieren la evaluación de 24 horas como la más adecuada para observar el efecto del citotóxico del cisplatino ^{97,98}.

Por otra parte, los resultados de viabilidad celular en células A549 expuestas a diferentes concentraciones de PM₁₀, obtenidos por el ensayo con MTT, nos demuestran que esta exposición no modifica la viabilidad celular significativamente. Se decidió utilizar la concentración de 10 μ g/cm² sobre la concentración de 5 μ g/cm², considerando los múltiples estudios en los cuales se ha demostrado el efecto biológico a nivel celular de las PM₁₀ con esta concentración ^{4,99-101}.

Determinar la viabilidad celular por un método distinto como citometría de flujo nos permitió corroborar los resultados previamente obtenidos, además de eliminar el sesgo del ensayo MTT, el cual mide viabilidad celular de forma indirecta a través de un ensayo metabólico ¹⁰². De esta forma se pudo asegurar que la IC₅₀ utilizada para cisplatino tiene el mismo comportamiento para el ensayo MTT y también para el método de yoduro de propidio. Aunque el ensayo de viabilidad

celular por MTT realizado en A549 expuestas a PM₁₀ demostraba una disminución significativa de la viabilidad celular con respecto a células no expuestas a PM₁₀, el ensayo de yoduro de propidio demostró que esta concentración no disminuye significativamente la viabilidad celular. Esto coincide con lo reportado previamente en donde, por ensayo de cristal violeta se administraron hasta 160 µg/cm² de PM₁₀ sin representar un cambio significativo en la viabilidad celular de células A549 ¹⁰³.

Dicho lo anterior, las concentraciones empleadas en este ensayo fueron las más adecuadas. Pues 21.07µM de cisplatino induce un 50% de mortalidad en células A549 y 10 µg/cm² de PM₁₀ no modifica la viabilidad celular de A549, lo que nos permitió observar el impacto de las PM₁₀ en este modelo.

La respuesta citotóxica al cisplatino se ve ligeramente disminuida cuando las células A549 se expusieron previamente a PM₁₀. Aunque la reducción es pequeña y estadísticamente no significativa (4%), resaltamos que no se presenta un aumento en mortalidad. Esta situación representa un resultado bastante importante considerando los efectos biológicos causados por las PM₁₀ que podrían generar un contexto de sensibilidad al cisplatino.

El principal mecanismo de daño de las PM₁₀ es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya sea por reacciones de Fenton por los metales presentes en ellas o bien por la formación de epóxidos derivados de los HAPs, ya que un aumento en los niveles de ROS tiene un impacto directo en la respuesta antioxidante de las células ². También se sabe que las PM₁₀ disminuyen la concentración de GSH disponible ³, además de disminuir la respuesta antioxidante de las células. Considerando que un aumento en la conjugación de cisplatino con moléculas antioxidantes es un mecanismo de resistencia al fármaco ⁷³, una disminución del sistema antioxidante por efecto de las PM permitiría un incremento en el cisplatino intracelular y un aumento en su citotoxicidad ⁶³. Sin embargo, no se encontró ese efecto en nuestro modelo. Lo que sugiere que el mecanismo que medie la disminución del efecto citotóxico del cisplatino puede estar relacionado con los mecanismos de reparación de DNA dañado.

Se ha demostrado que NER (el principal mecanismo de reparación de aductos de cisplatino) se encuentra comprometido por exposición a las PM ⁷⁶. La

exposición aguda a PM₁₀ disminuye la actividad de la vía de reparación de DNA NER ¹⁰⁴,. Por ello la exposición previa a PM₁₀ permitiría una acumulación de daño al DNA generada por los aductos de cisplatino, ya que estos no podrían ser reparados por el sistema NER y en consecuencia podría presentarse aumento en la apoptosis.

No observar un aumento de la muerte celular nos demuestra que la exposición previa a PM₁₀ genera cambios moleculares que protegen a las células A549 de la citotoxicidad del cisplatino. Cambios que les permiten sobrevivir a pesar de tener dos condiciones biológicas que las sensibilizan al efecto del fármaco. Uno de estos cambios podría estar relacionado a proteínas que modifiquen el eflujo del cisplatino en el citosol de las células ⁵⁵, ya sea en una disminución en la entrada del fármaco, o bien en mayor salida de este ⁹⁶.

La proteína a resistencia múltiple a fármacos o MDR1, es uno de los mecanismos más conocidos y estudiados para la resistencia a fármacos ⁶⁴ además de ser una de las proteínas encargadas del transporte del cisplatino, ya que posee un sitio de unión inespecífico que le permite tener como sustratos una gran cantidad de moléculas, entre ellas fármacos antineoplásicos ^{96,105}. La expresión elevada de la proteína MDR1 está asociada con un perfil farmacoresistente de algunos pacientes con cáncer ¹⁰⁶. Esta asociación de farmacoresistencia está relacionada también con el gen que expresa a MDR1, el cual es el gen ABCB1 ¹⁰⁷, este no solamente regula a MDR1 sino también a otras proteínas de resistencia como BRCP o MRP1 ⁶⁴ y está asociado a un mal pronóstico para los pacientes con cáncer ¹⁰⁸.

El gen ABCB1 a su vez puede ser regulado por diversos factores, por ejemplo, está establecido que NFKβ actúa como inductor del gen cuando hay un incremento en los niveles de NFKβ ¹⁰⁹, al igual que ABCB1, éste puede ser inducido por un aumento en los niveles de HIF1α ¹¹⁰, o un aumento del receptor de arilhidrocarburos (AhR) ¹¹¹. Aunque no se ha establecido una relación directa entre la exposición a PM₁₀ y un incremento en la actividad del gen ABCB1, las PM₁₀ incrementan los niveles de NFKβ, HIF1α y AhR ^{1,112,113}.

Las PM₁₀ no incrementa los niveles de la proteína MDR1, y no se observaron cambios en el balance entre la proteína glicosilada y no glicosilada. Este efecto

postraducciona es fundamental para la regulaci3n de la prote3na ¹¹⁴. La adici3n del carbohidrato a MDR1 permite que se una a la membrana celular, adem3s de impedir su degradaci3n por medio de ubiquitinaci3n ⁷². El an3lisis por Western Blot solo nos permite reconocer este cambio postraducciona de MDR1, sin embargo, se desconoce s3 otros cambios postraduccionales suceden como la fosforilaci3n de la prote3na o degradaci3n por ubiquitinizaci3n. Por otra parte, no evaluamos la actividad de la prote3na transportadora, la cual podr3a encontrarse aumentada y en consecuencia disminuir la concentraci3n de cisplatino del citosol de las c3lulas disminuyendo la citotoxicidad del f3rmaco.

Otro factor que podr3a modificar la concentraci3n intracelular del cisplatino es la actividad de otros transportadores de membrana como el transportador CTR1, que permite el ingreso de cisplatino a la c3lula y que se ha reportado en la resistencia a este f3rmaco ^{61,115}. Al igual que el transportador de cationes org3nicos OCT2, que cumple con la misma funci3n de entrada y se ha reportado en resistencia a cisplatino ¹¹⁶.

Tampoco puede descartarse cambios en la respuesta antioxidante de las c3lulas, pues la respuesta puede variar en funci3n del tiempo de exposici3n a agentes oxidantes ¹¹⁷. El sistema NrF2 se activa en consecuencia a un aumento en las especies reactivas de ox3geno lo que conlleva a un aumento de la actividad antioxidante ¹¹⁸. Esta acci3n resulta en un incremento de mol3culas antioxidantes que podr3an conjugarse con el cisplatino e impedir que este produzca su efecto citot3xico. Esto no solo tiene impacto en la conjugaci3n del cisplatino, sino tambi3n podr3a tener consecuencias en transportadores de membrana como MRP1 ¹¹⁹, el cual elimina cisplatino conjugado con glutati3n y puede verse aumentado bajo estas circunstancias.

A pesar de que el sistema NER se encuentre inhibido por acci3n de las PM₁₀ ^{104,120} se puede esperar una compensaci3n celular a trav3s de otros mecanismos de reparaci3n del DNA ¹²¹. Cuando se produce una ruptura de doble cadena los sistemas NHEJ y HR cumplen la funci3n de reparar el da3o ¹²². Se sabe que la exposici3n a PM₁₀ compromete al sistema NHEJ, (Lozoya-Ortiz *et al* 2022, informaci3n preliminar). Adem3s, la exposici3n a PM₁₀ tambi3n disminuye la

actividad del sistema de reparación de DNA MMR ¹²³. Esta condición favorece el desarrollo de quimioresistencia en pacientes con cáncer de pulmón y favorece la evasión de la respuesta citotóxica del cisplatino ^{53,77}. Se desconoce cómo el sistema HR podría actuar reparando aductos voluminosos o rupturas de doble cadena al igual que el sistema NHEJ.

Si bien los resultados obtenidos no permiten hablar de generación de resistencia al cisplatino sí nos demuestran una tendencia de disminución del efecto citotóxico del fármaco, además de un perfil de protección celular. Esta respuesta podría verse favorecida cuando la exposición se hiciera por un mayor tiempo, ya que Merk y colaboradores describieron resistencia a doxorubicina en células BEAS-2B expuestas durante 3 a 5 semanas a PM_{2.5} ⁹⁵. La resistencia a doxorubicina se debió a un aumento de las enzimas antioxidantes además de una disminución en la entrada de doxorubicina a las células, a pesar de que MDR1 no fue el mecanismo encargado de este proceso, debe tenerse en cuenta las diferencias entre las células BEAS-2B y las células A549, ya que las células A549 son derivadas de un adenocarcinoma humano y las BEAS son células epiteliales de pulmón “normales”.

La exposición al humo de tabaco no solamente es un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón sino también genera resistencia al tratamiento antineoplásico ^{124,125}. Considerando que muchos de los componentes del humo del tabaco también se encuentran presentes en el material particulado, no debe ignorarse que sean los responsables en la falla terapéutica en pacientes que nunca fumaron, pero sí viven en zonas de alta contaminación.

Así mismo, los componentes del material particulado han sido relacionados con la generación de resistencia en otros modelos celulares ¹²⁶. El benzo(a)pireno (BaP) incrementa los niveles de la proteína MDR1 y el eflujo de un sustrato fluorescente (Rodamina) en la línea celular CaCo-2 ¹²⁷. Además, la exposición de las células BEAS2B a BaP promueve la transformación de la línea epitelial y la generación de resistencia a doxorubicina ¹²⁸. Finalmente, la exposición prolongada por 3 meses a BaP genera resistencia a los fármacos 5-Fluorouracilo y cisplatino en las líneas celulares CAL27 y SCC9 ¹²⁹.

Es por ello necesario establecer un modelo de exposición más prolongada en donde se evalúen otros mecanismos de resistencia al cisplatino en células A549. Una exposición más prolongada no solo nos ayudaría a observar mejor los efectos de las PM₁₀ sobre la respuesta citotóxica del cisplatino; sino también representaría un modelo más cercano a la realidad de los pacientes, en el cual están expuestos de manera crónica a las PM.

Conclusiones

Con base en nuestros resultados concluimos que la exposición aguda a PM₁₀ no modifica la citotoxicidad del cisplatino, ni los niveles de la proteína transportadora MDR1 en las condiciones y el modelo estudiado de cáncer de pulmón.

Perspectivas

Para comprender el efecto de las PM sobre la citotoxicidad del cisplatino se propone establecer un modelo de exposición crónica en el cual se estudie el impacto de las PM₁₀ sobre la respuesta citotóxica del cisplatino u otros agentes antineoplásicos. Se sugiere evaluar el efecto de las PM sobre otras proteínas de transporte del fármaco (CTR1, MRP1) en dicho modelo, así como el sistema antioxidante y vías de reparación de DNA. Este modelo crónico podría ser un reflejo de la realidad de los pacientes con cáncer de pulmón que viven en zonas altamente contaminadas y podría explicar cómo las PM₁₀ modifican la mortalidad en estos pacientes.

Referencias

1. Sánchez-Pérez, Y. *et al.* DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett.* **278**, 192–200 (2009).
2. Quezada-Maldonado, E. M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y. I. & García-Cuellar, C. M. Airborne particulate matter induces oxidative damage, DNA adduct formation and alterations in DNA repair pathways. *Environ. Pollut.* **287**, (2021).
3. Chirino, Y. I. *et al.* PM10 impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol. Lett.* **193**, 209–216 (2010).
4. Reyes-Zárate, E. *et al.* Atmospheric particulate matter (PM10) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKC ζ and Src kinases in lung cells. *Environ. Pollut.* **214**, 646–656 (2016).
5. OPS/OMS. Calidad del aire - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/calidad-aire> (2016).
6. Landrigan, P. J. Air pollution and health. *Lancet Public Heal.* **2**, e4–e5 (2017).
7. EPA. Criteria Air Pollutants | US EPA. *Criteria Air Pollutants* <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants> (2021).
8. Grzywa-Celińska, A., Krusiński, A. & Milanowski, J. 'Smoging kills' - Effects of air pollution on human respiratory system. *Ann. Agric. Environ. Med.* **27**, 1–5 (2020).
9. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Informe del medio ambiente. *Informe anual del medio ambiente 201* <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/tema/cap5.html> (2015).
10. Rodríguez-Urrego, D. & Rodríguez-Urrego, L. Air quality during the COVID-19: PM2.5 analysis in the 50 most polluted capital cities in the world. *Environ. Pollut.* **266**, 115042 (2020).
11. Polivka, B. J. The Great London Smog of 1952. *Am. J. Nurs.* **118**, 57–61 (2018).
12. Ricker, M., Chávez-Negrete, A., Chong M., B., Fortoul, T. & Torres J., R. Daños a la salud por la contaminación del aire en la ciudad de México, y una propuesta para promover el auto eléctrico. *Investig. Econ.* **59**, 45–75 (1999).
13. Cheriyan, D. & Choi, J. ho. Estimation of particulate matter exposure to construction workers using low-cost dust sensors. *Sustain. Cities Soc.* **59**, 102197 (2020).
14. Zhang, R. *et al.* Formation of Urban Fine Particulate Matter. *Chem. Rev.* **115**, 3803–3855 (2015).

15. OMS. Nueve de cada diez personas de todo el mundo respiran aire contaminado Sin embargo, cada vez hay más países que toman medidas. *Departamento de Salud Pública, Medio Ambiente y Determinantes Sociales de la Salud* 1–5 (2018).
16. Fiordelisi, A. *et al.* The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail. Rev.* **22**, 337–347 (2017).
17. Xu, X. *et al.* Health effects of air pollution on length of respiratory cancer survival. <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/13/800> (2013) doi:10.1186/1471-2458-13-800.
18. Marino, E., Caruso, M., Campagna, D. & Polosa, R. Impact of air quality on lung health: Myth or reality? *Ther. Adv. Chronic Dis.* **6**, 286–298 (2015).
19. IARC. *Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. Press release* vol. 221 391–405 (2013).
20. Bhaskaran, K., Armstrong, B., Wilkinson, P. & Haines, A. Air pollution as a carcinogen. *BMJ* **347**, 1–2 (2013).
21. Thompson, J. E. Airborne Particulate Matter: Human Exposure and Health Effects. *J. Occup. Environ. Med.* **60**, 392–423 (2018).
22. Losacco, C. & Perillo, A. Particulate matter air pollution and respiratory impact on humans and animals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 33901–33910 (2018).
23. Mukherjee, A. & Agrawal, M. A Global Perspective of Fine Particulate Matter Pollution and Its Health Effects. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **244**, 5–51 (2018).
24. Demerjian, K. L. & Mohnen, V. A. Synopsis of the temporal variation of particulate matter composition and size. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **58**, 216–233 (2008).
25. Mugica, V. *et al.* PM composition and source reconciliation in Mexico City. *Atmos. Environ.* **43**, 5068–5074 (2009).
26. Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Rosas, I. & García-Cuellar, C. M. Sampling and composition of airborne particulate matter (PM10) from two locations of Mexico City. *Data Br.* **4**, 353–356 (2015).
27. Anderson, J. O., Thundiyil, J. G. & Stolbach, A. Clearing the air review of the effects of particulate matter.pdf. *Am. Coll. Med. Toxicol.* **8**, 166–175 (2011).
28. Niu, B. Y. *et al.* Effects of DNA Damage and Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to PM 2.5 from Beijing, China, in Winter. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 1–14 (2020).
29. Hamra, G. B. *et al.* Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* **122**, 906–911 (2014).

30. Raaschou-Nielsen, O. *et al.* Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environ. Int.* **87**, 66–73 (2016).
31. Cui, P., Huang, Y., Han, J., Song, F. & Chen, K. Ambient particulate matter and lung cancer incidence and mortality: a meta-analysis of prospective studies. *Eur. J. Public Health* **25**, 324–329 (2015).
32. Uccelli, R. *et al.* Female lung cancer mortality and long-term exposure to particulate matter in Italy. *Eur. J. Public Health* **27**, 178–183 (2017).
33. He, Y. *et al.* Fine particulate matter associated mortality burden of lung cancer in Hebei Province, China. *Thorac. cancer* **9**, 820–826 (2018).
34. Santibáñez-Andrade, M., Quezada-Maldonado, E. M., Osornio-Vargas, Á., Sánchez-Pérez, Y. & García-Cuellar, C. M. Air pollution and genomic instability: The role of particulate matter in lung carcinogenesis. *Environ. Pollut.* **229**, 412–422 (2017).
35. Lovera-Leroux, M. *et al.* The iron component of particulate matter is antiapoptotic: A clue to the development of lung cancer after exposure to atmospheric pollutants? *Biochimie* **118**, 195–206 (2015).
36. Li, J., Li, W. X., Bai, C. & Song, Y. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *Clin. Respir. J.* **11**, 539–546 (2017).
37. Yu, P. *et al.* Cohort studies of long-term exposure to outdoor particulate matter and risks of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Innov.* **2**, 100143 (2021).
38. Bai, N., Khazaei, M., van Eeden, S. F. & Laher, I. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. *Pharmacol. Ther.* **113**, 16–29 (2007).
39. Pope, C. A. *et al.* Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to FineParticulate Air Pollution. *JAMA* **287**, 1132–1141 (2002).
40. Planchard, D. *et al.* Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). . *European Society for Medical Oncology* 1–67
<https://www.esmo.org/content/download/7253/143223/file/ES-Cancer-de-Pulmon-de-Celulas-no-Pequeñas-Guia-para-Pacientes.pdf> (2019).
41. Wong, M. C. S., Lao, X. Q., Ho, K. F., Goggins, W. B. & Tse, S. L. A. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci. Reports* **2017** **7**, 1–9 (2017).
42. de Groot, P. & Munden, R. F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiol. Clin. North Am.* **50**, 863–876 (2012).
43. Rafiemanesh, H. *et al.* Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. *J. Thorac. Dis.* **8**, 1094 (2016).

44. Bade, B. C. & Dela Cruz, C. S. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin. Chest Med.* **41**, 1–24 (2020).
45. Gridelli, C. *et al.* Non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–16 (2015).
46. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
47. Cupp, J. *et al.* Analysis of Factors Associated With In-hospital Mortality in Lung Cancer Chemotherapy Patients With Neutropenia. *Clin. Lung Cancer* **19**, e163–e169 (2018).
48. Salomaa, E. R., Sällinen, S., Hiekkänen, H. & Liippo, K. Delays in the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *Chest* **128**, 2282–2288 (2005).
49. Aprile, G. *et al.* The Clinical Value of Nutritional Care before and during Active Cancer Treatment. *Nutrients* **13**, (2021).
50. Cohen, A. J. *et al.* Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet* **389**, 1907–1918 (2017).
51. Mu, L. *et al.* Indoor air pollution and risk of lung cancer among Chinese female non-smokers. *Cancer Causes Control* **24**, 439–450 (2013).
52. Tumors, S. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. **83**, 584–594 (2008).
53. Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E. & Wu, Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**, 3–11 (2005).
54. Torigoe, T. *et al.* Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **5**, 15–27 (2005).
55. Galluzzi, L. *et al.* Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death and Disease* vol. 5 (2014).
56. Chen, S. H. & Chang, J. Y. New insights into mechanisms of cisplatin resistance: From tumor cell to microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
57. Amable, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol. Res.* **106**, 27–36 (2016).
58. Ramón-López, A., Escudero-Ortiz, V., Carbonell, V., Pérez-Ruixo, J. J. & Valenzuela, B. Farmacocinética poblacional de cisplatino aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farm. Hosp.* **36**, 392–402 (2012).
59. Ciarimboli, G. Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects.

- Scientifica (Cairo)*. **2012**, 1–18 (2012).
60. Luqmani, Y. A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* **14**, 35–48 (2005).
 61. Lin, X., Okuda, T., Holzer, A. & Howell, S. B. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1154–1159 (2002).
 62. Blair, B. G., Larson, C., Safaei, R. & Howell, S. B. Copper Transporter 2 Regulates the Cellular Accumulation and Cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4312–4321 (2009).
 63. Hall, M. D., Okabe, M., Shen, D. W., Liang, X. J. & Gottesman, M. M. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 48 495–535 (2008).
 64. Rockwell, N. C. Multidrug Resistance Membrane Proteins. *Encycl. Biol. Chem. Second Ed.* 210–214 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00215-2.
 65. Huang, D. *et al.* A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene* 1–11 (2021) doi:10.1038/s41388-021-02055-2.
 66. Inoue, Y. *et al.* Association of ATP7A expression and in vitro sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **1**, 837–840 (2010).
 67. Taniguchi, K. *et al.* A Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (cMOAT) Gene Is Overexpressed in Cisplatin-resistant Human Cancer Cell Lines with Decreased Drug Accumulation. *Cancer Res.* **56**, (1996).
 68. Kool, M. *et al.* Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **57**, (1997).
 69. Hu, Y., Cui, J., Jin, L., Su, Y. & Zhang, X. LRPPRC contributes to the cisplatin resistance of lung cancer cells by regulating MDR1 expression. *Oncol. Rep.* **45**, 1–1 (2021).
 70. Tsuruo, T. *et al.* Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* **94**, 15–21 (2003).
 71. Katayama, K., Noguchi, K. & Sugimoto, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. (2014) doi:10.1155/2014/476974.
 72. Choudhuri, S. & Klaassen, C. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *International Journal of Toxicology* vol. 25 231–259 (2006).
 73. Surowiak, P. *et al.* Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase

- pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Arch. 2005 4473* **447**, 626–633 (2005).
74. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
 75. Stead, E. R. & Bjedov, I. Balancing DNA repair to prevent ageing and cancer. *Exp. Cell Res.* **405**, (2021).
 76. Woźniak, K. & Błasiak, J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim. Pol.* **49**, 583–596 (2002).
 77. Aebi, S. *et al.* Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. *Cancer Res.* **56**, (1996).
 78. Rosell, R., Lord, R. V. N., Taron, M. & Reguart, N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **38**, 217–227 (2002).
 79. Spivak, G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst)*. **36**, 13–18 (2015).
 80. Cubukcu, E. *et al.* Immunohistochemical expression of excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) in non-small-cell lung cancer: Implications for patient outcome. *Clin. Transl. Oncol.* **13**, 826–830 (2011).
 81. Ulker, M., Duman, B. B., Sahin, B. & Gumurdulu, D. ERCC1 and RRM1 as a predictive parameter for non-small cell lung, ovarian or pancreas cancer treated with cisplatin and/or gemcitabine. *Contemp. Oncol.* **19**, 207 (2015).
 82. Li, J. *et al.* Chronic effects of high fine particulate matter exposure on lung cancer in China. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **202**, 1551–1559 (2020).
 83. 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).
 84. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. & Boffetta, P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur. Respir. J.* **48**, 889–902 (2016).
 85. Wang, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1459–1544 (2016).
 86. Raaschou-Nielsen, O. *et al.* Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* **14**, 813–822 (2013).
 87. Eckel, S. P. *et al.* Air pollution affects lung cancer survival. *Thorax* **71**, 891–898 (2016).

88. SEDEMA. *Calidad del aire en la Ciudad de México. Informe 2019. Dirección General de Calidad del Aire* vol. 119 (2022).
89. Quezada-Maldonado, E. M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F. & García-Cuellar, C. M. miRNAs deregulation in lung cells exposed to airborne particulate matter (PM10) is associated with pathways deregulated in lung tumors. *Environ. Pollut.* **241**, 351–358 (2018).
90. Bastonini, E. *et al.* Transcriptional modulation of a human monocytic cell line exposed to PM10 from an urban area. *Environ. Res.* **111**, 765–774 (2011).
91. Arrieta, O. & Lazcano, E. [Lung cancer. Epidemiology, diagnosis and treatment]. *Salud Publica Mex.* **61**, 217–218 (2019).
92. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. & Kyrodimos, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin. Exp. Metastasis* 2018 354 **35**, 309–318 (2018).
93. Wang, X., Zhang, H. & Chen, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer drug Resist. (Alhambra, Calif.)* **2**, 141 (2019).
94. Ramos, P. & Bentires-Alj, M. Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene* 2015 3428 **34**, 3617–3626 (2014).
95. Merk, R. *et al.* Particulate matter (Pm2.5) from biomass combustion induces an anti-oxidative response and cancer drug resistance in human bronchial epithelial beas-2b cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 1–22 (2020).
96. Oshikata, A., Matsushita, T. & Ueoka, R. Enhancement of drug efflux activity via MDR1 protein by spheroid culture of human hepatic cancer cells. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 590–593 (2011).
97. Shi, S. *et al.* ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **35**, 2606–2614 (2016).
98. Barr, M. P. *et al.* Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature. *PLoS One* **8**, e54193 (2013).
99. Chirino, Y. I. *et al.* Airborne particulate matter in vitro exposure induces cytoskeleton remodeling through activation of the ROCK-MYPT1-MLC pathway in A549 epithelial lung cells. *Toxicol. Lett.* **272**, 29–37 (2017).
100. Michael, S., Montag, M. & Dott, W. Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter. *Environ. Pollut.* **183**, 19–29 (2013).
101. García-Cuellar, C. M. *et al.* Particulate matter (PM10) promotes cell invasion through

- epithelial–mesenchymal transition (EMT) by TGF- β activation in A549 lung cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12632 (2021).
102. Kumar, N., Afjei, R., Massoud, T. F. & Paulmurugan, R. Comparison of cell-based assays to quantify treatment effects of anticancer drugs identifies a new application for Bodipy-L-cystine to measure apoptosis. *Sci. Rep.* **8**, 16363 (2018).
 103. Alfaro-Moreno, E. *et al.* Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ. Health Perspect.* **110**, 715–720 (2002).
 104. Quezada-Maldonado, E. M. *et al.* Nucleotide Excision Repair Pathway Activity Is Inhibited by Airborne Particulate Matter (PM10) through XPA Deregulation in Lung Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2224 (2022).
 105. Huang, R. S., Murry, D. J. & Foster, D. R. Role of xenobiotic efflux transporters in resistance to vincristine. *Biomed. Pharmacother.* **62**, 59–64 (2008).
 106. Kolesnikova, M. *et al.* Clinical and prognostic significance of cell sensitivity to chemotherapy detected in vitro on treatment response and survival of leukemia patients. *J. Pers. Med.* **9**, (2019).
 107. Katayama, K., Noguchi, K. & Sugimoto, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New J. Sci.* **2014**, 1–10 (2014).
 108. Zou, F. *et al.* Prognostic significance of ABCB1 in stage I lung adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* **14**, 313–321 (2017).
 109. Abdin, S. M., Tolba, M. F., Zaher, D. M. & Omar, H. A. Nuclear factor- κ B signaling inhibitors revert multidrug-resistance in breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **340**, 109450 (2021).
 110. Sun, Y. *et al.* HIF-1 α /MDR1 pathway confers chemoresistance to cisplatin in bladder cancer. *Oncol. Rep.* **35**, 1549–1556 (2016).
 111. Chan, Y. Y., Kalpana, S., Chang, W. C., Chang, W. C. & Chen, B. K. Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Enhances Cisplatin Resistance by Upregulating MDR1 Expression in Cancer Cells. *Mol. Pharmacol.* **84**, 591–602 (2013).
 112. Xu, M. X. *et al.* Activated iRhom2 drives prolonged PM2.5 exposure-triggered renal injury in Nrf2-defective mice. *Nanotoxicology* **12**, 1045–1067 (2018).
 113. Park, E. J. *et al.* Effect of PM10 on pulmonary immune response and fetus development. *Toxicol. Lett.* **339**, 1–11 (2021).
 114. Chen, K. G. & Sikic, B. I. Molecular pathways: Regulation and therapeutic implications of multidrug resistance. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1863–1869 (2012).
 115. Rupp, J. C. *et al.* Host Cell Copper Transporters CTR1 and ATP7A are important for

- Influenza A virus replication. *Virology*. **14**, 1–12 (2017).
116. Ciarimboli, G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res.* **34**, 547–550 (2014).
 117. Zimta, A. A. *et al.* The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 118. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A. & Donato, R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **1865**, 721–733 (2018).
 119. Yin, J. & Zhang, J. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban* **36**, 927–938 (2011).
 120. Mehta, M., Chen, L. C., Gordon, T., Rom, W. & Tang, M. shong. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **657**, 116–121 (2008).
 121. Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. & Sharma, R. A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 193–204 (2008).
 122. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495–506 (2017).
 123. Monroy Bordon, P. E. & García-Cuellar, C. M. EFECTO DIFERENCIAL DE PM10 COLECTADAS EN DOS AÑOS DISTINTOS EN LA CIUDAD DE MÉXICO SOBRE LOS NIVELES Y CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE HSMH6, HSMH2 Y HMLH1 DE LA VÍA DE REPARACIÓN DE BASES MAL APAREADAS. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2020).
 124. Bergman, M. *et al.* Effect of Smoking on Treatment Efficacy and Toxicity in Patients with Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. **14**, 1–13 (2022).
 125. An, Y. *et al.* Cigarette Smoke Promotes Drug Resistance and Expansion of Cancer Stem Cell-Like Side Population. *PLoS One* **7**, (2012).
 126. Lagunas-Rangel, F. A., Liu, W. & Schiöth, H. B. Can Exposure to Environmental Pollutants Be Associated with Less Effective Chemotherapy in Cancer Patients? *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 19 2064 (2022).
 127. Sugihara, N. *et al.* Effect of benzo[a]pyrene on P-glycoprotein-mediated transport in Caco-2 cell monolayer. *Toxicology* **223**, 156–165 (2006).
 128. Liu, Y. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1A1 up-regulates stem cell markers in benzo[a]pyrene-induced malignant transformation of BEAS-2B cells. *Environ. Toxicol.*

Pharmacol. **45**, 241–250 (2016).

129. Huang, L. *et al.* Benzo[a]pyrene promotes progression in tongue squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* **26**, 1649–1658 (2020).