



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

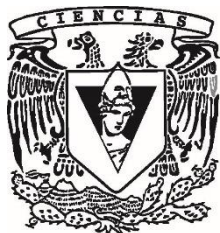
**EL MATERIAL PARTICULADO (PM₁₀) ALTERA LOS
NIVELES DE BRCA1 Y CTCF VÍA AHR EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

YANUEH ACITLALI BAUTISTA OCAMPO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. (2018)**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Bautista
Ocampo
Yanueh Acitlali
0457771435543
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
414004724
2. Datos del tutor
Dra.
Yesennia
Sánchez
Pérez
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Ernesto
Soto
Reyes Solis
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Miguel
Santibáñez
Andrade
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Yolanda Irasema
Chirino
López
6. Datos del sinodal 4
Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte
7. Datos del trabajo escrito
El material particulado (PM₁₀) altera los niveles de BRCA1 y CTCF vía AHR en células de cáncer de mama
68 p
2018

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme formado como bióloga.

A los miembros del jurado: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, Dr. Miguel Santibáñez Andrade, Dra. Yolanda Irasema Chirino López y Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por sus observaciones sobre el presente trabajo.

Al Instituto Nacional de Cancerología y a todos los miembros de los laboratorios 2 y 4 del INCan.

A mi tutora, la Dra. Yesennia Sánchez Pérez, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su guía y apoyo en la elaboración de este trabajo.

A mis padres, por darme la mejor educación posible y permitirme estudiar en otra ciudad, por su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanas Zuluay y Andoreni, por su apoyo, compañía y amor infinito. Las amo.

A Eduardo, por ser parte de este camino, por crecer a mi lado, por siempre darme ánimos y muchos apapachos. Te amo.

A mis amigos del laboratorio: Carlos, Marel, Ana, Miguel, Pablo y Abner, por su amistad y ayuda, por las innumerables carcajadas, los consejos y las palabras de aliento, los quiero mucho.

A mis amigos: Michel, Marlene, Renata y Rodrigo, que a pesar de la distancia nuestra amistad sigue intacta, siempre los voy a querer.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
Contaminación del aire	8
Material Particulado (PM)	9
PMs y efectos en la salud del ser humano	10
Evidencia toxicológica del efecto de las PMs a nivel celular	13
Activación del AHR	14
Cáncer de mama	16
BRCA1	18
Regulación epigenética	20
Regulación epigenética de BRCA1	22
CTCF	24
JUSTIFICACIÓN	26
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
Muestreo de PM ₁₀	28
Cultivo celular	28
Exposición de las células a PM ₁₀	29
Transfección de siRNAs	29
Extracción de RNA	30
Determinación de la expresión de AHR mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)	31
Localización subcelular de CTCF y BRCA1 por Inmunofluorescencia	32
Determinación de AHR, BRCA1 y CTCF por western blot	33
Análisis estadístico	34
Ensayo <i>in silico</i> de los sitios de unión de CTCF en el promotor de BRCA1	35
Ensayo <i>in silico</i> de los patrones de metilación en diferentes líneas celulares	36
RESULTADOS	37
El material particulado PM ₁₀ aumenta los niveles de AHR	37

El material particulado disminuye los niveles de BRCA1	39
El promotor de BRCA1 contiene un sitio de unión a CTCF	41
El material particulado PM ₁₀ disminuye los niveles de CTCF.....	43
Análisis <i>in silico</i> del estado de metilación del gen BRCA1 en líneas celulares de mama	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS	53
REFERENCIAS	54

RESUMEN

Introducción: Las PM₁₀ son aeropartículas contaminantes con un diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$, y son una mezcla compleja de materiales líquidos y sólidos suspendidos en el aire, entre los que se encuentran metales de transición, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), entre otros. Estudios epidemiológicos han asociado la exposición a PMs como un factor de riesgo en el desarrollo de neoplasias, entre ellas el cáncer de mama. Sin embargo, se desconocen los mecanismos celulares a través de los cuales las PM favorecen el desarrollo de esta neoplasia. En algunos casos de cáncer de mama esporádico se ha reportado una disminución tanto del mRNA como de la proteína de BRCA1, debido a que el promotor del gen se encuentra metilado. Se sabe que el receptor de aril hidrocarburos (AHR), receptor encargado de la señalización para el metabolismo de los HAPs, puede favorecer la metilación del gen de *BRCA1*. El mecanismo propuesto es que cuando se activa el AHR por la unión del receptor con xenobióticos como los HAPs (componentes de las PMs), este complejo se une a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) presentes en el gen de *BRCA1*, lo que favorece la metilación de su promotor y de esta manera regula negativamente su transcripción. En este sentido, el factor de unión CTCCC (CTCF) participa en la regulación de la metilación de ciertos genes, entre ellos *BRCA1*. CTCF forma fronteras que protegen la región promotora impidiendo su metilación. Actualmente se desconoce si las PM₁₀ disminuyen los niveles de BRCA1 por el desplazamiento de la proteína CTCF de sus sitios de unión a través de la activación del AHR en células de cáncer de mama.

Objetivo: Determinar la participación del AHR en la disminución de los niveles de las proteínas BRCA1 y CTCF en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a PM₁₀.

Material y Métodos: Se utilizaron células MCF7, las cuales fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM₁₀ por 24 horas. Se evaluó la expresión del mRNA de AHR por qRT-PCR y los niveles de proteína por western blot. Se evaluaron los niveles de proteínas de CTCF y BRCA1 mediante western blot y la localización celular por

inmunofluorescencia. Para determinar la participación del AHR, se inhibió la expresión del AHR mediante un siRNA.

Resultados: Las PMs inducen el aumento del mensajero ($***p < 0.0005$ vs Control) y de la proteína ($*p < 0.05$ vs Control) de AHR. La exposición a PM_{10} disminuye los niveles de la proteína de BRCA1 ($*** p < 0.0005$ vs Control) y este efecto no es prevenido cuando se inhibe la expresión del AHR mediante un siRNA dirigido contra su mRNA. Las PM_{10} , disminuyen los niveles de CTCF ($**p < 0.005$ vs Control), esto se ve prevenido cuando se inhibe la expresión del AHR ($*p < 0.05$ vs PM_{10}).

Conclusiones: Las PM_{10} , promueven la disminución de los niveles de BRCA1 y CTCF e incrementan los niveles del AHR. La inhibición del mensajero de AHR previene la disminución de los niveles de CTCF, sugiriendo la participación de AHR en la regulación de BRCA1 de manera indirecta.

INTRODUCCIÓN

Contaminación del aire

La atmósfera de la Tierra está constituida primordialmente por tres gases: nitrógeno (78.08%), oxígeno (20.95%) y argón (0.93%). El vapor de agua es el siguiente constituyente más abundante de la atmósfera y su concentración es muy variable, siendo la evaporación y la precipitación lo que controlan su abundancia, además contiene una mezcla de gases traza que representan menos del 1% de la atmósfera (Barry et al., 2003; Seinfeld and Pandis, 2016).

La alteración en la composición normal del aire se conoce como contaminación del aire, y esta se define como la presencia de compuestos en fase líquida, sólida o gaseosa a concentraciones por encima de sus niveles ambientales normales, que pueden producir un efecto adverso en los humanos, animales y plantas (Seinfeld and Pandis, 2016). Los contaminantes del aire son emitidos a la atmósfera como contaminantes primarios, o son formados dentro de la atmósfera, y esto son llamados contaminantes secundarios. Los contaminantes pueden provenir de fuentes naturales como la erosión del suelo, incendios forestales, erupciones volcánicas, aerosoles marinos, etc., o bien, de fuentes antropogénicas como la quema de combustibles fósiles, emisiones vehiculares, procesos industriales y agrícolas, generación de energía, incendios provocados, etc. (Jacobson, 2002; U.S. EPA., 2004; WHO, 2006), siendo ésta última la principal fuente de contaminación del aire.

Debido a que la contaminación del aire representa un riesgo para la salud de los humanos y el medio ambiente, se han establecido acciones para evaluar la calidad del aire, lo cual se hace a través de la evaluación de seis contaminantes denominados "criterio" que son: dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO_2), ozono (O_3), plomo (Pb) y material particulado (PM) (US EPA, 2016). Para la evaluación de la calidad del aire se han establecido valores de referencia de cada uno de estos contaminantes. En México, los estándares se encuentran publicados en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), en el que se establecen los límites permisibles de los contaminantes criterio. De igual manera, la

Organización Mundial de la Salud (OMS) mediante las Guías de Calidad del Aire establece los límites permisibles de los contaminantes criterio ((WHO, 2006). Si bien, estos seis contaminantes representan un riesgo para la salud de los humanos, es del interés de este trabajo, el estudio de las PMs, ya que son consideradas un factor de riesgo en el desarrollo del cáncer de pulmón (Pope et al., 2002).

Material Particulado (PM)

Las PMs se clasifican de acuerdo con su diámetro aerodinámico de la siguiente manera: Las partículas suspendidas totales (PST), las cuales tienen un diámetro mayor a $50\ \mu\text{m}$, las PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ con un diámetro aerodinámico menor o igual a 10 y $2.5\ \mu\text{m}$, respectivamente; y las partículas ultra finas (UF), con un diámetro aerodinámico menor de $0.1\ \mu\text{m}$ (Figura 1).

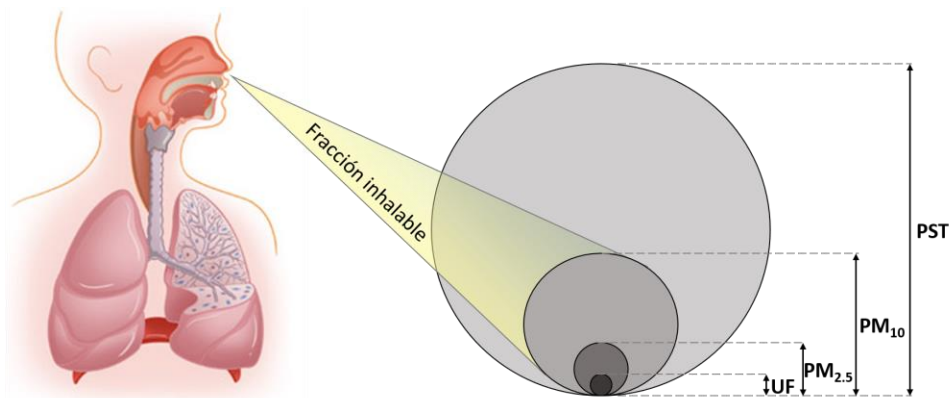


Figura 1. Clasificación de las PMs de acuerdo con su diámetro aerodinámico

El material particulado se divide en partículas suspendidas totales (PST), partículas con diámetro aerodinámico menor o igual a 10 y $2.5\ \mu\text{m}$ (PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, respectivamente) y partículas ultra finas (UF), como se muestra en la imagen las fracciones comprenden a las más pequeñas; es decir, UF son parte de $\text{PM}_{2.5}$, que a su vez son parte de PM_{10} . Las PM_{10} son conocidas como la fracción inhalable pues son capaces de ingresar a las vías respiratorias profundas. Tomada y modificada de García-García, 2014 (tesis de licenciatura).

El diámetro aerodinámico es igual al diámetro de una partícula hipotética esférica de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de sedimentación gravitacional que la partícula en cuestión, independientemente de su tamaño, forma o densidad (U.S. EPA., 2004). Este es un parámetro importante para determinar las propiedades, los efectos y el destino de las partículas atmosféricas; así como los patrones de deposición de las partículas dentro del tracto respiratorio, con lo que se ha podido determinar que las fracciones con diámetro aerodinámico menor o

igual $\leq 10 \mu\text{m}$ pueden alcanzar las vías profundas del sistema respiratorio y depositarse a lo largo del tracto respiratorio, por lo que esta fracción es conocida como fracción inhalable, razón por la cual puede inducir efectos adversos en la salud de los humanos (Brown et al., 2013; Kim et al., 2015; Löndahl et al., 2006).

Las PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, son una mezcla compleja de partículas sólidas y líquidas suspendidas en el aire. La composición de las PMs varía y depende de su tamaño, así como de su origen, ya sea natural o antropogénico. Entre sus componentes principales se encuentran: carbono orgánico y elemental, compuestos inorgánicos como sulfatos, nitratos y amonio, minerales originarios de la corteza terrestre, aerosoles marinos, componentes de origen biológico como el polen, esporas, endotoxina, hongos y bacterias; metales, como metales de transición, y compuestos orgánicos como los compuestos orgánicos volátiles (COVs), aminas aromáticas, dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), entre otros (Chirino et al., 2015; Falcon-Rodriguez et al., 2016; IARC, 2016; Kelly and Fussell, 2012; U.S. EPA., 2004).

PMs y efectos en la salud del ser humano

Estudios epidemiológicos han demostrado asociaciones entre la exposición a partículas contaminantes del aire como la fuente de diversas alteraciones a la salud del ser humano, entre ellas las enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cerebrovasculares. También se ha demostrado que existe una asociación entre el aumento de los niveles de PMs con un incremento del 12.8% en admisiones hospitalarias debido a enfermedades respiratorias y cardiovasculares por cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PM_{10} (Bourdrel et al., 2017; Brook, 2004; Brunekreef and Forsberg, 2005; Ferreira et al., 2016; Kloog et al., 2012; Pope, 2000). Entre estos efectos se encuentra la exacerbación de enfermedades de las vías respiratorias en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y asma (Atkinson et al., 2001; Tecer et al., 2008); así como por enfermedades cardiovasculares como la enfermedad cerebrovascular (Huang et al., 2016; Shah et al., 2015), aterosclerosis (Künzli et al., 2004), infarto al miocardio (Mustafić et al., 2012) e insuficiencia cardíaca (Shah et al., 2013). Además, la exposición a PMs se ha

asociado con un incremento en la tasa de mortalidad total del 0.6-0.8% y 4% por enfermedades respiratorias y cardiovasculares por cada incremento de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, respectivamente (Bourdrel et al., 2017; Pope and Dockery, 2006; Pope et al., 2002; Samoli et al., 2008).

En el año 2013 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a la contaminación extramuros, incluyendo las PMs, dentro del Grupo 1; esto es, como un carcinógeno para el ser humano. Esto se logró mediante la revisión de evidencia científica que incluye estudios epidemiológicos, estudios en animales experimentales y estudios sobre los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de cáncer, determinando así que existe evidencia suficiente de la carcinogenicidad de la contaminación del aire en humanos y modelos animales (IARC, 2016; Loomis et al., 2013).

Está demostrado que las PMs son un factor de riesgo en el desarrollo de distintas neoplasias entre las que destacan: cáncer de pulmón (Pope et al., 2002), cáncer de vejiga (Castano-Vinyals et al., 2008) y cáncer de mama (Bonner et al., 2005; Nie et al., 2007).

En cáncer de pulmón, se ha reportado que por cada incremento de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ y de PM_{10} , hay un aumento del 8% y 6% de riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón, respectivamente (Chen et al., 2016; Pope et al., 2002). En cáncer de vejiga, se asociaron niveles altos de emisiones de componentes de las partículas con un incremento del 29% de riesgo para cáncer de vejiga (Castano-Vinyals et al., 2008). Con respecto al cáncer de mama (Tabla 1), se ha encontrado asociado con la exposición a contaminantes ambientales, como los HAPs, los cuales se encuentran en las PM del aire de zonas urbanas, industrializadas y con tráfico vehicular intenso (Bonner et al., 2005; Huo et al., 2013; Mordukhovich et al., 2015; Nie et al., 2007; Parikh and Wei, 2016). Además, los estudios epidemiológicos señalan que la exposición a altos niveles de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ están asociados con un mayor riesgo de muerte por cáncer de mama (Hu et al., 2013; Hung, 2012; Tagliabue et al., 2016).

Tabla 1. Estudios epidemiológicos que asocian la exposición a PMs y el cáncer de mama

Autor	Asociación encontrada
Bonner et al., 2005	En los primeros años de vida de la mujer, por cada aumento de 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PST, aumenta un 20% el riesgo de cáncer de mama post menopáusico.
Nie et al., 2007	Una alta exposición a emisiones de tráfico en etapas tempranas de la vida incrementa el riesgo de cáncer de mama.
Hung, 2012	Las mujeres que viven en localidades con altas concentraciones de $\text{PM}_{2.5}$ tienen un mayor riesgo de mortalidad por cáncer de mama.
Hu et al., 2013	Por cada aumento de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$, respectivamente, aumenta el riesgo en 13% y 83% de mortalidad por cáncer de mama, respectivamente.
Huo et al., 2013	La exposición a largo plazo con contaminantes del aire se asocia con un fenotipo invasivo del cáncer de mama.
Mordukhovich et al., 2015	La exposición a HAPs provenientes del tráfico vehicular está asociada con un aumento en la incidencia de cáncer de mama.
Parikh y Wei, 2016	La exposición a $\text{PM}_{2.5}$ y HAPs está asociado con un incremento en la incidencia de cáncer de mama.
Tagliabue et al., 2016	El estudio indica que el riesgo de mortalidad por cáncer de mama incrementa con la exposición a $\text{PM}_{2.5}$.

Evidencia toxicológica del efecto de las PMs a nivel celular

La evidencia toxicológica sugiere mecanismos moleculares asociados a la exposición a PMs, en la que se han buscado responder las preguntas sobre qué mecanismos se desencadenan en la célula y su participación en el desarrollo del cáncer. Por lo que ha sido estudiada la relación entre la composición y tamaño de las PMs y la toxicidad celular resultante (Alfaro-Moreno et al., 2002; Osornio-Vargas et al., 2003; Rosas Pérez et al., 2007).

La exposición a PMs genera estrés especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chirino et al., 2010), como los radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), los cuales son altamente reactivos induciendo daño al DNA (García-Cuellar et al., 2002), como rompimiento de doble cadena, oxidación de bases nitrogenadas formando 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) (Knaapen et al., 2002), y a través de la lipoperoxidación donde sus productos finales pueden reaccionar con las bases del DNA formando aductos exocíclicos (Donaldson et al., 2003; Topinka et al., 2011). Esto finalmente provocando apoptosis (Upadhyay et al., 2003) o un estado de tipo senescencia (Sánchez-Pérez et al., 2009).

Además, el estrés oxidante está implicado en los efectos inflamatorios inducidos por las PMs, mediante la inducción de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 β (IL-1 β), y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Alfaro-Moreno et al., 2009; van Eeden et al., 2001; Li et al., 2015b; Manzano-León et al., 2013, 2015; Osornio-Vargas et al., 2003; Salcido-Neyoy et al., 2015). Las ROS inducidas por las PMs, también incrementan el calcio intracelular que conlleva a la activación y fosforilación de las proteínas de la familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK), entre las que se encuentran la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), quinasa c-Jun N-terminal (JNK), quinasa p38, entre otras (Cao et al., 2016; Rui et al., 2016). También se conoce que las PM₁₀ inducen la activación de los miembros de la familia MAPK provocando la transactivación de factores de transcripción como c-Jun, Factor activador 2 (ATF2) y la proteína de unión a CREB (CBP) (Donaldson et al., 2003), esto resulta finalmente en la remodelación de la cromatina y expresión de genes involucrados en inflamación, apoptosis,

proliferación, transformación y diferenciación, metabolismo de xenobióticos y componente endógenos (Donaldson et al., 2003; Líbalová et al., 2014). Uno de los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo el metabolismo de xenobióticos es mediante la vía del receptor de aril hidrocarburos (AHR).

Activación del AHR

Posterior a la exposición a PMs en la célula ocurre la activación metabólica con el incremento de proteínas pertenecientes a la familia de los citocromos P450 (CYP450), proteínas involucradas en la fase I del metabolismo de xenobióticos. Los citocromos CYP1A1 y CYP1B1 se encargan de la bioactivación de los HAPs, presentes en las PMs, a carcinógenos diol-epóxidos (Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004), en un efecto mediado por la activación del AHR. En diversos trabajos se ha reportado el aumento de estas proteínas en células epiteliales de pulmón y de mama expuestas a PM₁₀ y PM_{2.5}, además se ha demostrado su impacto al favorecer daño a DNA: los metabolitos carcinógenos resultantes provenientes de los HAPs son capaces de unirse covalentemente al DNA formando aductos, generando así un daño genotóxico en la célula (Billet et al., 2007; Borgie et al., 2015; Chen et al., 2013; Courter et al., 2007a; Líbalová et al., 2014; Mahadevan et al., 2005; Salcido-Neyoy et al., 2015).

El AHR es un factor de transcripción ligando dependiente, perteneciente a la familia de los factores de transcripción con dominio bHLH-PAS (basic helix loop helix-PER ARNT-SIM), que regula la expresión de diversos genes. La proteína de AHR tiene tres dominios funcionales: el dominio bHLH localizado en el extremo amino terminal es el encargado de la unión del AHR en el DNA, específicamente en las secuencias consenso (5-T/GCGTG-3) conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos (XREs, por sus siglas en inglés) y junto con el dominio PAS (conformado por PAS A y PAS B), permite la interacción con otras proteínas y la formación del heterodímero junto con el translocador nuclear de AHR (ARNT), además contiene un dominio Q que permite su transactivación (Feng et al., 2013; Kawajiri and Fujii-Kuriyama, 2017).

La activación del AHR está mediada por la unión de un ligando, principalmente xenobióticos, de naturaleza hidrofóbica y con estructura plana, como los HAPs. El receptor inactivo se encuentra en el citoplasma formando un complejo proteico junto con las chaperonas: dos proteínas de choque térmico 90 (HSP90), la proteína de interacción con HSP90 (p21) y con la proteína de interacción con AHR parecida a la inmunofilina (AIP, también conocida como XAP2); la unión con el ligando resulta en la translocación nuclear del AHR, la disociación del complejo de chaperonas, seguida de la heterodimerización del complejo AHR/ARNT (Dietrich and Kaina, 2010). El complejo formado es capaz de unirse a los XREs, favoreciendo la remodelación de la cromatina y el reclutamiento de co-activadores para la transcripción de los genes blanco encargados de la detoxificación y metabolismo de xenobióticos, entre ellos se encuentran los que codifican para las proteínas CYP1A1, CYP1B1, glutatión S-transferasas (GST), UDP-glucuronosil transferasa (UGT1A6), NAD(P)H dependiente de quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), la aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1), entre otras (Feng et al., 2013). La vía anteriormente descrita se conoce como la vía canónica de señalización del AHR (Figura 2); sin embargo, también se han encontrado vías no canónicas de la activación del receptor que participan en la iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis (Dietrich and Kaina, 2010).

Mucho de los efectos tóxicos y carcinogénicos de los contaminantes del aire han sido ligados a los HAPs, componentes de las PMs. En modelos animales se encontró que los HAPs debido a su carácter lipofílico pueden llegar y almacenarse en el tejido adiposo mamario (Bock and Dao, 1961; Korsh et al., 2015; Morris and Seifter, 1992), ahí son transformados a metabolitos carcinogénicos (Bartley et al., 1982) que favorecen la carcinogénesis en las células ductales de la mama, a través del daño a DNA (Morris and Seifter, 1992) con la generación de aductos (Li et al., 1996), por la disrupción en la expresión de BRCA1 (Jeffy et al., 1999), y por cambios en la metilación del DNA global y localizada en promotores de genes (White et al., 2016) entre ellos *BRCA1* (Hockings et al., 2006).

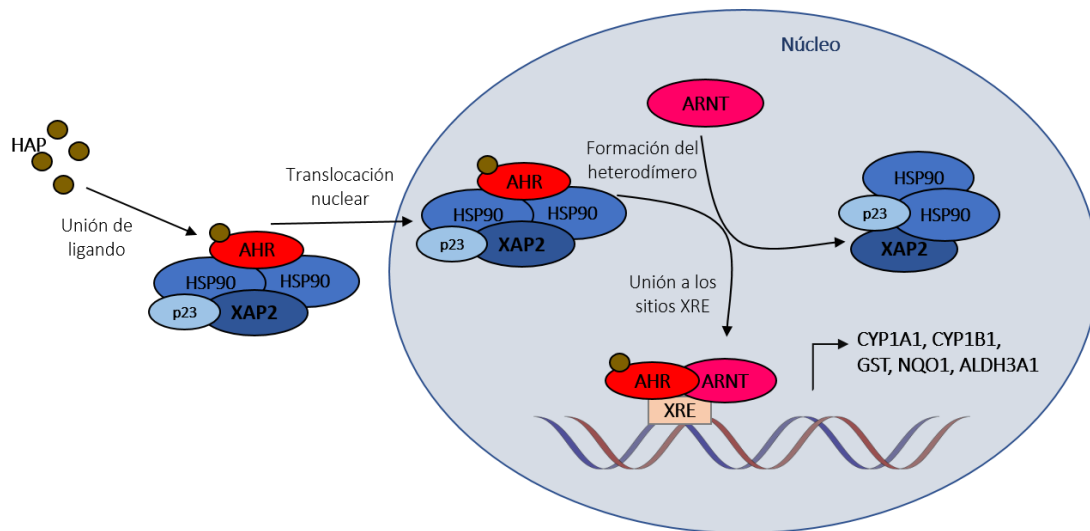


Figura 2. Vía canónica de señalización del receptor aril hidrocarburos (AHR)

El AHR inactivo se encuentra formando un complejo citoplasmático junto con dos proteínas de choque térmico 90 (HSP90), la proteína de interacción con HSP90 (p21) y con la proteína de interacción con AHR parecida a la inmunofilina (XAP2), la unión con el ligando resulta en la translocación nuclear del AHR, la disociación del complejo de chaperonas, seguida de la heterodimerización del complejo AHR/ARNT. El complejo formado es capaz de unirse a los XREs, activando la transcripción de genes encargados de la detoxificación, entre ellos los que codifican para los citocromos P450: CYP1A1, CYP1B1, glutatión S-transferasas (GST), NAD(P)H dependiente de quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1), entre otras.

Cáncer de mama

Si bien la evidencia epidemiológica y toxicológica demuestra que las PMs favorecen principalmente el desarrollo de cáncer de pulmón, actualmente estudios epidemiológicos (Tabla 1) demuestran que las PMs pueden favorecer el desarrollo de cáncer de mama; por lo que en este trabajo nos interesó esta neoplasia ya que su incidencia va en aumento en países en desarrollo (Fidler et al., 2017).

A nivel mundial, el cáncer de mama ocupa el segundo lugar de incidencia, en ambos sexos, y el primer lugar de incidencia en la población femenina. Además, ocupa el quinto lugar, en ambos casos como causa de muerte entre todos los tipos de cánceres y en mujeres, el primer lugar (GLOBOCAN, 2012). En países no desarrollados, la mortalidad asociada a esta neoplasia es muy alta, representando el 55% de las muertes por cáncer (Porter, 2008). En México, la tasa de mortalidad ha aumentado en las últimas décadas, y para el 2006 se convirtió en la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (Chávarri-Guerra et al., 2012). Siendo, la incidencia del cáncer de mama del 24.8% y la mortalidad del

14.2%, de todos los tipos de cáncer (GLOBOCAN, 2012). Para el 2020, el GLOBOCAN estima un incremento en ambas tasas, con 27,410 nuevos casos diagnosticados y 7,761 muertes por esta neoplasia (GLOBOCAN, 2012).

Entre los factores de riesgo conocidos hasta el momento para el desarrollo de cáncer de mama se encuentran los que son intrínsecos de la mujer, como la edad, menarca temprana, menopausia tardía, nuliparidad, edad del primer parto y periodo largo de lactancia (McPherson et al., 2000). También existen los factores de exposición a hormonas exógenas y endógenas, como el estrógeno, estradiol y la terapia de reemplazo hormonal (Henderson and Feigelson, 2000). Además, los factores de riesgo de historia familiar predisponen genéticamente al individuo a mutaciones, como es el caso de mutaciones en los genes de susceptibilidad de cáncer de mama (*BRCA1* y *BRCA2*), que se asocian con el inicio temprano de cáncer de mama (Henderson and Feigelson, 2000). Por otro lado, existen factores ambientales asociados al desarrollo de esta neoplasia, como son los relacionados al estilo de vida, tal como el alto índice de masa corporal (sobrepeso u obesidad), sedentarismo, dieta, alcohol y tabaco (Irigaray et al., 2007; Khan et al., 2010; McPherson et al., 2000).

Además, se ha demostrado que numerosos contaminantes ambientales; entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados y solventes orgánicos, causan tumores de glándulas mamarias en animales; esto mediante el daño a DNA, promoviendo el crecimiento tumoral, y alterando el desarrollo del tejido mamario, así afectando la susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis (Brody et al., 2007). Entre los contaminantes de interés están aquellos presentes en el aire como las partículas suspendidas totales, presentes en el aire de zonas urbanas, industrializadas y con tráfico vehicular intenso (Bonner et al., 2005; Huo et al., 2013; Mordukhovich et al., 2015; Nie et al., 2007; Parikh and Wei, 2016).

El cáncer de mama de manera general es clasificado en cáncer hereditario y cáncer esporádico, dependiendo de los factores de riesgo predominantes en el desarrollo de la enfermedad. A nivel mundial, el cáncer de mama hereditario representa entre

el 5 al 15 % de los casos de cáncer de mama, y este se asocia a mutaciones en los genes de: *BRCA1* y *BRCA2*, principalmente, y en menor grado los genes: *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C* y *TP53* (Apostolou and Fostira, 2013; Slavin et al., 2017; Venkitaraman, 2002). Si bien las mutaciones en *BRCA1* juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama hereditario, el gen de *BRCA1* también puede participar en el desarrollo de cáncer de mama esporádico, esto se debe a que el gen de *BRCA1* puede ser regulado epigenéticamente, lo que lleva a una disminución en los niveles de la proteína de BRCA1, sin que exista una mutación en su gen (Catteau and Morris, 2002), actualmente se conoce que este gen puede ser regulado a través de modificaciones epigenéticas.

BRCA1

BRCA1 es un gen supresor de tumores, que se localiza en el cromosoma 17q21 conteniendo 24 exones, y codifica para una proteína de 1,863 aminoácidos (Miki et al., 1994), teniendo dos sitios de inicio de transcripción (exon-1 y exon-1b), y en ambos sitios se han identificado elementos de respuesta a xenobióticos (XREs= GCGTG), donde se une el AHR (Hockings et al., 2006).

La función principal de la proteína BRCA1 es mantener la integridad genómica de la célula a través de regulación en la replicación y reparación del DNA, transcripción y del punto de control en la fase G2-M del ciclo celular (Huen et al., 2010). BRCA1 contiene un dominio RING amino terminal altamente conservado y un dominio BRCT hacia la región carboxilo terminal; por medio de estos dominios, BRCA1 interactúa directa o indirectamente con numerosas moléculas formando distintos complejos proteicos, cada uno dedicado a una función celular específica en la vía de respuesta por daño a DNA. La proteína de BRCA1 es importada activamente al núcleo para regular la replicación y estimular la transactivación de genes de daño a DNA, y se redistribuye en el núcleo a los sitios de DNA para su reparación; también es exportado al citoplasma, donde es reclutado a los centrosomas para mantener una óptima división celular y forma del citoesqueleto, y hacia la mitocondria donde su papel se ha asociado con apoptosis y reparación del genoma mitocondrial

(Henderson, 2012). Entre las distintas proteínas que son capaces de unirse con BRCA1, la Proteína 1 de dominio RING asociado a BRCA1 (BARD1) es considerada como una de las más importantes. El heterodímero BRCA1-BARD2 es estable y tiene actividad de E3 ubiquitin ligasa y participan en la señalización de daño a DNA, reparación y regulación transcripcional (Henderson, 2012; Huen et al., 2010; Starita and Parvin, 2003).

Cuando se censa daño a DNA en doble cadena (DSB), la proteína BRCA1 participa en la vía de reparación por recombinación homóloga (RH). Está implicada en el procesamiento de las DSBs a través de su interacción con la proteína 8 de unión al retinoblastoma (RBBP8). BRCA1 también, es necesario para el reclutamiento de la recombinasa RAD51 a los sitios de daño a DNA a través de su interacción con la proteína socio y localizador de BRCA2 (PALB2) y BRCA2 (Roy et al., 2011), y cuando este gen es heredado presentando mutaciones, se codifican formas alteradas de la proteína que contribuyen al desarrollo de cáncer familiar de mama y ovario, debido a que la proteína no puede realizar su función normal en la célula (Miki et al., 1994).

La incidencia del cáncer de mama debido a mutaciones es una pequeña fracción que va del 5 al 15% del total de casos (Venkitaraman, 2002), siendo la mayor proporción de cáncer de mama, el cáncer esporádico, el cual se encuentra entre un 85-95%. Además, el incremento de la incidencia y mortalidad del cáncer de mama esporádico representa un problema de salud pública, y se ha considerado de gran relevancia el estudio de su etiología multifactorial, sin embargo, aún falta entender a profundidad sus causas.

Las mutaciones germinales en *BRCA1* representan el 30-40% de los carcinomas de mama hereditarios (Lux et al., 2006). Sin embargo, son raras las mutaciones somáticas del gen en las formas esporádicas de esta neoplasia (Futreal et al., 1994; Khoo et al., 1999). Por otro lado, la evidencia señala que niveles bajos o inexistentes del mRNA y proteína de BRCA1 están involucrados en el desarrollo de cáncer de mama esporádico. Existen varios mecanismos que pueden conducir a una disminución en los niveles de BRCA1 en tumores de mama esporádicos; entre ellos,

la pérdida de heterocigosidad, expresión alélica preferencial, desregulación de activadores o represores transcripcionales y cambios epigenéticos (Catteau and Morris, 2002; Mueller and Roskelley, 2002).

Regulación epigenética

La epigenética ha sido definida como “el estudio de los cambios en la función genética que son heredables mitóticamente y/o meióticamente y que no implican un cambio en la secuencia de DNA” (Russo et al., 1996).

Los mecanismos epigenéticos se encargan de regular la estructura de la cromatina y son componentes esenciales para la regulación de la expresión genética. Estos mecanismos incluyen la metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de las histonas como acetilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP-ribosilación y RNAs no codificantes (Allis et al., 2015).

La metilación del DNA es la unión covalente de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina y es realizada por las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs), esta modificación epigenética ocurre predominantemente en secuencias 5'-CG-3' denominados sitios CpG. La metilación del DNA regula la expresión reclutando proteínas involucradas en la represión génica o a través de la inhibición de la unión de factores de transcripción al DNA (Moore et al., 2013; Prokhortchouk and Defossez, 2008).

Las islas CpG son regiones del genoma que tienen una longitud de 200-1000 pares de bases (pb), 60% de contenido C+G y frecuencia de sitios CpGs mayor a 0.6 (Illingworth and Bird, 2009) y aproximadamente el 60-70% de los promotores de genes están asociados con islas CpG (Deaton and Bird, 2011; Illingworth and Bird, 2009). De acuerdo con la densidad CpG, los promotores son clasificados con contenido CpG alto, intermedio y bajo (Weber et al., 2007). Los promotores con islas CpG altas son asociadas con promotores de genes constitutivos y normalmente se encuentran sin metilación, sin embargo, este tipo de promotores son silenciados por metilación del DNA (Weber et al., 2007).

La metilación aberrante del DNA se presenta en enfermedades como el cáncer, las células cancerosas presentan una pérdida en la metilación global del DNA e hipermetilación localizada en promotores de genes (Denis et al., 2011).

El nucleosoma es la unidad estructural básica de la cromatina y está conformado por 146 pb de DNA enrollado de un octámero histonas, compuesto por pares de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Cutter and Hayes, 2015). Las histonas y sus modificaciones postraduccionales están implicadas en la organización de la cromatina y la regulación transcripcional de los genes. El extremo amino terminal de las histonas principalmente sufre modificaciones postraduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP ribosilación (Kouzarides, 2007).

La acetilación de lisinas es mediada por enzimas acetil transferasas (HATs) y eliminada por enzimas desacetilasas de histonas (HDACs). Esta marca se asocia con un estado laxo en la cromatina, ya que las cargas positivas de los grupos acetilo neutralizan la carga negativa del DNA, por lo que esta marca postraduccionales se encuentra en zonas transcripcionalmente activas (Eberharther and Becker, 2002).

Por otro lado, la metilación en residuos de las histonas es establecida por enzimas metil-tansferasas de histonas, la modificación tiene un impacto en la remodelación de la cromatina que puede llevar a un estado de transcripción activa o represiva dependiendo del residuo y grado de metilación (mono, di o tri-metilado), por ejemplo, la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) es asociada a promotores activos, y por otra parte, la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y la trimetilación de la lisina 27 de la histona 27 (H3K27me3), ambas marcas asociadas a represión transcripcional (Allis et al., 2015).

Con respecto a los cambios epigenéticos que genera la exposición a PMs, se sabe que alteran los niveles de metilación del DNA, generando hipometilación global (De Prins et al., 2013; Zhou et al., 2016) en secuencias Alu y LINE-1 (Baccarelli et al., 2009; Madrigano et al., 2011; Tarantini et al., 2009), e hipometilación del gen *iNOS* (Ding et al., 2016; Tarantini et al., 2009), hipermetilación del gen *CDKN2A* que codifica para la proteína p16 (Ding et al., 2016; Soberanes et al., 2012). Las PMs

aumentan los niveles de acetilación en la histona H4 del promotor del gen *IL-8*, con una disminución de HDAC2 (Gilmour et al., 2003).

Regulación epigenética de BRCA1

El silenciamiento transcripcional mediante cambios epigenéticos proporciona un mecanismo alternativo para la represión de genes supresores de tumores durante el desarrollo del cáncer (Kazanets et al., 2016). En el caso de algunos tumores esporádicos, se ha reportado que el gen *BRCA1* se encuentra transcripcionalmente inactivo, sin presentar mutaciones. Este silenciamiento ha sido asociado a metilación en el promotor del gen (Birgisdottir et al., 2006; Catteau et al., 1999; Esteller et al., 2000; Li et al., 2015a; Rice et al., 2000; Wei et al., 2005), y este evento se asocia con una disminución de su expresión cuando se encuentra hipermetilado; diversos estudios han reportado que este escenario sucede en un 5.2-65.2% de los casos de cáncer de mama esporádico (Zhang and Long, 2016).

En el extremo 5' del gen *BRCA1* se encuentra una isla CpG con una longitud de 1580 pb, su contenido CG es del 56%, y tiene una frecuencia CpG de 0,72 (Rice et al., 1998). En el gen de *BRCA1*, cuando se encuentra hipermetilado en su región promotora, sucede una disminución de la expresión del mRNA y proteína (Birgisdottir et al., 2006; Catteau et al., 1999; Esteller et al., 2000; Li et al., 2015a; Rice et al., 2000; Wei et al., 2005).

Además de correlacionar la metilación del promotor de BRCA1 con el aumento de riesgo de cáncer de mama, los estudios señalan una asociación de la metilación con un mayor grado histológico, fenotipo triple negativo (negativo para receptor de estrógenos, receptor de progesterona y para el factor de crecimiento HER2/neu) y metástasis ganglionares (Turner et al., 2007; Zhang and Long, 2016).

También se ha reportado que la represión transcripcional de BRCA1 por metilación del promotor está asociado con la hipoacetilación de las histonas H3 y H4 (Rice and Futscher, 2000), por lo que la combinación de diferentes marcas epigenéticas, y no únicamente la metilación del DNA, podrían impactar en la regulación transcripcional del gen.

Por otro lado, se sabe que el AHR puede regular de forma negativa al gen *BRCA1* a través de mecanismos epigenéticos (Hockings et al., 2006; Papoutsis et al., 2012); se ha reportado que en células de cáncer de mama, tras la exposición con el agonista del receptor 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), el AHR es activado y translocado a núcleo, posteriormente el heterodímero AHR/ARNT es capaz de interactuar con diversas proteínas, entre las que se encuentran proteínas modificadoras de la cromatina como la DNA metiltransferasa-1 (DNMT-1), DNMT-3a, DNMT-3b, la Proteína 2 con dominio de unión a metil-CpG (MBD2) y la desacetilasa de histona 1 (HDAC1) (Hockings et al., 2006), para así unirse en los XREs del promotor del gen *BRCA1*, favoreciendo la metilación del DNA, la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), reducción de la acetilación en la histona 4 (H4Ac) y de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9Ac) en el promotor del gen, que en conjunto regulan de forma negativa la transcripción de *BRCA1* (Papoutsis et al., 2010, 2012).

El HAP 7,12-dimethyl-benzo(a)anthraceno (DMBA) induce tumores mamarios en modelos animales, y se observó que los tumores contenían una expresión reducida de *BRCA1* y del receptor de estrógenos (ER), esto asociado a metilación de los sitios CpG del promotor de *BRCA1*; y una mayor expresión del AHR y CYP1A1, por lo que la alta expresión constitutiva del AHR asociada a metilación del gen *BRCA-1* pueden ser marcadores pronósticos del desarrollo de tumores de mama ERα negativos (Romagnolo et al., 2015).

Adicionalmente, se ha descrito que la metilación en el promotor del gen parece tener un efecto regulatorio en varios sitios de unión a factores de transcripción, como el elemento de respuesta a cAMP (CREB) (DiNardo et al., 2001; Mancini et al., 1998), el sitio de unión de la proteína específica 1 (Sp1) y el factor de unión CCCTC (CTCF) (Butcher et al., 2004). En este sentido, la célula cuenta con mecanismos que permiten el mantenimiento de zonas libres de metilación, uno de estos mecanismos se da por la unión de proteínas al DNA protegiendo la región formando fronteras que impiden la propagación de la metilación; una de estas proteínas es CTCF (Figura 3).

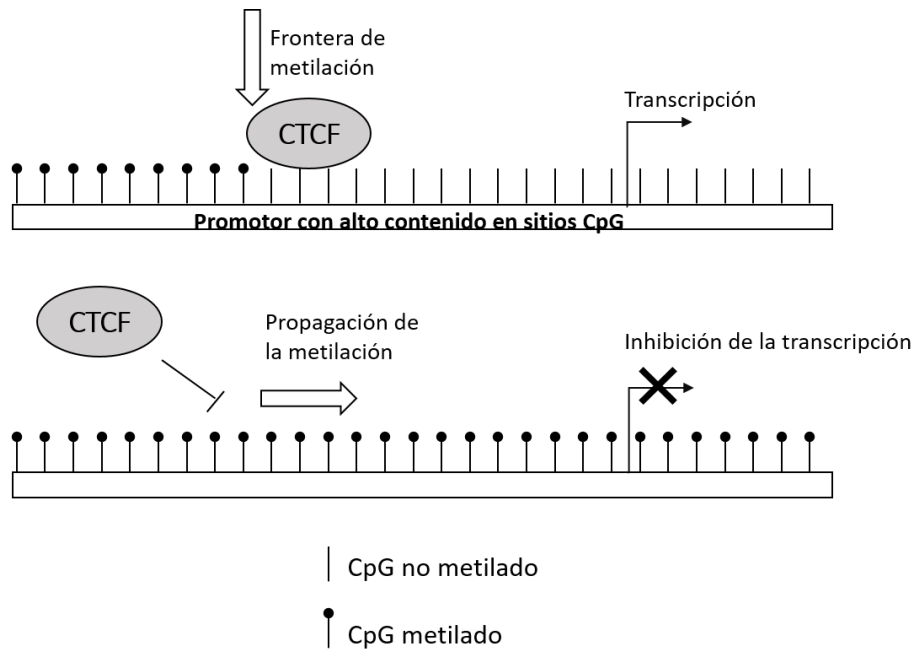


Figura 3. CTCF forma una barrera que protege la metilación del DNA

Los genes que contienen un promotor con una isla CpG con alto contenido en sitios CpG, suelen ser regulados mediante metilación del DNA. CTCF se une en sus sitios blanco en el DNA protegiendo la región formando fronteras que impiden la propagación de la metilación. Cuando existe hipermetilación aberrante en el promotor se reprime la expresión del gen.

CTCF

CTCF es una proteína nuclear altamente conservada con expresión ubicua y desempeña diversos papeles en la regulación transcripcional (Phillips and Corces, 2009). El gen de CTCF se localiza en el cromosoma 16q22.1, y codifica para una proteína de 727 aminoácidos, que contiene 11 dominios de dedos de zinc de unión a DNA (Filippova, 2007), lo que le permite unirse a diferentes secuencias de DNA mediante el uso de distintas combinaciones de sus dedos de zinc (Filippova et al., 1996); esta habilidad le confiere a la proteína diversas funciones, como activador o represor transcripcional, participar en la impronta génica, como insulador, en la inactivación de cromosoma X, como barrera para evitar la propagación de marcas de histonas represoras y también como barrera para evitar la propagación de la metilación del DNA, además funciona como organizador genómico con la formación de dominios de cromatina (Espinoza and Ren, 2011; Filippova, 2007; Recillas-Targa, 2006).

Diversos estudios han demostrado que CTCF actúa como frontera protegiendo al DNA circundante de sufrir metilación en los promotores de los genes: *Rb* (De La Rosa-Velázquez et al., 2007), *ARF* (Rodríguez et al., 2010), *XAF1* (Victoria-Acosta et al., 2015) y *BRCA1* (Butcher et al., 2004); la unión de CTCF al DNA está estrechamente relacionada con el estado de metilación de los sitios CpG de la secuencia, siendo sensible a la metilación, de modo que la metilación del DNA impide la unión de CTCF (Filippova, 2007).

En el caso del gen de *BRCA1*, se han identificado dos sitios de unión a CTCF en la región de su promotor (Butcher et al., 2004), y cuando la región promotora está metilada, la accesibilidad de CTCF a este sitio se ve comprometida (Xu et al., 2010); además en varios tumores de mama, se ha encontrado a CTCF con una expresión disminuida, ausente en el núcleo y con distribución citoplasmática (Butcher and Rodenhiser, 2007; Rakha et al., 2004). Esto sugiere que tanto la pérdida funcional de CTCF como la metilación del DNA del promotor, pueden contribuir en la pérdida de fronteras de metilación en el gen de *BRCA1*, y por esta vía favorecer el desarrollo de neoplasias esporádicas (Butcher et al., 2004).

Se ha propuesto que la modulación de la función de insulador del retrotansposón B1-X35S se lleva a cabo a través de la unión del AHR, la proteína SLUG y de CTCF en sus sitios de unión dentro de B1-X35S (Roman et al., 2011). Sin embargo, no existen trabajos toxicológicos que evalúen el efecto de los contaminantes ambientales sobre la función de CTCF, a través de la activación de la vía del AHR.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente va en aumento la evidencia epidemiológica que asocia la exposición a PMs como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama; sin embargo, aún falta mucho por entender sobre los mecanismos a través de los cuales las PMs favorecen el desarrollo esporádico de esta neoplasia. Debido a que diversos estudios sugieren que el contenido de HAPs de los contaminantes del aire contribuyen en gran medida en el desarrollo de esta neoplasia, la vía del AHR es una vía importante de analizar.

Por otro lado, diversos trabajos han encontrado que la exposición a contaminantes ambientales desregula a través de modificaciones epigenéticas diversos genes, entre los que se encuentran genes supresores de tumores, entre ellos BRCA1. Por otro lado, CTCF es una proteína que participa en el mantenimiento de la metilación de genoma; sin embargo, el efecto de la exposición a aeropartículas contaminantes sobre la función de CTCF no ha sido investigada.

Por lo anterior, es importante el estudio sobre los mecanismos celulares y moleculares que inducen las PM₁₀, a través de la regulación epigenética de genes como *BRCA1*, y el papel del AHR y CTCF en dicha desregulación, asociados al desarrollo de cáncer de mama esporádico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las PM₁₀ disminuirán los niveles de BRCA1 y CTCF, a través del AHR?

HIPÓTESIS

Si las PM₁₀ incrementan los niveles de mRNA y proteína de AHR, esto favorecerá la disminución de los niveles de las proteínas BRCA1 y CTCF en células de cáncer de mama MCF7.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la participación de las PM₁₀ en la disminución de los niveles de las proteínas BRCA1 y CTCF, a través del AHR, en células de cáncer de mama MCF7.

Objetivos particulares

- Determinar la participación del AHR en la regulación de BRCA1 y CTCF en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a PM₁₀.
- Evaluar la localización de BRCA1 y CTCF en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a PM₁₀.
- Determinar los niveles de proteína de BRCA1 y CTCF en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a PM₁₀.
- Evaluar *in silico* la unión de CTCF en el gen de *BRCA1*.

Evaluar *in silico* el estado de metilación del gen *BRCA1* de líneas celulares de cáncer de mama.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Muestreo de PM₁₀

Se utilizaron PM₁₀ previamente colectadas en una zona residencial de la Ciudad de México utilizando un muestreador de grandes volúmenes (GMV modelo 1200 VFC HVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA). Las PM₁₀ se colectaron en filtros de nitrocelulosa de 3.0 µm, hasta el momento de recuperación de las partículas, los filtros se mantuvieron en oscuridad a 4°C. Para la remoción de las partículas se cepilló el filtro de manera delicada y se recuperaron con una hoja quirúrgica en viales de vidrio libre de endotoxinas, los cuales fueron almacenados en oscuridad a 4°C hasta su uso (Alfaro-Moreno et al., 2009).

Cultivo celular

En este trabajo se utilizaron pases tempranos de la línea celular de cáncer de mama MCF7. Las células MCF7 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Son células provenientes de un adenocarcinoma de mama esporádico. Cabe destacar que la línea celular cuenta con el gen de BRCA1 wild type, y el promotor no presenta metilación (Elstrodt et al., 2006); en cuanto a la clasificación molecular del carcinoma de mama al que pertenece, MCF7 está clasificada como “Luminal A”, receptor de estrógeno (ER) y progesterona positivos (PR) (Holliday and Speirs, 2011).

Las células fueron cultivadas, con medio Eagle modificado por Dulbecco's con mezcla de nutrientes F12: DMEM/12 (GIBCO, 11330-032) suplementado con 10% v/v de SFB (GIBCO, 16000-044) (Medio suplementado) y fueron mantenidas en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C.

Para la realización de los experimentos, se sembraron células MCF7 en placas de cultivo de 6 y 12 pozos (Costar, 3516 y 3513) o en laminillas de 8 pozos (Lab-Tek Chamber Slide, Thermo Scientific # 177402), las células se incuban por 24 horas y se realiza la transfección con siRNAs para AHR, y 24 horas posteriores, con un 80% de confluencia, se realizó la exposición a las PM₁₀.

Exposición de las células a PM₁₀

Las partículas fueron pesadas y esterilizadas por calor húmedo en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, 15 psi. Posteriormente, se suspendieron en medio suplementado (1 mg/mL) y se mezclaron en vortex a baja velocidad hasta su homogenización. El medio del cultivo se reemplazó por medio suplementado con 10µg/cm² de PM₁₀ de la Ciudad de México, y las evaluaciones se realizaron a las 24 horas de exposición. Las células no expuestas se usaron como control.

Entre los componentes de las PM se encuentran los HAPs, estos se unen a el AHR activándolo, por lo que se usó Benzopireno (BaP) 1 µM como control positivo de la activación de la vía de AHR.

Como inhibidor de la vía de AHR se transfectaron las células con siRNAs dirigido al mRNA del AHR, 24 horas posteriores a la transfección se realizó la exposición con PM₁₀.

Transfección de siRNAs

Para determinar la participación del AHR en los efectos inducidos por las partículas se realizó la transfección con siRNAs dirigidos al mensajero del gen *AHR*.

Para la realización de los experimentos, se sembraron células MCF7 en placas de cultivo de 6 y 12 pozos, o en laminillas de 8 pozos, a semiconfluencia con medio completo por 24 horas.

La transfección del siRNA se llevó a cabo utilizando el kit Xfect RNA Transfection Reagent (Clontech, 631450), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prepararon dos mezclas: La primera consistió en la mezcla del siRNA y el amortiguador de reacción Xfect, con una concentración final del siRNA de 100 nM; por otro lado, la segunda mezcla fue el polímero de transfección de RNA Xfect y amortiguador de reacción Xfect, ambos tubos se mezclaron por vórtex y la mezcla del polímero de transfección se transfirió al tubo con siRNA. La mezcla nueva se vortexeó y se incubó durante 10 minutos para permitir que los complejos de nanopartículas se formen. Mientras tanto, se cambió el medio en cada pozo teniendo un volumen final de 200, 500 o 1000 uL (chamber slide, placa de 12 y 6 pozos, respectivamente). Se adicionaron lentamente 20, 50 o 100 uL (chamber

slide, placa de 12 y 6 pozos, respectivamente) de la solución con los complejos de nanopartículas al medio de cultivo, inmediatamente se movió suavemente la placa o chamber slide para mezclar. El cultivo fue incubado a 37°C durante 4 horas, posteriormente se removió el medio y se adicionó medio suplementado fresco y se incubó por 20 horas.

Extracción de RNA

Para determinar la expresión del mRNA de *AHR* en células MCF7 expuestas a PM₁₀. Se sembrarán células MCF7 (1.5x10⁵ células/pozo) en placas de 12 pozos (Costar, 3513), 24 horas posteriores de incubación se realizó la transfección con siRNAs de *AHR* y después de 24 horas, en 80% de confluencia, fueron expuestas como se describe anteriormente.

Una vez transcurrido los tiempos de los tratamientos las células fueron lavadas con PBS y se extrajo el RNA total utilizando trizol (Ambion, 15596026) de la siguiente manera: Las células fueron lisadas directamente en la placa añadiendo trizol, el lisado se recuperará en un microtubo, para la separación de la fase acuosa de la fase orgánica se agregó 200 µL por cada mL de trizol utilizado, las muestras fueron agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 3 min, pasado el tiempo se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un nuevo microtubo y fue precipitado el RNA con 500 µL por cada mL de trizol utilizado, durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 15 min a 13,000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el botón de RNA obtenido fue lavado con 1 mL de etanol al 75% por cada mL de trizol utilizado y se centrifuga a 7,000 rpm durante 5 min a 4°C, nuevamente se retiró el sobrenadante para posteriormente secar el botón de RNA. Finalmente se disolvió el botón en agua libre de RNAsas. Las muestras de RNA se cuantificaron utilizando NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), además se evaluó su pureza con el mismo aparato. De manera cualitativa, se corroboró la integridad de las muestras de RNA cargando 500 ng de RNA total por pozo en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE teñido con Gel Red. La imagen fue visualizada y capturada con el equipo ChemiDoc-It®^{TS3} Imager UVP

Determinación de la expresión de *AHR* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

Para evaluar los niveles del mensajero de AHR por q-RT-PCR, se sintetizó cDNA a partir del templado de RNA obtenido durante la extracción del cultivo celular, utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4374966), la master mix de transcripción inversa fue preparada siguiendo las especificaciones del fabricante: por reacción se compuso de 2 uL de 10X RT Buffer, 0.8 uL de 25X dNTP MIX (100 nM), 2 uL de 10X RT Random Primers, 1 uL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 uL de inhibidor de RNasa (Applied biosystems, N8080119) y 3.2 uL de agua libre de nucleasas. Posteriormente a cada muestra se le agregó 10 uL de RNA equivalente a 300 ng, teniendo un volumen final por reacción de 20 uL. La transcripción inversa se realizó en el termociclador utilizando las siguientes condiciones: Se realizó una primera etapa de 10 minutos a 25 °C, posteriormente una etapa de 120 minutos a 37 °C, tercera epata de 5 minutos a 85 °C y una última etapa a 4 °C de tiempo indefinido hasta su retiro del termociclador. Las muestras de cDNA obtenidas se almacenaron a 4°C para ser utilizadas a la brevedad.

Para el qRT-PCR se utilizó el kit SYBR® Advantage® qPCR Premix (Takara Clontech, 639676) siguiendo las indicaciones del fabricante: se preparó a un volumen final por reacción de 20 uL, la combinación de 6.8 uL de ddH₂O, 10 uL de SYBR Advantage Premix 2X, 0.4 uL de ROX LSR Dye 50X, 0.4 uL de primer reverse 10 uM, y 0.4 uL de primer forward y 2 uL de 10 ng de cDNA. Para cada muestra se realizaron triplicados.

Los oligos de AHR y GAPDH fueron diseñados con una temperatura de alineación de 60°C, las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados.

AHR	Forward 5'-CTGCCTTTCCCACAAGATGT-3' Reverse 5'-AGTTATCCTGGCCTCCGTTT-3'
GAPDH	Forward 5'-GCAAATTCATGGCACCGTC-3' Reverse 5'-AGCATCGCCCCACTTGATTT-3'

Para la realización de la PCR cuantitativa, se utilizó el termociclador StepOne plus (Applied biosystems, 4376600) siguiendo el programa descrito a continuación:

- Desnaturalización: 1 ciclo de 95°C por 10 segundos.
- Amplificación: 40 ciclos con una etapa de 95°C por 15 segundos y una segunda etapa de 60°C por 60 segundos.
- Disociación: 1 ciclo dividido en una etapa de 95 °C por 15 segundos, segunda etapa de 60°C por 60 segundos y tercera etapa de 95°C por 15 segundos.

La expresión del mRNA de AHR fue calculada por el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta}$), por lo que se utilizó la amplificación del gen endógeno GAPDH como parámetro para la normalización de los resultados.

Localización subcelular de CTCF y BRCA1 por Inmunofluorescencia

Para evaluar la localización subcelular de CTCF y BRCA1 se sembraron células MCF7 (5×10^4 células/pozo) en laminillas de 8 pozos (Lab-Tek Chamber Slide, Thermo Scientific # 177402). 24 horas posteriores se transfectaron con el siRNA dirigido a AHR como se describió anteriormente. Con un 80% de confluencia celular, las células fueron expuestas a PM_{10} durante 24 horas, como se describió anteriormente.

Después de los tratamientos, los pozos fueron lavados una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, posteriormente se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 2% en TBS por 30 minutos. En cada etapa se hacen lavados con TBS por 5 min. Para reducir la autofluorescencia, las células fueron tratadas con borohidruro de sodio al 0.1% en TBS por 5 min a temperatura ambiente. Para bloquear los sitios inespecíficos de unión a proteínas, se utilizó un amortiguador de bloqueo con 10% de suero de caballo, 1% de albúmina sérica bovina (BSA) en TBS por 1 hora a temperatura ambiente, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-CTCF (Cell Signaling, 2899) 1:400 en amortiguador de bloqueo; o bien con el anticuerpo primario anti-BRCA1 (Millipore, 07434) 1:500 en amortiguador de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de

incubación, se lavaron 3 veces por cinco minutos y se incubó el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con Alexa Fluor 488 (Jackson Inmuno Research, 111-545-144) 1:200 en amortiguador de bloqueo durante 1 hora cubierta de la luz a temperatura ambiente. Después se lavaron las laminillas 3 veces durante 5 min. Las laminillas tratadas fueron cubiertas con cubreobjetos se utilizando 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes, 36935). Las imágenes fueron visualizadas y capturadas con el microscopio Axio Imager.D2 (Carl Zeiss). La intensidad de fluorescencia se cuantificó por densitometría con el programa ImageJ.

Determinación de AHR, BRCA1 y CTCF por western blot

Para medir los niveles de las proteínas AHR, BRCA1 y CTCF en células MCF7 expuestas a PM₁₀ por 24 horas se llevó a cabo un ensayo de western blot. Se sembraron células MCF7 (5x10⁵ células/pozo) en placas de cultivo de 6 pozos (Costar, 3516), 24 horas posteriores se transfectaron con el siRNA dirigido a AHR como se describió anteriormente. 24 horas después y con un 80% de confluencia celular, las células fueron expuestas a PM₁₀ durante 24 horas, como se describió anteriormente.

Transcurrido el tiempo de incubación de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS y la lisis celular se realizó utilizando 150 µL de amortiguador de lisis frío (20 mM Tris, 1% NP-40, and 150 mM NaCl, pH 8 con cóctel de inhibidores de proteasas) en agitación durante 10 min a 4°C, y después con ayuda de un scraper se colectaron las células. Posteriormente se recuperaron los volúmenes en microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -20°C hasta su cuantificación y uso. La cuantificación de proteínas se realizó con el método del ácido bicinonínico (Smith et al. 1985), utilizando una curva de albúmina sérica bovina de 1.25-10 µg/µl, las muestras fueron leídas en un lector de placas a 570 nm (Tecan GENios Plus).

La electroforesis de las muestras fue realizada en un gel de poliacrilamida-SDS de gradientes del 5-10% (para BRCA1) y al 10% (para AHR y CTCF), con 30 µg de proteína por tratamiento, el corrimiento se hizo por aproximadamente 90 minutos a 170 V. Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.45 µm (Millopore, IPVH00010) utilizando una

cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Trans-Blot Turbo) con amortiguador de transferencia (Tris 2mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3) durante 30 min a 25V. Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo a proteínas se bloquearon las membranas por 1 hora con 5% de BSA, 5% leche descremada en TBS-Tween 20 0.2% para la proteína de AHR, y con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 0.2% para CTCF y BRCA1. Posteriormente se incubaron los anticuerpos anti-AHR (Santa Cruz, sc-5579) dilución 1:1000, anti-BRCA1 (Millipore, 07-434) dilución 1:1000 y anti-CTCF (Cell Signaling, 2899) dilución 1:1000, utilizando amortiguador de bloqueo, durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Como control de carga se incubó el anticuerpo anti-B-actina (anticuerpo monoclonal donado por el Dr. Manuel Hernández, Cinvestav-IPN) 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron lavados de 10 min en TBS-Tween 20 al 0.2% para posteriormente incubar el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Amersham, NA934V) para AHR, BRCA1 y CTCF a una dilución 1:3000, y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham, NA931V) 1:5000; todos en amortiguador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Nuevamente se hicieron 3 lavados de 10 minutos. La inmuno detección se realizó por quimioluminiscencia con el kit de detección del sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano (HRP) (Millipore, WBKLS0100). La imagen fue visualizada y capturada con el equipo ChemiDoc-It^{TS3} Imager UVP. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageJ.

Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio \pm DS de tres experimentos independientes y el análisis estadístico se realizó por análisis de varianza de una vía seguido por múltiples comparaciones por Bonferroni con el software GraphPad PRISM [®] versión 5.01. Un valor de $p < 0.5$ fue considerado como significativo.

Ensayo in silico de los sitios de unión de CTCF en el promotor de BRCA1

Para analizar de manera *in silico* al promotor de BRCA1 y su regulación mediada por CTCF, se utilizó la plataforma web de Wash U Epigenome Browser (Human Epigenome Browser at Washington University in St. Louis) que contiene los datos de ENCODE y del Roadmap Epigenomics Project (Zhou et al., 2011).

Para ello se ingresó por medio del explorador web Chrome en la página de inicio del Wash U Epigenome Browser a través de la liga: <http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/>, y se seleccionó el genoma "Human hg19", posteriormente en el apartado "public track hubs" fueron anexados los datos de la enciclopedia de los elementos de DNA (ENCODE por sus siglas en inglés).

Dentro del navegador, en la herramienta de reubicación se buscó al gen *BRCA1*. Para seleccionar los datos de ChipSeq, en "tracks" se buscó "MCF7" y "CTCF", y se adicionaron: UW ChipSeq MCF-7 CTCFRep1, UW ChipSeq MCF-7 CTCFRep2, UT-A ChipSeq MCF-7 CTCF, UT-A ChipSeq MCF-7 CTCF, UT-A ChipSeq MCF-7 CTCF, UT-A ChipSeq MCF-7 CTCF, UT-A ChipSeq MCF-7 serum, UT-A ChipSeq MCF-7 serum, UT-A ChipSeq MC-F7 serum, UT-A ChipSeq MCF-7 serum; estos parámetros se eligieron ya que en la descripción del experimento señalaban que las células MCF7 no tendrían algún tratamiento. En la búsqueda "MCF7", también se seleccionaron los datos de UW ChipSeq MCF-7 H3K4me3 y USC ChipSeq MCF-7 H3K27ac, para la localización del promotor del gen ya que estas marcas de histonas se encuentran enriquecidas en los promotores. Además, en el apartado de annotation tracks - G/C related, se seleccionó "CpG sites", para visualizar de manera general los sitios CpG dentro del gen de BRCA1.

Se configuró el color y tamaño de cada track para lograr una mejor visualización del ensayo *in silico*, y se localizó el promotor de BRCA1 por el enriquecimiento de las marcas H3K4me3 y H3K27Ac. Se buscaron e identificaron sitios enriquecidos con CTCF. Dentro del apartado del navegador "aplicaciones" se seleccionó la captura de pantalla en formato pdf para la generación de la figura 6.

Ensayo *in silico* de los patrones de metilación en diferentes líneas celulares

Para evaluar el estado de metilación del DNA del gen *BRCA1*, en la línea celular MCF7, se realizó un análisis con la enciclopedia de líneas celulares de cáncer (CCLE) del instituto BROAD. Para ello se ingresó en la liga: <https://portals.broadinstitute.org/ccle>, en el buscador principal de la página de inicio se buscó "BRCA1", posteriormente se seleccionó la pestaña del visor de metilación CpG (CpG methylation viewer) y se cargó el diagrama para las líneas celulares de cáncer de mama. La página fue guardada para la generación de la figura 8, únicamente se editaron los colores de fuente para una mejor visualización, se tradujeron los títulos y se agregó el inicio y dirección del gen de BRCA1.

RESULTADOS

El material particulado PM₁₀ aumenta los niveles de AHR

Para determinar la participación del AHR en los efectos inducidos por las PM₁₀, en células de cáncer de mama MCF7 expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24 horas se evaluó la expresión del mRNA de *AHR*. Dentro de los componentes del material particulado PM₁₀, se encuentran los HAPs que activan el AHR, por lo que se utilizó BaP 1 µM como control positivo de la activación del AHR.

Se observó que las PM₁₀ inducen un aumento del 40% en la expresión del mensajero de *AHR* (**p < 0.0005 vs Control) (Figura 4 A). Cuando las células fueron pre-tratadas con el siRNA contra AHR (siAHR) y expuestas a PM₁₀, se observó un abatimiento del 70% en los niveles de expresión de AHR (**p < 0.0005 vs PM₁₀) y el mismo efecto se vio en las células tratadas con BaP, en el cual se ve un aumento del 40% en la expresión (**p < 0.0005 vs Control), y cuando las células son transfectadas con el siAHR se ve prevenido con un decremento de la expresión del 70% (**p < 0.0005 vs BaP) (Figura 4 A).

Para confirmar la activación del AHR y si existía correlación entre el aumento del mensajero con los niveles de su proteína en las condiciones antes mencionadas, se evaluaron los niveles de la proteína mediante western blot (Figura 4 B). Se observó que las PM₁₀ inducen el aumento de los niveles de la proteína AHR en un 65% con respecto a las células control (*p < 0.05 vs Control) y cuando las células son transfectadas con el siAHR, el aumento es prevenido (**p < 0.0005 vs PM₁₀) (Figura 4 C).

De manera exitosa se estableció el modelo de silenciamiento de AHR, con un abatimiento en los niveles de mensajero del 70% (**p < 0.0005 vs Control) (Figura 4 A), como de su proteína en un 80% (*p < 0.0005 vs Control) (Figura 4 B y C), por lo que la transfección del siAHR previene la activación del AHR.

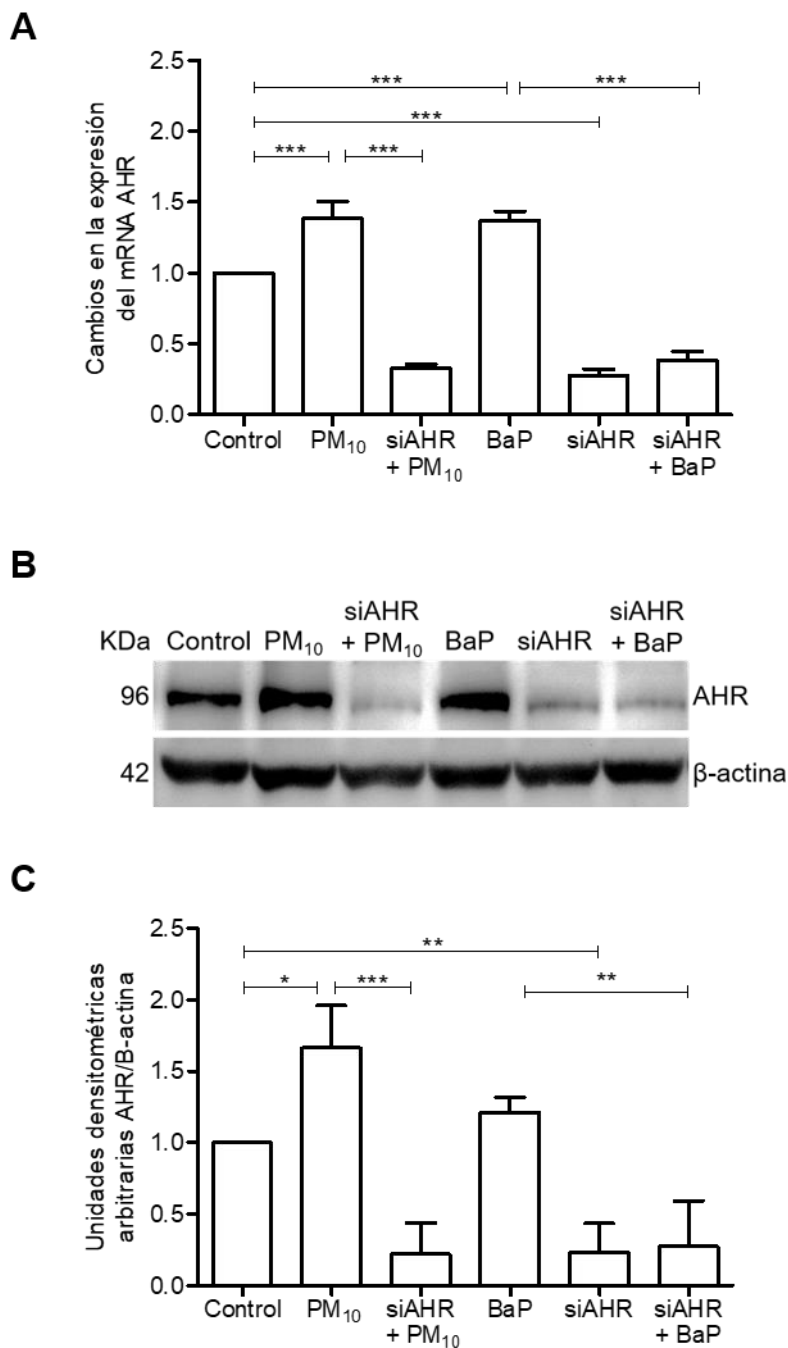


Figura 4. Las PM₁₀ inducen el incremento de la expresión del AHR. Células MCF7 fueron transfectadas con siRNA dirigido a AHR (100 nM) y expuestas a 10µg/cm² de PM₁₀ (CDMX, SUR 2007) durante 24 horas, y a BaP 1µM como control positivo. A) Se evaluaron los niveles del mRNA de *AHR* mediante qRT-PCR, se observó que las PM₁₀ aumentan los niveles del mensajero de AHR y que este cambio se previene al inhibir el mensajero (***) p < 0.0005), n=3. B) Se evaluaron los niveles de proteína del AHR por western blot, y se observó que las PM₁₀ aumentan los niveles de proteína de AHR, este cambio se previene con la inhibición de su mensajero. C) Análisis densitométrico del western blot contra AHR (* p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.0005), n=3.

El material particulado disminuye los niveles de BRCA1

Para determinar si las PM_{10} inducen cambios en los niveles de proteína de BRCA1 y si es un evento mediado por el AHR, las células MCF7 fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24 horas y como un primer abordaje se evaluó la localización celular y los niveles de proteína de BRCA1 mediante inmunofluorescencia (Figura 5 A). Se observa que las PM_{10} disminuyen los niveles de BRCA1, medido por densitometría de intensidad de la señal de inmunofluorescencia, en un 33% (** $p < 0.005$ vs Control), y cuando las células son transfectadas con el siAHR, la disminución de BRCA1 no se ve revertida (Figura 5 B).

Con el fin de determinar si la disminución de BRCA1 está relacionada con la actividad del AHR, se evaluaron los niveles de proteína de BRCA1 en células MCF7 que fueron expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24 horas, mediante western blot (Figura 5 C). Se observó que las PM_{10} inducen una disminución del 60% en la proteína de BRCA1 con respecto a las células sin tratamiento (***) ($p < 0.0005$ vs Control) (Figura 5 D), de igual modo se observa una disminución en los niveles de BRCA1 cuando las células son expuestas a BaP $1 \mu\text{M}$, control positivo de la activación del AHR, en un 70% con respecto al control (***) ($p < 0.0005$ vs Control) (Figura 5 D); por otro lado, cuando las células son transfectadas con el siAHR y expuestas a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} por 24 horas, no se observa una prevención en la disminución de BRCA1 inducida por las partículas, por lo que sugiere que el AHR no participa de manera directa en los niveles de proteína de BRCA1.

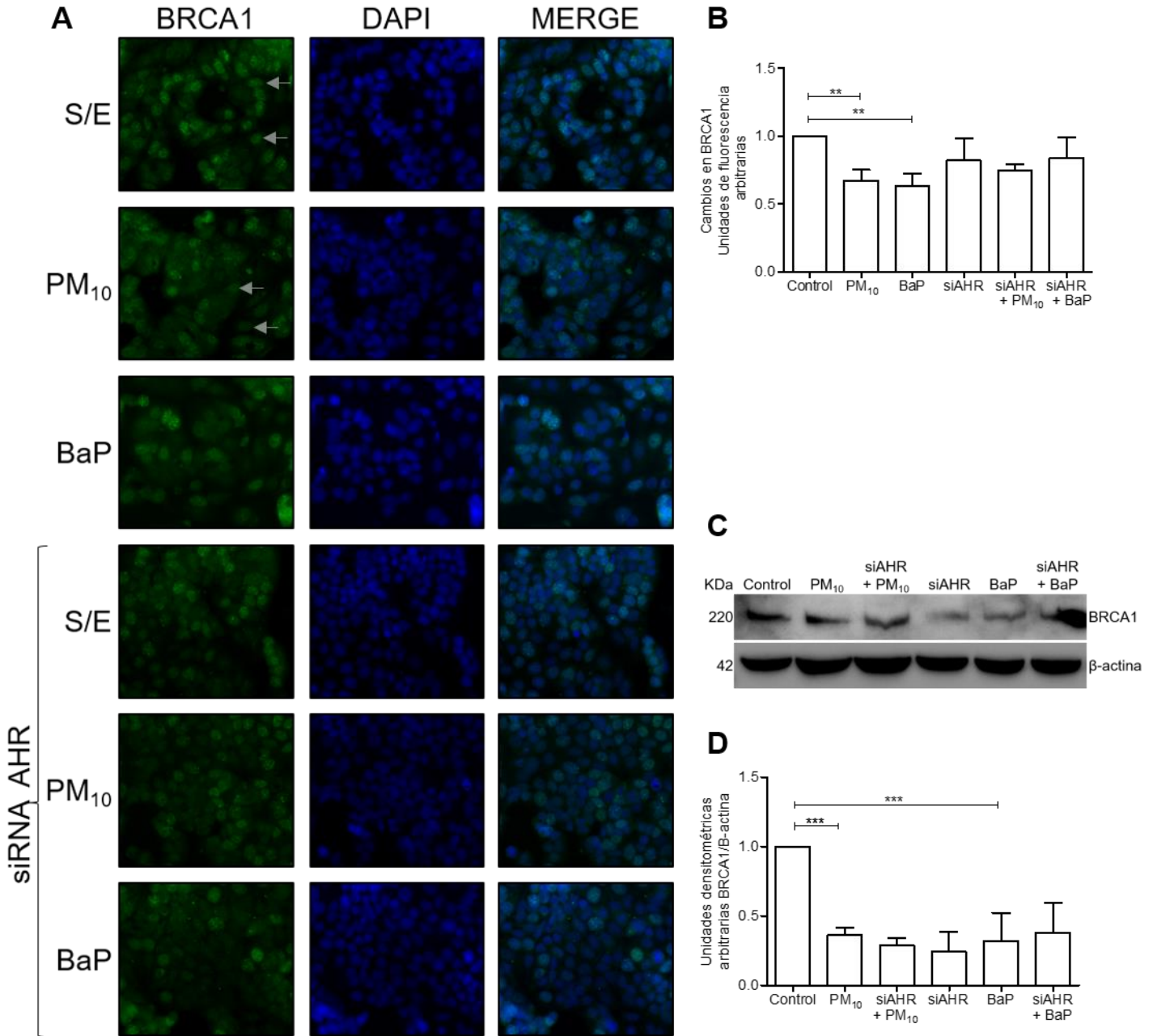


Figura 5. Las PM₁₀ disminuyen los niveles de proteína de BRCA1. Células MCF7 transfectadas o sin transfectar con siRNA dirigido a AHR (100 nM) fueron expuestas a 10µg/cm² de PM₁₀ (CDMX, SUR 2007) durante 24 horas, y a BaP 1µM como control positivo. A) La localización celular de BRCA1 fue evaluada por inmunofluorescencia. B) Análisis densitométrico de la señal de fluorescencia. (** p < 0.005), n=3 C) Se evaluaron los niveles de proteína de BRCA1 por western blot. La exposición a PM₁₀ disminuye los niveles de la proteína de BRCA1, cuando la expresión del AHR es inhibida utilizando el siRNA dirigido a su mRNA, este efecto no es prevenido. C) Análisis densitométrico del western blot contra BRCA1 (***) p < 0.0005, n=3.

El promotor de BRCA1 contiene un sitio de unión a CTCF

Debido a que se observa una disminución en los niveles de BRCA1, pero no se encontró una correlación con los niveles del AHR, se realizó un análisis *in silico* de otros mecanismos que puedan estar regulando epigenéticamente a BRCA1. En este análisis se evaluó la unión a DNA de la proteína CTCF en el promotor de BRCA1 como previamente se había descrito por Butcher y colaboradores en 2004.

Se analizó el gen de *BRCA1* de la línea celular MCF7 utilizando la plataforma WashU Epigenome Browser v 45.1. Se cargaron los datos de ChipSeq contra CTCF, H3K4me3 y H3K27Ac, además se marcaron los sitios CpG dentro de la secuencia del gen (Figura 6).

Para identificar la región promotora del gen, se examinaron los sitios con enriquecimiento en las marcas postraduccionales de histonas: la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) y la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac), ambas marcas asociadas a promotores activos. Se encontró una región con enriquecimiento en ambas marcas de histonas (Figura 6).

Por otro lado, se cargaron datos correspondientes a ChipSeq de CTCF provenientes de 10 experimentos independientes en la línea celular MCF7, sin algún tratamiento, y observamos que existen dos sitios de unión al DNA de CTCF en el gen de *BRCA1* (Figura 6).

Adicionalmente, se marcaron los sitios de los XREs presentes en el gen (líneas verdes, figura 6), con base en lo previamente reportado por (Hockings et al., 2006; Papoutsis et al., 2012). Se observa que la posición de estos es cercana con los sitios de unión de CTCF.

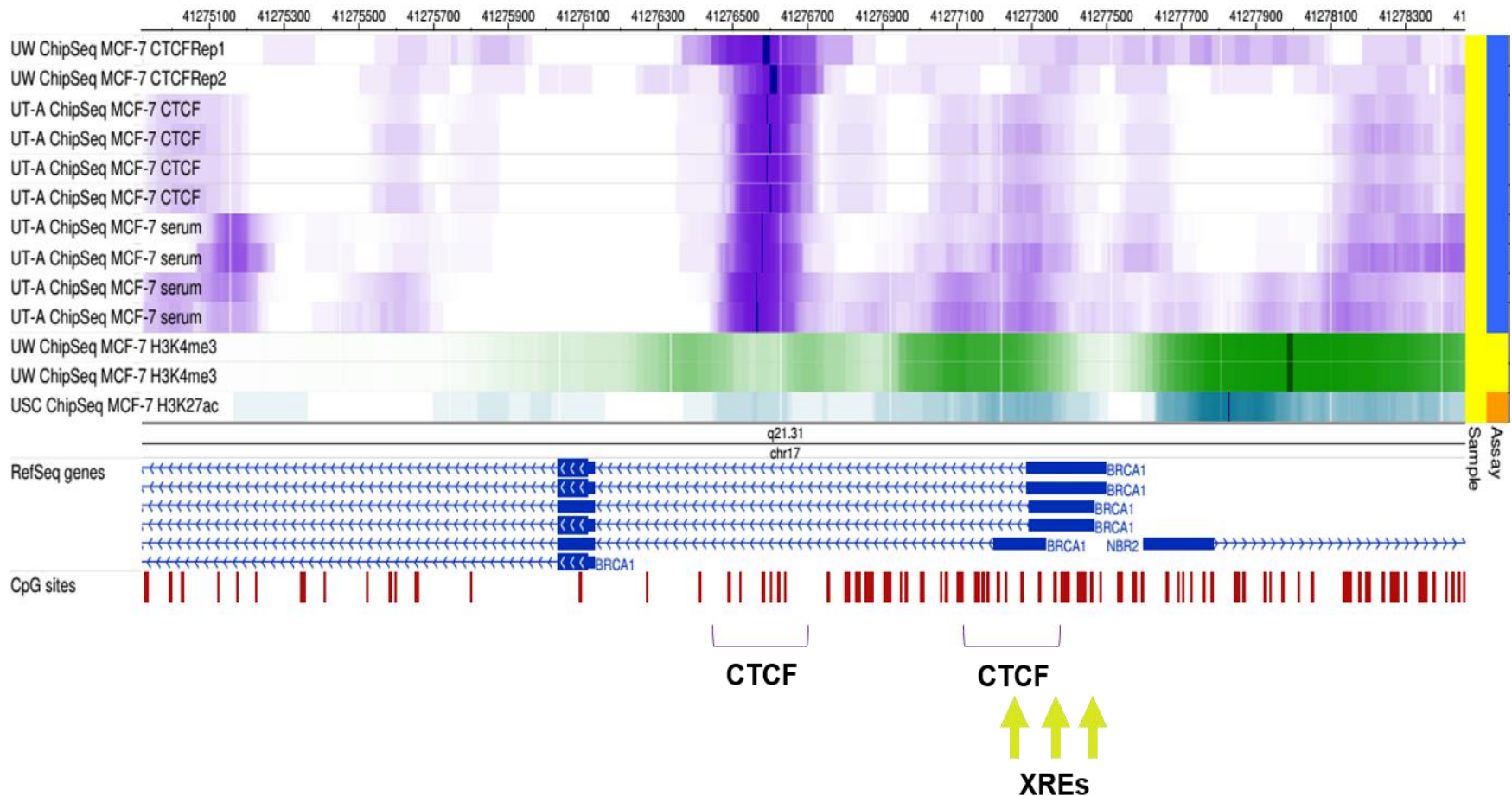


Figura 6. CTCF cuenta con un sitio de unión en el gen de *BRCA1*. Ensayo *in silico* generado con la plataforma WashU Epigenome Browser v 45.1, se muestra el gen de *BRCA1* y ensayos de ChipSeq contra CTCF en células MCF7 sin tratamiento, se observa que existen dos sitios de unión a CTCF en el gen (morado). Además, se muestran ChipSeq de H3K4me3 (verde) y H3K27ac (azul), modificaciones postraduccionales de histonas cuyo enriquecimiento ha sido asociado con regiones de promotores activos. Además, se observa que el promotor de *BRCA1* tiene un alto contenido en sitios CpG. Las flechas verdes señalan los sitios aproximados de los elementos de respuesta a xenobióticos (XREs) que han sido reportados previamente por (Hockings et al., 2006; Papoutsis et al., 2012).

El material particulado PM₁₀ disminuye los niveles de CTCF

Ya que se corroboró que CTCF, así como sus sitios de unión y que puede participar en la regulación de BRCA1, se determinó si las PM₁₀ inducen cambios en los niveles de proteína de CTCF. Células MCF7 fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24 horas y como un primer abordaje se evaluó la localización celular y los niveles de proteína mediante inmunofluorescencia (Figura 7 A). Se observa que las PM₁₀ no modifican la localización subcelular de la proteína CTCF, pero sí disminuyen los niveles (medida por densitometría la intensidad de señal de inmunofluorescencia), en un 32% (** p< 0.005 vs Control), y cuando las células son transfectadas con el siAHR, la disminución se ve revertida (** p< 0.005 vs PM₁₀) (Figura 7 B).

Para corroborar la disminución de los niveles de proteína de CTCF, mediante western blot se evaluaron los niveles de proteína de CTCF en células MCF7 que fueron expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ por 24 horas (Figura 7 C). Observamos que las PM₁₀ inducen una reducción del 70% en los niveles de proteína de CTCF con respecto al control (**p<0.005 vs Control) (Figura 7 D); en cambio, cuando las células son transfectadas con el siAHR y expuestas a 10 µg/cm² de PM₁₀ durante 24 horas, se observa una prevención en la disminución de CTCF inducida por las partículas (*p<0.05 vs PM₁₀). Esto sugiere que las PM₁₀ disminuyen los niveles de CTCF probablemente a través del AHR.

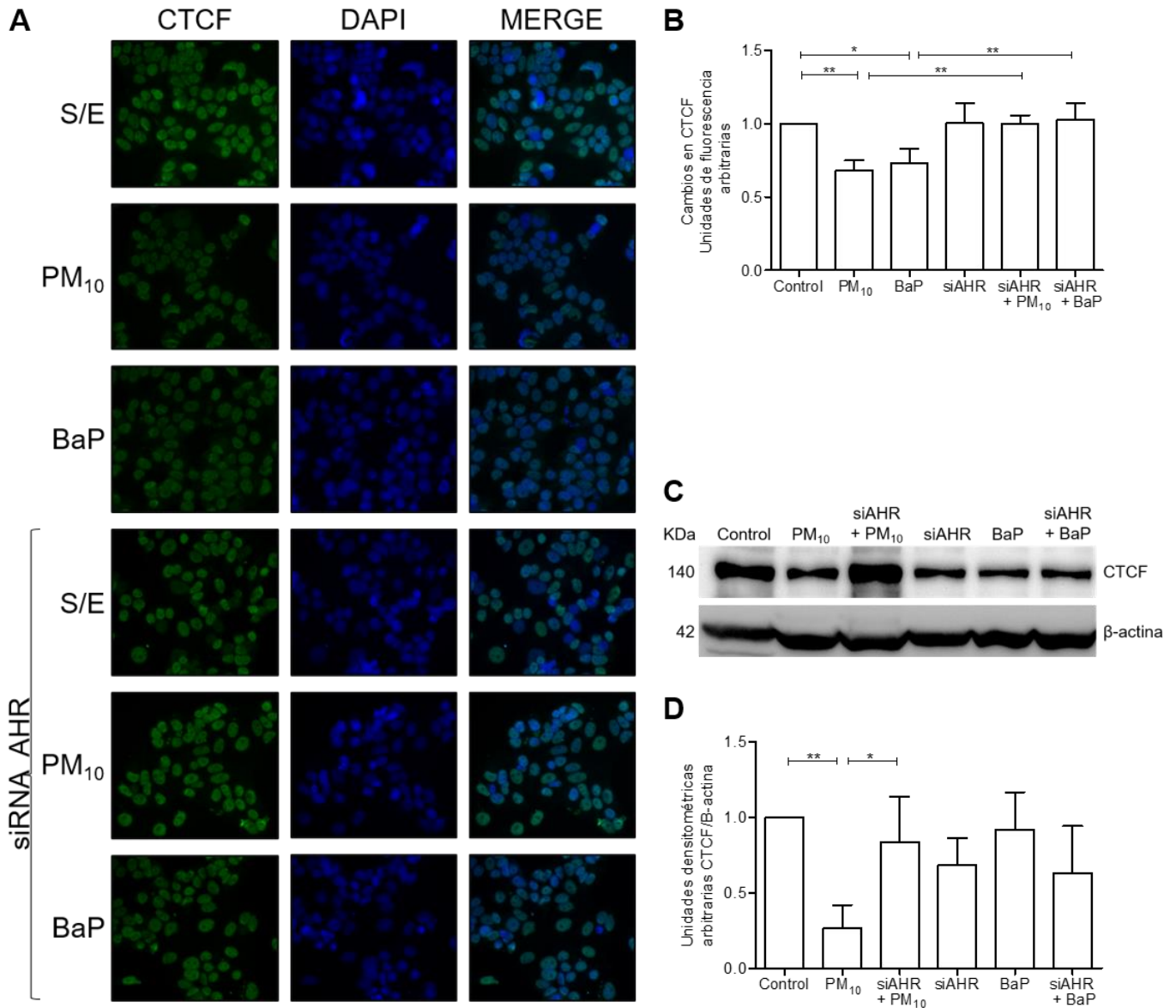


Figura 7. Las PM₁₀ disminuyen los niveles de proteína de CTCF, a través del AHR. Células MCF7 transfectadas o sin transfectar con siRNA dirigido a AHR (100 nM) fueron expuestas a 10µg/cm² de PM₁₀ (CDMX, SUR 2007) durante 24 horas, y a BaP 1µM como control positivo. A) La localización celular de CTCF fue evaluada por inmunofluorescencia B) Análisis densitométrico de la señal de fluorescencia (* p < 0.05, **p < 0.005), n=3. C) Se evaluaron los niveles de proteína de BRCA1 por western blot. Se observa que las a PM₁₀ disminuyen los niveles de la proteína de CTCF, este efecto es prevenido cuando la expresión del AHR es inhibida utilizando el siRNA dirigido a su mRNA. D) C) Análisis densitométrico del western blot contra CTCF (*p < 0.05; ** p < 0.005), n=3.

Análisis *in silico* del estado de metilación del gen *BRCA1* en líneas celulares de mama

Debido a que CTCF protege de un estado de metilación aberrante, se realizó un análisis *in silico* del estado de metilación del DNA en el gen *BRCA1* de líneas celulares provenientes de neoplasias de mama.

El análisis *in silico* se realizó en la plataforma Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE del BROAD Institute). En las 60 líneas celulares de cáncer de mama con las que cuenta la plataforma, entre ellas MCF7, fueron visualizados los estados de metilación del gen de *BRCA1*. Observamos que en todas las líneas celulares existe una barrera que delimita una región metilada (rojo) y una región no metilada (azul), que corresponde al inicio del gen (Figura 8).

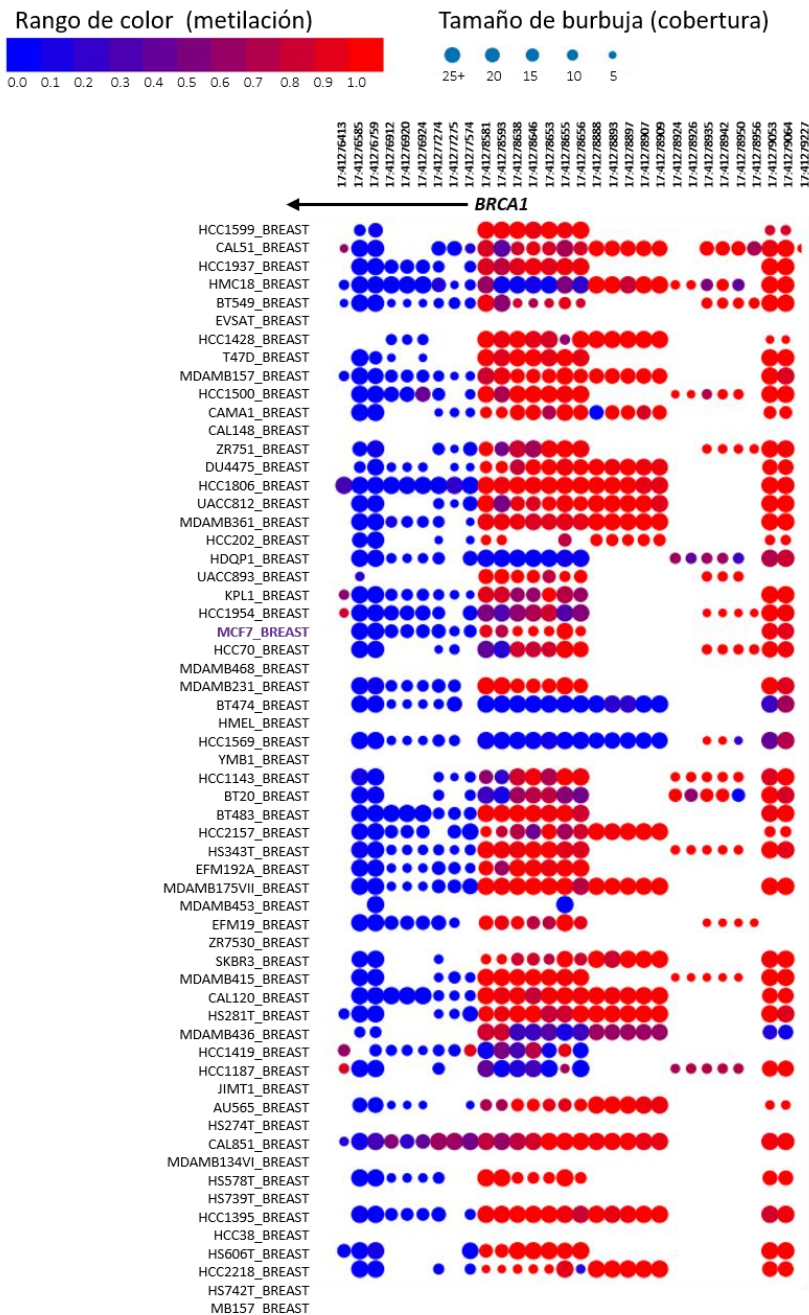


Figura 8. Estado de metilación del gen *BRCA1* en líneas celulares de cáncer de mama. Análisis de los niveles de metilación de DNA en el gen de *BRCA1*, de 60 líneas celulares de cáncer de mama obtenido con la plataforma Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE del BROAD Institute). La flecha señala el inicio del gen *BRCA1*, se observa que las líneas celulares de mama no cuentan con el gen de *BRCA1* hipermetilado. De manera horizontal se muestra la posición de los datos de metilación, verticalmente se muestran las líneas celulares donde se evaluó la metilación (la línea MCF7 se encuentra marcada con color morado). El tamaño de la burbuja representa la cobertura, y el color de la burbuja representa la metilación: los colores más cálidos representan una mayor metilación.

DISCUSIÓN

Las PMs son consideradas como un factor de riesgo principalmente en el desarrollo de cáncer de pulmón (Pope et al., 2002) y la IARC las clasificó como carcinógeno para el ser humano (IARC, 2016; Loomis et al., 2013). Por otra parte, existe evidencia epidemiológica que establece una correlación entre la exposición a PMs y el desarrollo de distintas neoplasias, entre las que se encuentra el cáncer de mama (Bonner et al., 2005; Huo et al., 2013; Mordukhovich et al., 2015; Nie et al., 2007; Parikh and Wei, 2016).

En este trabajo se utilizaron células MCF7, las cuales provienen de un adenocarcinoma mamario, esta línea celular cuenta con características de un epitelio mamario diferenciado (Soule et al., 1973) y ha sido clasificada molecularmente dentro del tipo Luminal A, ya que expresa las proteínas ER y PR (Subik et al., 2010), y cuenta con el gen de BRCA1 sin alteraciones (Elstrodt et al., 2006). Además, las células MCF7 han sido empleadas en el estudio toxicológico de las PMs (Chen et al., 2013; Mahadevan et al., 2005; Matsumoto et al., 2005; Okamura et al., 2002; Ueng et al., 2004). Por lo que se decidió trabajar con esta línea celular.

En este estudio se utilizó una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , trabajos toxicológicos han demostrado que es una concentración sub-letal, capaz de inducir cambios celulares y moleculares sin afectar la viabilidad celular (Chirino et al., 2017; Gualtieri et al., 2011; Reyes-Zárate et al., 2016; Salcido-Neyoy et al., 2015; Sánchez-Pérez et al., 2014). En relación con los estudios toxicológicos realizados en células MCF7, principalmente se han utilizado extractos orgánicos de PST y de partículas de escape de diesel (Chen et al., 2013; Okamura et al., 2002; Ueng et al., 2004); sin embargo, las PMs son una mezcla compleja y los efectos de cada componente podrían ser sinérgicos o antagónicos, por lo que la evaluación de los efectos de la partícula PM_{10} completa es importante de analizar. Adicionalmente, se sabe que la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PMs es el equivalente a una exposición ambiental de 5 días (Li et al., 2003).

Las PMs son una mezcla compleja de contaminantes entre los que se encuentran los HAPs, y reportes demuestran que estos componentes orgánicos debido a su carácter lipofílico pueden depositarse en el tejido adiposo de la mama (Korsh et al., 2015; Morris and Seifter, 1992) y tener un impacto en la carcinogénesis en el tejido mamario (Brody et al., 2007; Rudel et al., 2007). Los mecanismos que desencadenan los HAPs tienen un impacto en la iniciación, promoción y progresión del cáncer (Boström et al., 2002); principalmente a través de la vía del AHR (Dietrich and Kaina, 2010; Feng et al., 2013).

En esta tesis encontramos que las PM₁₀ aumentan los niveles del AHR en células MCF7, esta proteína funciona como factor de transcripción ligando-dependiente de genes cuyas proteínas están encargadas del metabolismo de xenobióticos, entre ellos los HAPs presentes en las partículas. En este sentido, previamente nuestro grupo de trabajo reportó la caracterización de los HAPs presentes en las PM₁₀ de la Ciudad de México (las mismas PMs utilizadas en este trabajo), entre los HAPs que destacan por tener potencial mutagénico y/o carcinogénico son benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a)antraceno y benzo(g,h,i)perileno (Chirino et al., 2017).

La vía de señalización del AHR induce la transcripción de genes que codifican para enzimas de la fase I del metabolismo de xenobióticos, entre ellas CYP1A1 y CYP1B1 (Nebert et al., 2004), se sabe que las PMs inducen el aumento en estas proteínas (Billet et al., 2007; Borgie et al., 2015; Courter et al., 2007a; Líbalová et al., 2014; Salcido-Neyoy et al., 2015). Adicionalmente, en células epiteliales de mama también se han reportado la activación del AHR y un aumento en los niveles de las proteínas CYP1A1 y CYP1B1 tras las exposición a PMs (Chen et al., 2013; Mahadevan et al., 2005). Los HAPs se han asociado al desarrollo de cáncer de mama debido a que algunos de ellos son mutagénicos y/o carcinogénicos, esto a través de la activación del AHR que conlleva a su conversión a diol epóxidos con potencial carcinogénico (Baird et al., 2005). Por otra parte, se sabe que el AHR modula el gen de *BRCA1* a través de su vía no canónica, de ahí nuestro interés en

investigar si el AHR es responsable de alguno de los efectos tras la exposición a PM_{10} .

BRCA1 es una proteína cuya función principal es mantener la integridad genómica de la célula, en el cáncer de mama hereditario la mutación del gen BRCA1 es un factor determinante en el desarrollo de esta neoplasia (Paluch-Shimon et al., 2016); sin embargo, se conoce que en tumores esporádicos la proteína se encuentra ausente o disminuida (Catteau and Morris, 2002). Para entender el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta disminución en tumores esporádicos se realizaron distintos estudios en los cuales se demostró que el promotor de BRCA1 puede ser regulado epigenéticamente mediante la metilación de DNA y el reclutamiento de proteínas modificadoras de la cromatina (Catteau et al., 1999; Rice et al., 1998). En este sentido, se ha demostrado que el AHR puede regular negativamente al gen *BRCA1* por medio de una vía no canónica (Hockings et al., 2006; Jeffy et al., 1999; Papoutsis et al., 2010), a través de su unión en los XREs presentes en la región promotora de BRCA1, reclutando proteínas que llevan a cabo modificaciones epigenéticas que impiden la transcripción del gen (Papoutsis et al., 2012). Los trabajos toxicológicos de las PM_{10} en cáncer de mama aún no han explorado mecanismos por medio de los cuales las partículas puedan alterar genes supresores de tumores.

Encontramos que las PM_{10} disminuyen los niveles de BRCA1 en células MCF7, estos resultados coinciden con reportes donde en células MCF7 expuestas a BaP un ligando del AHR, disminuyen los niveles de mRNA y proteína de BRCA1 y que este efecto es revertido al utilizar α -naftoflavona, un antagonista del AHR (Jeffy et al., 1999). De manera contraria, en este trabajo encontramos que la inhibición de la vía del AHR con siRNAs dirigidos a este no prevenía la disminución de los niveles de BRCA1. Jeffy y colaboradores reportaron que la activación de la vía del AHR no es suficiente para la represión transcripcional de *BRCA1*, sino que es reprimido a través del metabolito diol epóxido del BaP; aunque no descartan la posibilidad de que sea a través de la unión del AHR activado en el promotor de BRCA1 (Jeffy et al., 2002). El complejo AHR/ARNT activado por TCDD al unirse en los XREs es

capaz de reclutar proteínas modificadoras de la cromatina que inducen la metilación del DNA y de esta manera la inactivación del gen, lo cual se previno al utilizar resveratrol, un antagonista del AHR (Papoutsis et al., 2010, 2012). A pesar de lo anterior, nuestros resultados sugieren que el AHR no está involucrado en la disminución de BRCA1 tras la exposición a PM₁₀; esto puede ser explicado ya que los trabajos donde se ha reportado esta interacción han utilizado de manera individual diferentes agonistas del AHR, como TCDD y BaP (Jeffy et al., 1999; Papoutsis et al., 2012), y a diferencia de nuestro trabajo donde utilizamos una mezcla compleja, que si bien cuentan con compuestos orgánicos agonistas del AHR como HAPs y dioxinas (Kelly and Fussell, 2012), contienen otros componentes que pudieran estar formando sinergismos y antagonismos (Courter et al., 2007b; Pushparajah and Ioannides, 2018; Yu et al., 2018), esto sugiere que además de evaluar el efecto de los HAPs, se deben considerar los efectos de la mezcla.

Debido a que en este trabajo no se observó una participación del AHR en la disminución de los niveles de BRCA1 inducido por las PM₁₀, decidimos explorar otros mecanismos que nos pudieran explicar la disminución de los niveles de BRCA1; para ello, se realizó un análisis *in silico* para localizar moduladores de este gen.

A través de la evaluación *in silico* del promotor del gen en la línea celular MCF7 y observamos que existen dos sitios de unión de CTCF en el cuerpo del gen de *BRCA1*. De manera similar, Butcher reportó dos sitios de unión de CTCF en el promotor de BRCA1 (Butcher et al., 2004). Por otro lado, los XREs presentes en el gen de *BRCA1*, se encuentran en el exón 1a y 1b del gen y se desconoce si la unión del complejo activo AHR/ARNT en estos sitios puede tener interacción con CTCF. Por lo que en este trabajo nos interesamos en evaluar el efecto inducido por las PM₁₀ en los niveles de CTCF y si los cambios son a través de la vía del AHR.

Entre las funciones de CTCF están las de activador o represor transcripcional, como insulador, como organizador genómico con la formación de dominios de cromatina, y como barrera para evitar la propagación de marcas de histonas represoras y de la metilación del DNA (Espinoza and Ren, 2011; Filippova, 2007; Recillas-Targa,

2006). Es conocido que a través de la metilación del DNA en la región del promotor puede contribuir a una reducción en la expresión del gen *BRCA-1* en cánceres de mama esporádicos (Catteau et al., 1999). En este sentido, la célula cuenta con mecanismos que permiten la modulación transcripcional de genes supresores de tumores, como es la función de CTCF.

En este trabajo encontramos que las PM_{10} disminuyen los niveles de la proteína CTCF y que la disminución de estos niveles se ven prevenidos al inhibir la expresión de AHR. Con esto, hipotetizamos que las PM_{10} de manera indirecta podría estar disminuyendo los niveles de *BRCA1* a través de la metilación de su promotor, por lo que si se pierde la unión de CTCF en el gen de *BRCA1*, esto permitiría la metilación en el promotor, reprimiendo la transcripción de *BRCA1*. En este sentido, se ha reportado que tanto la pérdida funcional de CTCF como la metilación del DNA del promotor, pueden contribuir en la pérdida de fronteras de metilación en el gen de *BRCA1*, y por esta vía favorecer el desarrollo de neoplasias esporádicas de mama (Butcher et al., 2004).

Los resultados presentados sugieren que a través del AHR, las PMs pueden de regular los niveles de CTCF, a través de una posible interacción entre ambas proteínas. Sin embargo, existe poca evidencia sobre la relación entre las proteínas AHR y CTCF, estudios reportan que la función de insulador del retrotransposón B1-X35S SINE es mediada a través de la interacción de las proteínas AHR, SLUG y CTCF en sus sitios de unión (Roman et al., 2011). Si bien estos reportes y nuestros resultados apuntan que existe una interacción entre ambas proteínas, es importante profundizar y dilucidar los posibles mecanismos de esta interacción en la regulación epigenética en el gen de *BRCA1* por la exposición a PM_{10} .

Por lo anterior, es importante profundizar en el estudio de la regulación epigenética de *BRCA1* por contaminantes ambientales que nos puedan ayudar a explicar la asociación entre la exposición a PMs y el desarrollo de cáncer de mama esporádico.

Finalmente, nos interesamos en explorar el estado de metilación en el promotor del gen *BRCA1* en líneas celulares, por lo que por medio de un análisis *in silico* evaluamos los niveles de metilación de las líneas celulares de cáncer de mama,

entre ellas la línea celular MCF7 utilizada en este trabajo, y encontramos que las células MCF7 cuentan con el gen de *BRCA1* sin presentar metilación, esto nos indica la importancia de evaluar si las PM_{10} favorecen un estado de metilación del promotor de *BRCA1*, a través de la pérdida de CTCF.

CONCLUSIONES

- La exposición a $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} en células de cáncer de mama MCF7 por 24 horas, induce el aumento de los niveles de mRNA y proteína del AHR.
- Las PM_{10} disminuyen los niveles de proteína de BRCA1 y de CTCF.
- Las PM_{10} a través del AHR son capaces de regular los niveles de CTCF, y de manera indirecta los niveles de BRCA1.

Estos resultados pueden ser un inicio que nos puedan ayudar a entender como las partículas pueden favorecer el desarrollo de cáncer de mama esporádico.

PERSPECTIVAS

- Evaluar las proteínas blanco de la activación del AHR, como CYP1A1 y CYP1B1.
- Evaluar el estado de metilación del promotor de BRCA1 en células MCF7 expuestas a PM_{10} .
- Caracterizar la unión al DNA del AHR y CTCF en el gen de *BRCA1* mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, en células MCF7 expuestas a PM_{10} .
- Determinar el mecanismo mediante el cual el AHR regula los niveles de CTCF, y de manera indirecta de BRCA1.

REFERENCIAS

- Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Bonner, J.C., Murray, J.C., Rosas, I., Rosales, S.P. de L., and Osornio-Vargas, A.R. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ. Health Perspect.* *110*, 715–720.
- Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martínez, L., García-Cuellar, C., Nawrot, T.S., Vanaudenaerde, B., Hoet, P., Ramírez-López, P., Rosas, I., et al. (2009). Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ. Res.* *109*, 528–535.
- Allis, C.D., Caparros, M.-L., Jenuwein, T., and Reinberg, D. (2015). *Epigenetics* (Cold Spring Harbor, New York: CSH Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Apostolou, P., and Fostira, F. (2013). Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Res. Int.* *2013*, 1–11.
- Atkinson, R.W., Anderson, H.R., Sunyer, J., Ayres, J., Baccini, M., Vonk, J.M., Boumghar, A., Forastiere, F., Forsberg, B., Touloumi, G., et al. (2001). Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach. Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 1860–1866.
- Baccarelli, A., Wright, R.O., Bollati, V., Tarantini, L., Litonjua, A.A., Suh, H.H., Zanobetti, A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., and Schwartz, J. (2009). Rapid DNA Methylation Changes after Exposure to Traffic Particles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *179*, 572–578.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., and Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* *45*, 106–114.
- Barry, R., Chorley, R., Barry, R.G., and Chorley, T. late R. (2003). *Atmosphere, Weather and Climate*.
- Bartley, J., Bartholomew, J.C., and Stampfer, M.R. (1982). Metabolism of benzo(a)pyrene by human epithelial and fibroblastic cells: metabolite patterns and DNA adduct formation. *J. Cell. Biochem.* *18*, 135–148.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., and Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM2.5): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res.* *105*, 212–223.

Birgisdottir, V., Stefansson, O.A., Bodvarsdottir, S.K., Hilmarsdottir, H., Jonasson, J.G., and Eyfjord, J.E. (2006). Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 8.

Bock, F.G., and Dao, T.L. (1961). Factors Affecting the Polynuclear Hydrocarbon Level in Rat Mammary Glands. *Cancer Res.* 21, 1024.

Bonner, M.R., Han, D., Nie, J., Rogerson, P., Vena, J.E., Muti, P., Trevisan, M., Edge, S.B., and Freudenheim, J.L. (2005). Breast cancer risk and exposure in early life to polycyclic aromatic hydrocarbons using total suspended particulates as a proxy measure. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 14, 53–60.

Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D., and Dagher, Z. (2015). Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environ. Res.* 136, 352–362.

Boström, C.-E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., and Westerholm, R. (2002). Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. *Environ. Health Perspect.* 110, 451–489.

Bourdrel, T., Bind, M.-A., Béjot, Y., Morel, O., and Argacha, J.-F. (2017). Cardiovascular effects of air pollution. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 110, 634–642.

Brody, J.G., Moysich, K.B., Humblet, O., Attfield, K.R., Beehler, G.P., and Rudel, R.A. (2007). Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer* 109, 2667–2711.

Brook, R.D. (2004). Air Pollution and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109, 2655–2671.

Brown, J.S., Gordon, T., Price, O., and Asgharian, B. (2013). Thoracic and respirable particle definitions for human health risk assessment. Part. *Fibre Toxicol.* 10, 12.

Brunekreef, B., and Forsberg, B. (2005). Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur. Respir. J.* 26, 309–318.

Butcher, D.T., and Rodenhiser, D.I. (2007). Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur. J. Cancer* 43, 210–219.

Butcher, D.T., Mancini-DiNardo, D.N., Archer, T.K., and Rodenhiser, D.I. (2004). DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int. J. Cancer* 111, 669–678.

Cao, J., Qin, G., Shi, R., Bai, F., Yang, G., Zhang, M., and Lv, J. (2016). Overproduction of reactive oxygen species and activation of MAPKs are involved in apoptosis induced by PM_{2.5} in rat cardiac H9c2 cells. *J. Appl. Toxicol.* *JAT* 36, 609–617.

Castano-Vinyals, G., Cantor, K.P., Malats, N., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Rothman, N., Vermeulen, R., Silverman, D., et al. (2008). Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. *Occup. Environ. Med.* 65, 56–60.

Catteau, A., and Morris, J.R. (2002). BRCA1 methylation: a significant role in tumour development? *Semin. Cancer Biol.* 12, 359–371.

Catteau, A., Harris, W.H., Xu, C.-F., and Solomon, E. (1999). Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18, 1957–1965.

Chávarri-Guerra, Y., Villarreal-Garza, C., Liedke, P.E., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D.M., and Goss, P.E. (2012). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol.* 13, e335–e343.

Chen, S.-T., Lin, C.-C., Liu, Y.-S., Lin, C., Hung, P.-T., Jao, C.-W., and Lin, P.-H. (2013). Airborne particulate collected from central Taiwan induces DNA strand breaks, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and estrogen-disrupting activity in human breast carcinoma cell lines. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 48, 173–181.

Chen, X., Zhang, L., Huang, J., Song, F., Zhang, L., Qian, Z., Trevathan, E., Mao, H., Han, B., Vaughn, M., et al. (2016). Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: A 12-year cohort study in Northern China. *Sci. Total Environ.* 571, 855–861.

Chirino, Y.I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Morales-Bárcenas, R., Gutiérrez-Ruíz, M.C., Segura-García, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., and García-Cuellar, C.M. (2010). PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol. Lett.* 193, 209–216.

Chirino, Y.I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á.R., Rosas, I., and García-Cuellar, C.M. (2015). Sampling and composition of airborne particulate matter (PM₁₀) from two locations of Mexico City. *Data Brief* 4, 353–356.

Chirino, Y.I., García-Cuellar, C.M., García-García, C., Soto-Reyes, E., Osornio-Vargas, Á.R., Herrera, L.A., López-Saavedra, A., Miranda, J., Quintana-Belmares, R., Pérez, I.R., et al. (2017). 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.

Courter, L.A., Pereira, C., and Baird, W.M. (2007a). Diesel exhaust influences carcinogenic PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 625, 72–82.

Courter, L.A., Musafia-Jeknic, T., Fischer, K., Bildfell, R., Giovanini, J., Pereira, C., and Baird, W.M. (2007b). Urban Dust Particulate Matter Alters PAH-Induced Carcinogenesis by Inhibition of CYP1A1 and CYP1B1. *Toxicol. Sci.* 95, 63–73.

Cutter, A.R., and Hayes, J.J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* 589, 2914–2922.

De La Rosa-Velázquez, I.A., Rincón-Arano, H., Benítez-Bribiesca, L., and Recillas-Targa, F. (2007). Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* 67, 2577–2585.

De Prins, S., Koppen, G., Jacobs, G., Dons, E., Van de Mieroop, E., Nelen, V., Fierens, F., Int Panis, L., De Boever, P., Cox, B., et al. (2013). Influence of ambient air pollution on global DNA methylation in healthy adults: A seasonal follow-up. *Environ. Int.* 59, 418–424.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022.

Denis, H., Ndlovu, M.N., and Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.* 12, 647–656.

Dietrich, C., and Kaina, B. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* 31, 1319–1328.

DiNardo, D.N.M., Butcher, D.T., Robinson, D.P., Archer, T.K., and Rodenhiser, D.I. (2001). Functional analysis of CpG methylation in the BRCA1 promoter region. *Oncogene* 20, 5331–5340.

Ding, R., Jin, Y., Liu, X., Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, T., and Xu, Y. (2016). Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 796, 46–53.

Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J.A., Jimenez, L.A., Gilmour, P.S., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Rahman, I., Faux, S.P., Brown, D.M., et al. (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1369–1382.

Eberharter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep.* 3, 224–229.

van Eeden, S.F., Tan, W.C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R., and Hogg, J.C. (2001). Cytokines involved in the systemic inflammatory

response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 826–830.

Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J.H.A., Gorin, M., Wasielewski, M., Ouweland, A. van den, Merajver, S.D., Ethier, S.P., and Schutte, M. (2006). BRCA1 Mutation Analysis of 41 Human Breast Cancer Cell Lines Reveals Three New Deleterious Mutants. *Cancer Res.* *66*, 41–45.

Espinoza, C.A., and Ren, B. (2011). Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nat. Genet.* *43*, 615.

Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 564–569.

Falcon-Rodriguez, C.I., Osornio-Vargas, A.R., Sada-Ovalle, I., and Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front. Immunol.* *7*.

Feng, S., Cao, Z., and Wang, X. (2013). Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1836*, 197–210.

Ferreira, T., Forti, M., de Freitas, C., Nascimento, F., Junger, W., and Gouveia, N. (2016). Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *13*, 947.

Fidler, M.M., Gupta, S., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., and Bray, F. (2017). Cancer incidence and mortality among young adults aged 20-39 years worldwide in 2012: a population-based study. *Lancet Oncol.* *18*, 1579–1589.

Filippova, G.N. (2007). Genetics and Epigenetics of the Multifunctional Protein CTCF. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 337–360.

Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., and Lobanenko, V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2802–2813.

Futreal, P., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y., et al. (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* *266*, 120–122.

García-Cuellar, C., Alfaro-Moreno, E., Martínez-Romero, F., Rosales, S.P.D.L., Rosas, I., Cárdenas, E.P., and Osornio-Vargas, A.R. (2002). DNA Damage Induced by PM 10 from Different Zones of Mexico City. *Ann. Occup. Hyg.* *46*, 425–428.

Gilmour, P.S., Rahman, I., Donaldson, K., and MacNee, W. (2003). Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L533–L540.

Gualtieri, M., Øvrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini, M., and Holme, J.A. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM_{2.5}) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 713, 18–31.

Henderson, B.R. (2012). The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica* 2012, 1–15.

Henderson, B.E., and Feigelson, H.S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427–433.

Hockings, J.K., Thorne, P.A., Kemp, M.Q., Morgan, S.S., Selmin, O., and Romagnolo, D.F. (2006). The Ligand Status of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Modulates Transcriptional Activation of BRCA-1 Promoter by Estrogen. *Cancer Res.* 66, 2224–2232.

Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res. BCR* 13, 215.

Hu, H., Dailey, A.B., Kan, H., and Xu, X. (2013). The effect of atmospheric particulate matter on survival of breast cancer among US females. *Breast Cancer Res. Treat.* 139, 217–226.

Huang, F., Luo, Y., Guo, Y., Tao, L., Xu, Q., Wang, C., Wang, A., Li, X., Guo, J., Yan, A., et al. (2016). Particulate Matter and Hospital Admissions for Stroke in Beijing, China: Modification Effects by Ambient Temperature. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e003437.

Huen, M.S.Y., Sy, S.M.H., and Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 138–148.

Hung, L.-J. (2012). Traffic Air Pollution and Risk of Death from Breast Cancer in Taiwan: Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) as a Proxy Marker. *Aerosol Air Qual. Res.*

Huo, Q., Zhang, N., Wang, X., Jiang, L., Ma, T., and Yang, Q. (2013). Effects of Ambient Particulate Matter on Human Breast Cancer: Is Xenogenesis Responsible? *PLoS ONE* 8, e76609.

IARC (2016). Outdoor air pollution (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization).

Illingworth, R.S., and Bird, A.P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583, 1713–1720.

Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., and Belpomme, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 61, 640–658.

Jacobson, M.Z. (2002). *Atmospheric pollution: history, science, and regulation* (Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press).

Jeffy, B.D., Schultz, E.U., Selmin, O., Gudas, J.M., Bowden, G.T., and Romagnolo, D. (1999). Inhibition of BRCA-1 expression by benzo[a]pyrene and its diol epoxide. *Mol. Carcinog.* 26, 100–118.

Jeffy, B.D., Chirnomas, R.B., Chen, E.J., Gudas, J.M., and Romagnolo, D.F. (2002). Activation of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Pathway Is Not Sufficient for Transcriptional Repression of BRCA-1: Requirements for Metabolism of Benzo[a]pyrene to 7r,8t-Dihydroxy-9t,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Cancer Res.* 62, 113–121.

Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2017). The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp. Anim.* 66, 75–89.

Kazanets, A., Shorstova, T., Hilmi, K., Marques, M., and Witcher, M. (2016). Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1865, 275–288.

Kelly, F.J., and Fussell, J.C. (2012). Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos. Environ.* 60, 504–526.

Khan, N., Afaq, F., and Mukhtar, H. (2010). Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett.* 293, 133–143.

Khoo, U.-S., Ozcelik, H., Cheung, A.N., Chow, L.W., Ngan, H.Y., Done, S.J., Liang, A.C.T., Chan, V.W., Au, G.K., Ng, W.-F., et al. (1999). Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 18, 4643–4646.

Kim, K.-H., Kabir, E., and Kabir, S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* 74, 136–143.

Kloog, I., Coull, B.A., Zanobetti, A., Koutrakis, P., and Schwartz, J.D. (2012). Acute and Chronic Effects of Particles on Hospital Admissions in New-England. *PLoS ONE* 7, e34664.

Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., and Schins, R.P.F. (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 317–326.

Korsh, J., Shen, A., Aliano, K., and Davenport, T. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Breast Cancer: A Review of the Literature. *Breast Care* 10, 316–318.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705.

Künzli, N., Jerrett, M., Mack, W.J., Beckerman, B., LaBree, L., Gilliland, F., Thomas, D., Peters, J., and Hodis, H.N. (2004). Ambient Air Pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. *Environ. Health Perspect.* 113, 201–206.

Li, D., Wang, M., Dhingra, K., and Hittelman, W.N. (1996). Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer Res.* 56, 287–293.

Li, N., Hao, M., Phalen, R.F., Hinds, W.C., and Nel, A.E. (2003). Particulate air pollutants and asthma. *Clin. Immunol.* 109, 250–265.

Li, Q., Wei, W., Jiang, Y., Yang, H., and Liu, J. (2015a). Promoter methylation and expression changes of BRCA1 in cancerous tissues of patients with sporadic breast cancer. *Oncol. Lett.* 9, 1807–1813.

Li, R., Kou, X., Xie, L., Cheng, F., and Geng, H. (2015b). Effects of ambient PM2.5 on pathological injury, inflammation, oxidative stress, metabolic enzyme activity, and expression of c-fos and c-jun in lungs of rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 20167–20176.

Líbalová, H., Krčková, S., Uhlířová, K., Kléma, J., Ciganek, M., Rössner, P., Šrám, R.J., Vondráček, J., Machala, M., and Topinka, J. (2014). Analysis of gene expression changes in A549 cells induced by organic compounds from respirable air particles. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 770, 94–105.

Löndahl, J., Pagels, J., Swietlicki, E., Zhou, J., Ketznel, M., Massling, A., and Bohgard, M. (2006). A set-up for field studies of respiratory tract deposition of fine and ultrafine particles in humans. *J. Aerosol Sci.* 37, 1152–1163.

Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., et al. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14, 1262–1263.

Lux, M.P., Fasching, P.A., and Beckmann, M.W. (2006). Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J. Mol. Med.* 84, 16–28.

Madrigano, J., Baccarelli, A., Mittleman, M.A., Wright, R.O., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Tarantini, L., and Schwartz, J. (2011). Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environ. Health Perspect.* 119, 977–982.

Mahadevan, B., Keshava, C., Musafia-Jeknic, T., Pecaj, A., Weston, A., and Baird, W.M. (2005). Altered Gene Expression Patterns in MCF-7 Cells Induced by the Urban Dust Particulate Complex Mixture Standard Reference Material 1649a. *Cancer Res.* *65*, 1251–1258.

Mancini, D.N., Rodenhiser, D.I., Ainsworth, P.J., O'Malley, F.P., Singh, S.M., Xing, W., and Archer, T.K. (1998). CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene* *16*, 1161–1169.

Manzano-León, N., Quintana, R., Sánchez, B., Serrano, J., Vega, E., Vázquez-López, I., Rojas-Bracho, L., López-Villegas, T., O'Neill, M.S., Vadillo-Ortega, F., et al. (2013). Variation in the Composition and In Vitro Proinflammatory Effect of Urban Particulate Matter from Different Sites. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *27*, 87–97.

Manzano-León, N., Serrano-Lomelin, J., Sánchez, B.N., Quintana-Belmares, R., Vega, E., Vázquez-López, I., Rojas-Bracho, L., López-Villegas, M.T., Vadillo-Ortega, F., De Vizcaya-Ruiz, A., et al. (2015). TNF α and IL-6 Responses to Particulate Matter in Vitro: Variation According to PM Size, Season, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon and Soil Content. *Environ. Health Perspect.* *124*.

Matsumoto, H., Adachi, S., and Suzuki, Y. (2005). Bisphenol A in Ambient Air Particulates Responsible for the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Its Concentration Changes over 6 Months. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *48*, 459–466.

McPherson, K., Steel, C.M., and Dixon, J.M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* *321*, 624–628.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., and Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* *266*, 66–71.

Moore, L.D., Le, T., and Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *38*, 23–38.

Mordukhovich, I., Beyea, J., Herring, A.H., Hatch, M., Stellman, S.D., Teitelbaum, S.L., Richardson, D.B., Millikan, R.C., Engel, L.S., Shantakumar, S., et al. (2015). Vehicular Traffic-Related Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure and Breast Cancer Incidence: The Long Island Breast Cancer Study Project (LIBCSP). *Environ. Health Perspect.* *124*.

Morris, J.J., and Seifter, E. (1992). The role of aromatic hydrocarbons in the genesis of breast cancer. *Med. Hypotheses* *38*, 177–184.

Mueller, C.R., and Roskelley, C.D. (2002). Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* *5*.

Mustafić, H., Jabre, P., Caussin, C., Murad, M.H., Escolano, S., Tafflet, M., Périer, M.-C., Marijon, E., Vernerey, D., Empana, J.-P., et al. (2012). Main Air Pollutants and Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 307, 713.

Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., and Gonzalez, F.J. (2004). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850.

Nie, J., Beyea, J., Bonner, M.R., Han, D., Vena, J.E., Rogerson, P., Vito, D., Muti, P., Trevisan, M., Edge, S.B., et al. (2007). Exposure to traffic emissions throughout life and risk of breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. *Cancer Causes Control CCC* 18, 947–955.

Okamura, K., Kizu, R., Toriba, A., Klinge, C.M., and Hayakawa, K. (2002). Antiestrogenic Activity of Extracts of Diesel Exhaust Particulate Matter in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells. *Polycycl. Aromat. Compd.* 22, 747–759.

Osornio-Vargas, A.R., Bonner, J.C., Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Ponce-de-León Rosales, S., Miranda, J., and Rosas, I. (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ. Health Perspect.* 111, 1289–1293.

Paluch-Shimon, S., Cardoso, F., Sessa, C., Balmana, J., Cardoso, M.J., Gilbert, F., and Senkus, E. (2016). Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening†. *Ann. Oncol.* 27, v103–v110.

Papoutsis, A.J., Lamore, S.D., Wondrak, G.T., Selmin, O.I., and Romagnolo, D.F. (2010). Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. *J. Nutr.* 140, 1607–1614.

Papoutsis, A.J., Borg, J.L., Selmin, O.I., and Romagnolo, D.F. (2012). BRCA-1 promoter hypermethylation and silencing induced by the aromatic hydrocarbon receptor-ligand TCDD are prevented by resveratrol in MCF-7 cells. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1324–1332.

Parikh, P.V., and Wei, Y. (2016). PAHs and PM_{2.5} emissions and female breast cancer incidence in metro Atlanta and rural Georgia. *Int. J. Environ. Health Res.* 26, 458–466.

Phillips, J.E., and Corces, V.G. (2009). CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* 137, 1194–1211.

Pope, C.A. (2000). Epidemiology of Fine Particulate Air Pollution and Human Health: Biologic Mechanisms and Who's at Risk? *Environ. Health Perspect.* 108, 713.

- Pope, C.A., and Dockery, D.W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 1995 56, 709–742.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G.D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 1132–1141.
- Porter, P. (2008). “Westernizing” Women’s Risks? Breast Cancer in Lower-Income Countries. *N. Engl. J. Med.* 358, 213–216.
- Prokhortchouk, E., and Defossez, P.-A. (2008). The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1783, 2167–2173.
- Pushparajah, D., and Ioannides, C. (2018). Antagonistic and synergistic interactions during the binding of binary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons to the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. In Vitro*.
- Rakha, E.A., Pinder, S.E., Paish, C.E., and Ellis, I.O. (2004). Expression of the transcription factor CTCF in invasive breast cancer: a candidate gene located at 16q22.1. *Br. J. Cancer* 91, 1591–1596.
- Recillas-Targa, F. (2006). Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 10.
- Reyes-Zárata, E., Sánchez-Pérez, Y., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Morales-Bárcenas, R., Souza-Arroyo, V., and García-Cuellar, C.M. (2016). 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. Barking Essex 1987* 214, 646–656.
- Rice, J.C., and Futscher, B.W. (2000). Transcriptional repression of BRCA1 by aberrant cytosine methylation, histone hypoacetylation and chromatin condensation of the BRCA1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 28, 3233–3239.
- Rice, J.C., Massey-Brown, K.S., and Futscher, B.W. (1998). Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 17, 1807–1812.
- Rice, J.C., Ozcelik, H., Maxeiner, P., Andrulis, I., and Futscher, B.W. (2000). Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 21, 1761–1765.
- Rodriguez, C., Borgel, J., Court, F., Cathala, G., Forné, T., and Piette, J. (2010). CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 129–134.

Romagnolo, D.F., Papoutsis, A.J., Laukaitis, C., and Selmin, O.I. (2015). Constitutive expression of AhR and BRCA-1 promoter CpG hypermethylation as biomarkers of ER α -negative breast tumorigenesis. *BMC Cancer* 15, 1026.

Roman, A.C., Gonzalez-Rico, F.J., Molto, E., Hernando, H., Neto, A., Vicente-Garcia, C., Ballestar, E., Gomez-Skarmeta, J.L., Vavrova-Anderson, J., White, R.J., et al. (2011). Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch. *Genome Res.* 21, 422–432.

Rosas Pérez, I., Serrano, J., Alfaro-Moreno, E., Baumgardner, D., García-Cuellar, C., Martín Del Campo, J.M., Raga, G.B., Castillejos, M., Colín, R.D., and Osornio Vargas, A.R. (2007). Relations between PM10 composition and cell toxicity: a multivariate and graphical approach. *Chemosphere* 67, 1218–1228.

Roy, R., Chun, J., and Powell, S.N. (2011). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* 12, 68–78.

Rudel, R.A., Attfield, K.R., Schifano, J.N., and Brody, J.G. (2007). Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer* 109, 2635–2666.

Rui, W., Guan, L., Zhang, F., Zhang, W., and Ding, W. (2016). PM2.5-induced oxidative stress increases adhesion molecules expression in human endothelial cells through the ERK/AKT/NF- κ B-dependent pathway. *J. Appl. Toxicol. JAT* 36, 48–59.

Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Salcido-Neyoy, M.E., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsebatt, M.E., Meléndez-Zajgla, J., Morales-Bárceñas, R., Petrosyan, P., Molina-Servin, E.D., Vega, E., Manzano-León, N., et al. (2015). Induction of c-Jun by air particulate matter (PM₁₀) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 203, 175–182.

Samoli, E., Peng, R., Ramsay, T., Pipikou, M., Touloumi, G., Dominici, F., Burnett, R., Cohen, A., Krewski, D., Samet, J., et al. (2008). Acute Effects of Ambient Particulate Matter on Mortality in Europe and North America: Results from the APHENA Study. *Environ. Health Perspect.* 116, 1480–1486.

Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruíz, C., Vázquez-López, I., and García-Cuellar, C.M. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett.* 278, 192–200.

Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., Osornio-Vargas, Á.R., Herrera, L.A., Morales-Bárcenas, R., López-Saavedra, A., González-Ramírez, I., Miranda, J., and García-Cuellar, C.M. (2014). Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM(10)) exposure in lung cells. *Toxicol. Lett.* 225, 12–19.

Seinfeld, J.H., and Pandis, S.N. (2016). *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change* (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc).

Shah, A.S., Langrish, J.P., Nair, H., McAllister, D.A., Hunter, A.L., Donaldson, K., Newby, D.E., and Mills, N.L. (2013). Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 382, 1039–1048.

Shah, A.S.V., Lee, K.K., McAllister, D.A., Hunter, A., Nair, H., Whiteley, W., Langrish, J.P., Newby, D.E., and Mills, N.L. (2015). Short term exposure to air pollution and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* h1295.

Shimada, T., and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1–6.

Slavin, T.P., Maxwell, K.N., Lilyquist, J., Vijai, J., Neuhausen, S.L., Hart, S.N., Ravichandran, V., Thomas, T., Maria, A., Villano, D., et al. (2017). The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *Npj Breast Cancer* 3, 22.

Soberanes, S., Gonzalez, A., Urich, D., Chiarella, S.E., Radigan, K.A., Osornio-Vargas, A., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Ridge, K.M., Chandel, N.S., et al. (2012). Particulate matter Air Pollution induces hypermethylation of the p16 promoter Via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Sci. Rep.* 2.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416.

Starita, L.M., and Parvin, J.D. (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 345–350.

Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., et al. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 4, 35–41.

Tagliabue, G., Borgini, A., Tittarelli, A., van Donkelaar, A., Martin, R.V., Bertoldi, M., Fabiano, S., Maghini, A., Codazzi, T., Scaburri, A., et al. (2016). Atmospheric fine particulate matter and breast cancer mortality: a population-based cohort study. *BMJ Open* 6, e012580.

Tarantini, L., Bonzini, M., Apostoli, P., Pegoraro, V., Bollati, V., Marinelli, B., Cantone, L., Rizzo, G., Hou, L., Schwartz, J., et al. (2009). Effects of Particulate Matter on Genomic DNA Methylation Content and iNOS Promoter Methylation. *Environ. Health Perspect.* *117*, 217–222.

Tecer, L.H., Alagha, O., Karaca, F., Tuncel, G., and Eldes, N. (2008). Particulate Matter (PM_{2.5}, PM_{10-2.5}, and PM₁₀) and Children's Hospital Admissions for Asthma and Respiratory Diseases: A Bidirectional Case-Crossover Study. *J. Toxicol. Environ. Health A* *71*, 512–520.

Topinka, J., Rossner, P., Milcova, A., Schmuczerova, J., Svecova, V., and Sram, R.J. (2011). DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM_{2.5} in an acellular assay. *Toxicol. Lett.* *202*, 186–192.

Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A., et al. (2007). BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* *26*, 2126–2132.

Ueng, T.-H., Wang, H.-W., Huang, Y.-P., and Hung, C.-C. (2004). Antiestrogenic Effects of Motorcycle Exhaust Particulate in MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Immature Female Rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *46*.

Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., and Kamp, D.W. (2003). Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *29*, 180–187.

U.S. EPA. (2004). Air Quality Criteria for Particulate Matter (Final Report, 2004). (Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency).

Venkitaraman, A.R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* *108*, 171–182.

Victoria-Acosta, G., Vazquez-Santillan, K., Jimenez-Hernandez, L., Muñoz-Galindo, L., Maldonado, V., Martinez-Ruiz, G.U., and Melendez-Zajgla, J. (2015). Epigenetic silencing of the XAF1 gene is mediated by the loss of CTCF binding. *Sci. Rep.* *5*, 14838.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., and Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* *39*, 457–466.

Wei, M., Grushko, T.A., Dignam, J., Hagos, F., Nanda, R., Sveen, L., Xu, J., Fackenthal, J., Tretiakova, M., Das, S., et al. (2005). BRCA1 Promoter Methylation in Sporadic Breast Cancer Is Associated with Reduced BRCA1 Copy Number and Chromosome 17 Aneusomy. *Cancer Res.* *65*, 10692–10699.

White, A.J., Chen, J., Teitelbaum, S.L., McCullough, L.E., Xu, X., Hee Cho, Y., Conway, K., Beyea, J., Stellman, S.D., Steck, S.E., et al. (2016). Sources of

polycyclic aromatic hydrocarbons are associated with gene-specific promoter methylation in women with breast cancer. *Environ. Res.* 145, 93–100.

WHO (2006). Air quality guidelines: global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide (Copenhagen, Denmark: World Health Organization).

Xu, J., Huo, D., Chen, Y., Nwachukwu, C., Collins, C., Rowell, J., Slamon, D.J., and Olopade, O.I. (2010). CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors. *Breast Cancer Res. Treat.* 120, 593–601.

Yu, H., Wei, J., Cheng, Y., Subedi, K., and Verma, V. (2018). Synergistic and Antagonistic Interactions among the Particulate Matter Components in Generating Reactive Oxygen Species Based on the Dithiothreitol Assay. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2261–2270.

Zhang, L., and Long, X. (2016). Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies. *Sci. Rep.* 5.

Zhou, W., Tian, D., He, J., Wang, Y., Zhang, L., Cui, L., Jia, L., Zhang, L., Li, L., Shu, Y., et al. (2016). Repeated PM2.5 exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget* 7, 20691–20703.

Zhou, X., Maricque, B., Xie, M., Li, D., Sundaram, V., Martin, E.A., Koebbe, B.C., Nielsen, C., Hirst, M., Farnham, P., et al. (2011). The Human Epigenome Browser at Washington University. *Nat. Methods* 8, 989–990.

Páginas de internet:

1. United States Environmental Protection Agency. NAAQS table: Criteria Air Pollutants. 2016. <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants/naaqs-table> (Consulta: 20/03/16).
2. GLOBOCAN. Fact sheets by population. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (Consulta 17/02/2016).
3. GLOBOCAN. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (Consulta 17/02/2016).
4. GLOBOCAN. Prediction. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx. (Consulta 17/02/2016).
5. Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). 2018. <https://portals.broadinstitute.org/ccle> (Consulta 16/01/2018).
6. WashU Epigenome Browser. V45.1. <http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/> (Consulta 10/01/2018).