

Expresión de los genes de la vía del Aril-hidrocarburo (ahr) en pulmones de habitantes fumadores y no fumadores de México

Elisa Apátiga-Vega¹, Rosa María Rivera-Rosales²,
Ma. del Carmen Calderón-Ezquerro³, Francisco Arenas-Huertero^{1,4}

¹Universidad Simón Bolívar

²Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

³Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Citogenética Ambiental

⁴Hospital Infantil de México Federico Gómez. Laboratorio de Biología Molecular

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se encuentran en el medio ambiente, producto de diferentes fuentes industriales y de combustión, así como del humo del tabaco. En la Ciudad de México (CM) se encuentran principalmente en la atmósfera. Actualmente, en México no existen trabajos que documenten la expresión de una vía importante como AhR, por lo que su determinación en muestras biológicas es importante. El objetivo del trabajo fue documentar la expresión de algunos genes de la vía del AhR en tejido pulmonar proveniente de individuos no fumadores residentes de la Ciudad de México y provincia, y de tejido pulmonar de fumadores. La expresión del AHR, el translocador nuclear-1 del receptor aril-hidrocarburo (ARNT-1) y la interleucina-8 (IL-8) como gen efector fueron evaluados mediante RT-PCR. Los resultados mostraron una disminución importante en la expresión de los tres genes en el grupo de fumadores: 4.3, 5 y 5.6 veces con respecto a la observada en los no fumadores de provincia, respectivamente, ($p < 0.05$). Se observó que la tendencia de expresión de los tres genes fue $Prov > CM > Fum$. Estos resultados por primera vez demuestran que la expresión de AHR y ARNT-1 tienden a perderse por efecto de los componentes del humo del cigarro en el pulmón de los fumadores.

Palabras clave: Contaminación, aire, pulmón, hidrocarburos aromáticos policíclicos, AHR, ARNT-1.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are produced from industrial and combustion processes, and also from the tobacco smoke. In Mexico City they are found in the atmosphere. Actually, in Mexico there are no studies that describe the expression of the AhR pathway, so its determination in biological samples is an important step for exposure evaluation. The first step in their study is to verify the activation of the AhR pathway. The objective of this study was document the expression of some genes of the AhR pathway in lung tissue of non-smokers of both Mexico City dwellers (MCD) and outside residents (OR), and smokers (S). The mRNA expression of AHR, nuclear translocator-1 of aryl-hydrocarbons (ARNT-1) and interleukin-8 (IL-8) as gene effector, were evaluated by RT-PCR. Results showed a decrease in the expression of ARH, ARNT-1 and IL-8 genes in S group: 4.3-, 5-, and 5.6-fold, respectively ($p < 0.05$), against to observed in OR. The trend of gene expression of the 3 genes was $OR > MCD > S$. These results for first time demonstrate the expression of AHR and ARNT-1 trends to lose due to component of the tobacco smoke in the lung of S.

Keywords: Pollution, air, lung, polycyclic aromatic hydrocarbons, AhR, ARNT-1

Introducción

El problema creciente de la contaminación del área metropolitana de la Ciudad de México (AMCM), sigue representando un desafío para su estudio. En primer término, por la necesidad de conocer las concentraciones presentes de todos los contaminantes; y en segundo término, por la necesidad de verificar los efectos que provocan a sus habitantes (Molina, L. y Molina, M., 2005). De hecho, los estudios que existen, están basados en los parámetros que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto como los mínimos permitidos para hacer armónica la vida en la mega ciudad (OMS, 2000).

Es patente que el problema de contaminación ambiental del AMCM es principalmente generado por las emisiones de todas las fuentes motoras del gran parque vehicular que existe: 3.5 millones de automóviles (Molina, L. y Molina, M., 2005). A este complejo se suman las emisiones provenientes de las fuentes industriales: 35 000 industrias que consumen 40 millones de litros de combustibles. Finalmente, la existencia de casi 20 millones de habitantes en el AMCM y sus actividades complican más el problema de su contaminación (Molina, L. y Molina, M., 2005).

Todos estos elementos plantean la complejidad del problema y la necesidad de realizar los estudios encaminados a determinar los efectos de estos contaminantes en la salud de los habitantes del AMCM. Los estudios pueden iniciar determinando las concentraciones presentes de los contaminantes y comparar si éstas rebasan las normas enunciadas por la OMS.

Otra forma de iniciar el estudio es verificar que alguno o algunos de los contaminantes ya interaccionaron con el organismo, dejando una "huella" que permite denominarla como marcador biológico. Estos son los estudios que pueden tener más impacto en la sociedad, generando información antes de la aparición de un problema y pueden tener valor preventivo y predictivo.

Si bien, parte del problema de la emisión de contaminantes atmosféricos en la AMCM se ha controlado como la emisión del plomo, monóxido de carbono y dióxido de azufre (Molina, L. y Molina, M., 2005), existen otros contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) que

lo agudizan, ya que son fuentes generadoras de ozono, que resulta como producto final de la reacción fotoquímica entre la radiación ultravioleta y los óxidos de nitrógeno.

Los HAPs son formados por la combustión incompleta de los automóviles y de los automotores que utilizan el diesel como combustible, siendo los principales emisores de contaminantes atmosféricos. En la Ciudad de México estos procesos incompletos de combustión son causados debido a la altitud y la baja presión parcial del oxígeno (Molina, L. y Molina, M., 2005). Si además, se suma la práctica del tabaquismo que también implica la combustión (incompleta) de las hojas de tabaco, es evidente que la exposición a los HAPs es tanto extra como intra muros (Veglia *et al.*, 2007).

En virtud de que los HAPs representan un grupo heterogéneo, es difícil determinar a un solo compuesto como el más peligroso en sus efectos al inhalarlo. Como normalmente está asociada la emisión de los HAPs con la combustión del diesel, es difícil establecer que el riesgo se deba exclusivamente a los HAPs (Molina, L. y Molina, M., 2005). Por su parte, Mugica-Alvarez *et al.* (2004) determinaron en la atmósfera de la Ciudad de México los niveles de los HAPs y reportaron una concentración de 7.84 ± 2.2 ng/m³, que evidentemente se encuentra por arriba de los niveles permisibles, 0.4 ng/m³ (OMS, 2000).

Otra forma de estudiar los efectos de los HAPs en el aire, es analizar la expresión de marcadores biológicos moleculares y, en el contexto de los HAPs, se refiere a una vía en la que participan varios genes y se conoce como la del receptor del Aril-hidrocarburo (AhR).

Objetivo

En este estudio se evaluaron los niveles de expresión de algunos genes blancos de la vía del AhR, con el objeto de conocer cómo influyen este tipo de contaminantes en el pulmón de diferentes personas expuestas: residentes de provincia (Prov) con exposición mínima ambiental; residentes de la Ciudad de México (CM) expuestos a HAPs por emisiones vehiculares e industriales; y finalmente un grupo expuesto a componentes del humo de cigarro como los fumadores (Fum).

Método

Tejido pulmonar humano

Se analizaron 30 muestras de parénquima pulmonar de los siguientes grupos: 10 casos de residentes no fumadores de la Ciudad de México, 10 no fumadores de provincia y un grupo de 10 fumadores. El tejido pulmonar incluido en parafina, se seleccionó del banco de autopsias realizadas en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Secretaría de Salud. Estos casos fueron de adultos mayores de 20 años de edad, sexo femenino y que fallecieron por algún padecimiento respiratorio no relacionado con cáncer pulmonar. Los protocolos de autopsia arrojaron los datos de lugar de residencia, práctica o ausencia de tabaquismo y el diagnóstico de muerte. Los tejidos fueron confirmados como parénquima pulmonar por análisis de los cortes histológicos teñidos con H&E.

Diseño de los iniciadores de los genes de estudio

Se diseñaron los iniciadores en base a la secuencia del RNAm de cada uno de los genes. Los números de acceso del GenBank de cada uno de los RNAm de estudio fueron: receptor a Aril hidrocarburo (Ahr), NM_001621; translocador-1 del receptor a Aril hidrocarburo (ARNT-1), NM_001668; interleucina-8 (IL-8), NM_000584; y gliceraldeído deshidrogenasa (GAPDH), AF261085. La temperatura de alineamiento se diseñó con base a la fórmula $2(A+T) + 4(G+C)$ sobre las secuencias del RNAm. Las secuencias fueron las siguientes:

AHR-F: 5'-ACATCACCTACGCCAGTCG-3';

AHR-R: 5'-AAAGGCAGCAGGCTAGCCA-3';

ARNT1-F: 5'-CTGGAAACTCTGGACCTGG-3';

ARNT1-R: 5'-TCGTTAGACATCTGATCAT-3';

IL-8-F: 5'-AGAACTTAGATGTCAGTGCATA-3';

IL-8-R: 5'-AGAGCTCTCTCCATCAGAAA-3';

GADPH-F: 5'-TCCCATCACCATCTTCCAG-3';

GADPH-R: 5'-ATGAGTCCTTCCACGATACC-3'.

Los iniciadores se diseñaron con el objetivo de generar productos amplificados, preferentemente menores de 300 pb, debido a que el RNAm fue aislado de tejido incluido en parafina. Los tamaños de los amplificados fueron los siguientes: AHR, 148 pb; ARNT, 142 pb; IL-8, 140 pb; y GAPDH 280 pb.

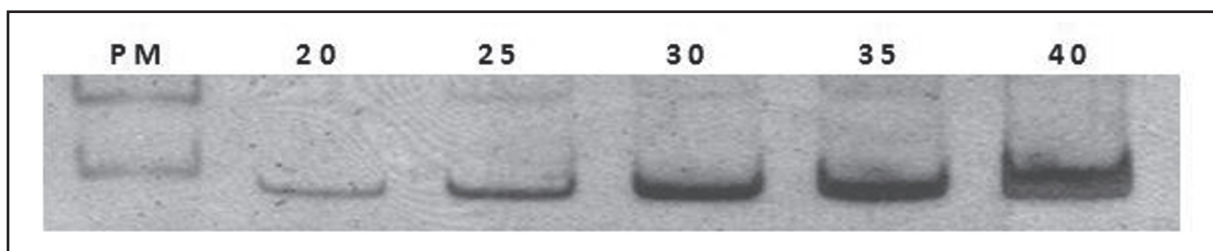
Aislamiento del RNAm de cortes histológicos incluidos en parafina

Tres cortes de 8 μm de tejido pulmonar fueron desparafinados con xileno a 50° C y enjuagados 2 veces con alcohol absoluto y después se secaron a temperatura ambiente por 15 min. Se realizó la extracción del RNAm según la descripción de la técnica del "RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit" (AMBION). Se eluyó el RNA limpio de la resina con 60 μl de agua libre de RNAsas, y finalmente el RNA purificado del tejido se almacenó a -20° C con 1 μl de inhibidor de RNAsas.

Síntesis de cDNA y amplificación de los fragmentos de los genes de AHR, ARNT-1, IL-8 y GAPDH

Tres μl de cada RNA se sometieron a síntesis de cDNA de acuerdo a la condiciones descritas en el "First Strand cDNA Síntesis Kit" (Fermentas). Las reacciones de amplificación de los fragmentos de los genes de estudio se realizaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), en un volumen final de 50 μl . Las condiciones de la amplificación fueron: desnaturalización inicial, 95°C/5 min; ciclo de amplificación: desnaturalización 95°C/30 s, alineamiento 57°C /30 s, elongación 72°C/30 s; elongación final 72°C/5 min y salida 20°C/5 min. Se utilizó el sistema de P1 *Taq* DNA polimerasa (Fermentas). El análisis final se realizó a 30 ciclos de amplificación, en las cuáles no existió saturación de la reacción (figura 1).

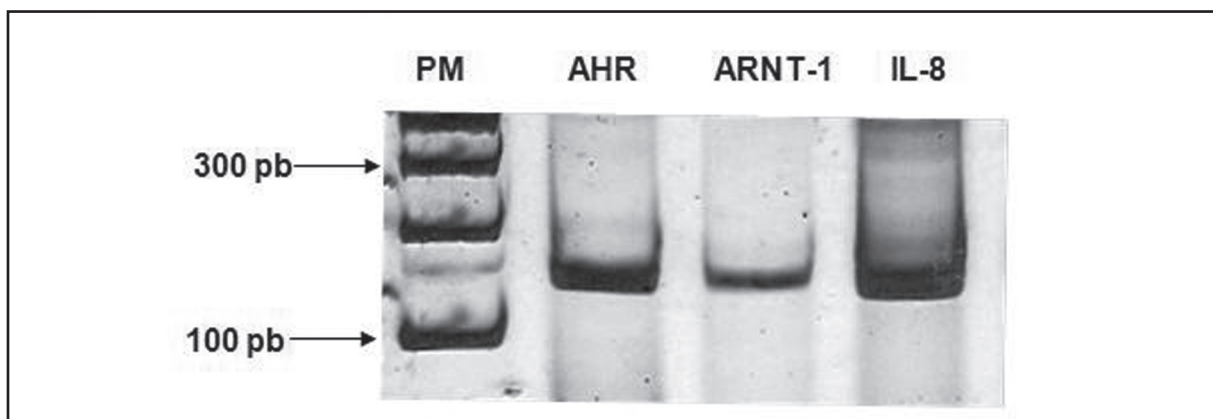
Figura 1. Amplificación del gen de la gliceraldehído fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) a diferentes ciclos. Se observa que a 30 ciclos no existe saturación de la reacción de PCR. Se utilizó un marcador de 100 pares de bases (PM). Los productos separados en gel de poliacrilamida y teñidos con plata.



Tamaño del fragmento amplificado: 280pb.

Para confirmar el diseño correcto de los iniciadores sintetizados, se realizaron amplificaciones sobre cDNA de la línea celular A549 de adenocarcinoma pulmonar, la cual expresó de manera constitutiva los genes de la vía AhR (figura 2), así como la mayoría de los efectores, quedando establecida la especificidad de las condiciones de la reacción.

Figura 2. Fragmentos amplificados de los genes de AHR, ARNT-1 e IL-8, sobre el cDNA sintetizado de RNAm obtenido de la línea celular A549. AHR, 148 pb; ARNT, 142 pb; IL-8, 140 pb. PM, marcador de 100 pares de bases.



Productos separados en gel de poliacrilamida y teñidos con plata.

Análisis de las bandas de amplificación, densitometría de los productos y obtención de la relación de expresión

Las bandas de amplificación de cada gen se revelaron en geles de poliacrilamida al 10% mediante la tinción con nitrato de plata. Previamente los geles se fijaron en etanol al 10% y ácido acético al 0.5% durante 10 min de agitación. En seguida se expusieron en la solución de tinción de nitrato de plata al 0.2% preparada en la misma solución fijadora durante 5 min de agitación. Finalmente, las bandas se revelaron en hidróxido de sodio al 3% y formaldehído al 0.15% hasta su aparición. De cada gel se obtuvieron imágenes digitales y en estas se cuantificó por densitometría la intensidad de cada banda, utilizando el programa ImageJ. Por último, se obtuvo la relación de expresión dividiendo la densidad integrada de cada gen problema entre la obtenida del gen constitutivo, GAPDH.

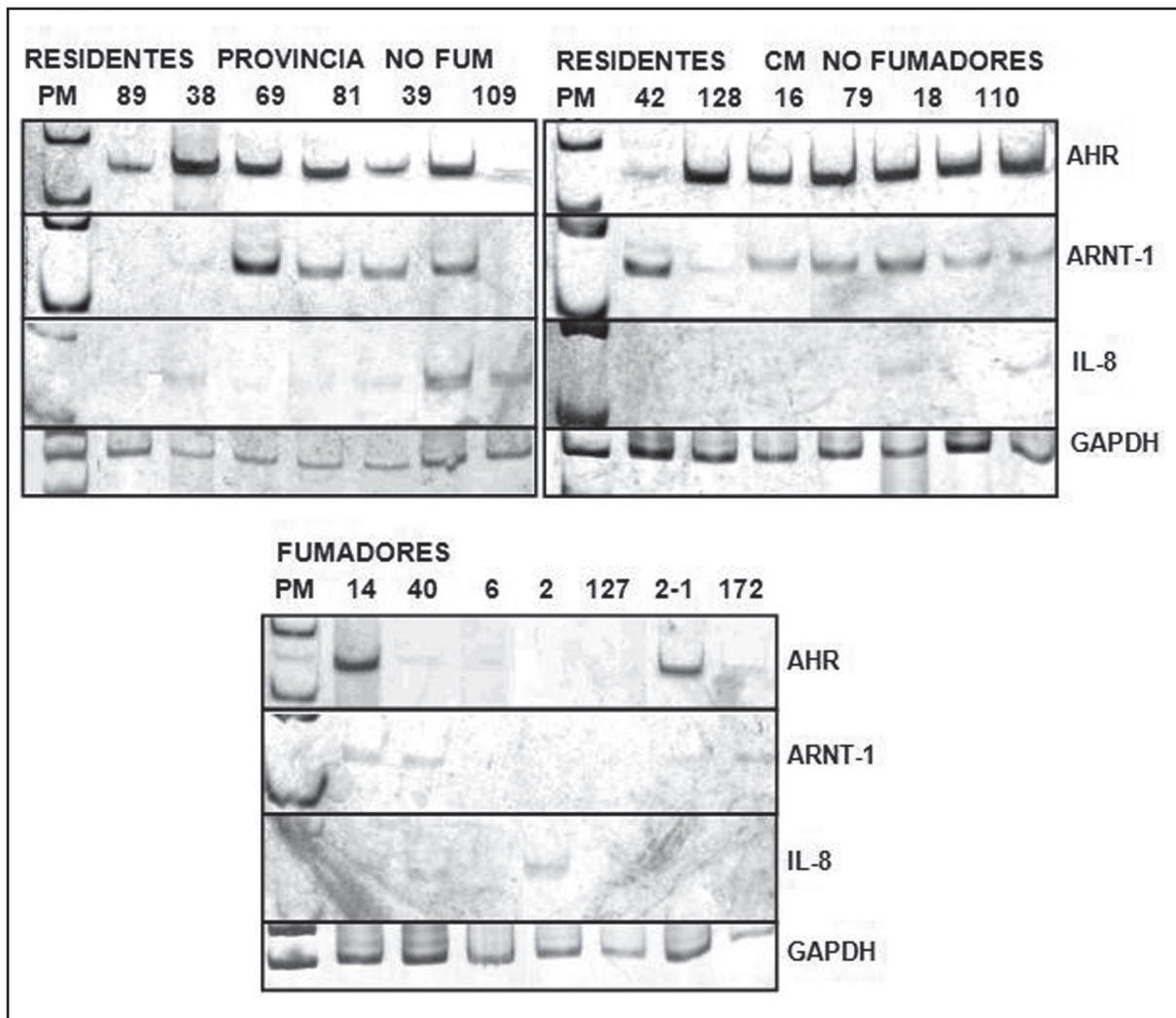
Análisis estadístico.

Se obtuvo la media de expresión de cada gen y se evaluaron las diferencias de expresión de cada grupo: CM, Prov y Fum mediante la prueba "t" de student. Se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05.

Resultados

Los 30 casos estudiados expresaron el gen constitutivo GAPDH, por lo que se sometieron al análisis de expresión de los genes de la vía del AhR (figura 3). Este resultado corroboró que el RNAm extraído en todos los casos no está degradado.

Figura 3. Fragmentos amplificados de los genes de AHR, ARNT-1, IL-8 y GAPDH, sobre el cDNA sintetizado de RNAm obtenido de tejido pulmonar de residentes no fumadores de Provincia y CM, y del grupo de fumadores. Cada carril es un caso diferente. PM, marcador de 100 pares de bases.



Productos separados en gel de poliacrilamida y teñidos con plata.

El cuadro 1 muestra la relación de expresión promedio de cada uno de los genes evaluados. Como se puede apreciar, existe una tendencia a disminuir esta expresión en los tres grupos de acuerdo a: Prov>CM>Fum.

Cuadro 1. Expresión de los genes de AHR, ARNT e IL-8, en diferentes tejidos pulmonares humanos.

GRUPOS DE ESTUDIO	AHR	ARNT	IL-8
PROVINCIA	2.7*	1.8*	1.36*
CIUDAD MÉXICO	1.90*	0.9	0.16
FUMADORES	0.63*	0.36*	0.24*

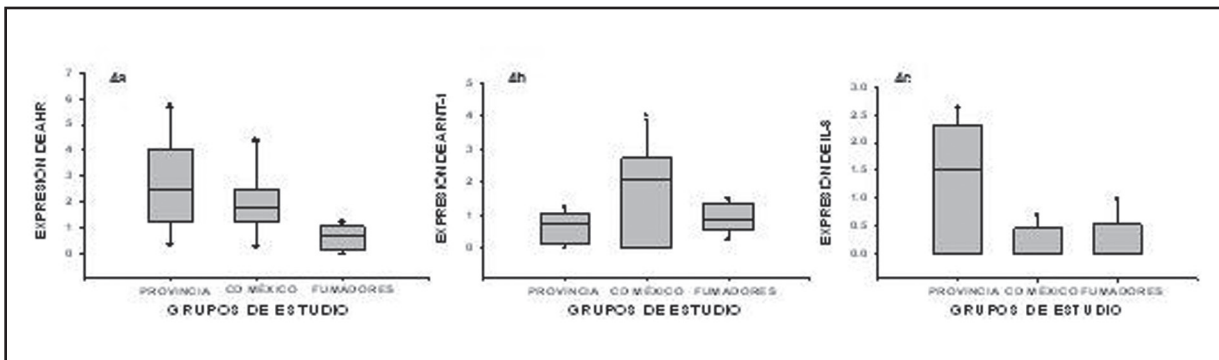
* Diferencia significativa, "t de student".

Grupo de Provincia vs ciudad de México y fumadores, p< 0.05.

De hecho, los Fum tuvieron la tendencia a disminuir de forma importante la expresión de los genes AHR y ARNT que los de Prov y de la CM. Al comparar esta disminución con respecto al promedio obtenido del grupo de Prov, estas diferencias fueron significativas (p<0.05), incluida la expresión del gen de la IL-8.

Esta tendencia se puede apreciar mejor en las gráficas de la figura 4, de "cajas y bigotes" que muestra cada uno de los casos analizados en los tres grupos de estudio. Estas gráficas además corroboran la tendencia en el patrón de expresión de los genes del AHR ARNT-1 y de la IL-8 observada en la Figura 3.

Figura 4. Distribución gráfica de la expresión de los genes en cada caso de los grupos de residentes de Provincia y de la Ciudad de México no fumadores; y en fumadores. 4a. Expresión del gen AHR. 4b. Expresión del gen ARNT-1. 4c. Expresión del gen de la IL-8.



Discusión

El objetivo de este trabajo fue conocer los niveles de expresión de algunos genes que participan en la vía del AHR en tejido pulmonar humano de residentes no fumadores de provincia (Prov) y de la CM y en el grupo de fumadores (Fum). Los resultados muestran una disminución considerable en la expresión de los tres genes evaluados en el grupo de los fumadores.

Históricamente, el AHR se ha estudiado por su papel importante en regular la transcripción de los genes que codifican a las enzimas del grupo de los citocromos P450, los cuales metabolizan los ligandos del AHR. Este proceso algunas veces produce intermediarios mutagénicos y tóxicos que están relacionados con la generación de enfermedad incluso tumoral (Hahn *et al.*, 2009). De esta manera, se entiende por qué el enfoque del estudio de

la activación de la vía AhR con frecuencia se relaciona a la transformación maligna y a eventos de toxicidad celular. La proteína Ahr, su translocador nuclear Arnt-1 y el represor Ahrr, tienen una estructura conservada a la de un grupo de factores de transcripción de la familia "hélice-asa-hélice" de naturaleza básica (bH-L-H) (Gasiewicz *et al.*, 2008).

Su expresión es importante a lo largo del desarrollo de los mamíferos, desde la etapa embrionaria hasta los organismos adultos, con altos niveles de expresión en diversos órganos como hígado, pulmón, ganglios linfáticos y cerebro (Hahn *et al.*, 2009).

Estos hechos plantean fuertemente la posibilidad de que la vía del AhR, tenga funciones fisiológicas importantes, aparte del metabolismo de compuestos xenobióticos (Hahn *et al.*, 2009; Gasiewicz *et al.*, 2008). Existen evidencias que demuestran las funciones biológicas por la activación de la vía AhR en ausencia de ligandos exógenos, como la tumorigénesis de la glándula mamaria (Trombino *et al.*, 2000; Schlezinger *et al.*, 2006) así como la respuesta inmune (Quintana *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2008). En este sentido, al encontrar en el presente estudio que los niveles de expresión del AHR y del ARNT-1 fueron elevados principalmente en los pulmones de no fumadores, se correlaciona con los hallazgos descritos inicialmente por Dolwick *et al.*, (1993); Li *et al.*, (1994); Carver *et al.*, (1994) y posteriormente por Lin *et al.*, (2003), quienes describieron al pulmón como uno de los órganos con la más alta concentración del AHR en comparación con otros órganos. Y de acuerdo a los resultados que se presentan en este estudio, la expresión del RNAm del AHR es una característica del pulmón humano.

Un hallazgo importante de estos resultados, es la tendencia del AHR al expresar su máximo nivel de 2.7 veces en los casos de los residentes de Prov, quienes posiblemente estuvieron expuestos a bajos niveles de contaminación ambiental y dependiendo del nivel de exposición a contaminantes ambientales en una atmósfera como la de la CM, tiende a disminuir la expresión a 1.9 veces; finalmente, si existe exposición importante o prolongada a una mezcla de HAPs y otros contaminantes que contiene el humo de cigarro como en los Fum, la expresión del RNAm del AHR se reduce de manera significativa a 0.63 veces.

Se sabe que la exposición a ligandos del AHR, activa una respuesta que reduce los niveles de la proteína Ahr, sin afectar los niveles del RNAm en diferentes tipos de células y tejidos (Davarios *et al.*, 1999; Polenz *et al.*, 2002).

Otros reportes mencionan que los niveles de la proteína pueden o no ser alterados por la unión del ligando al Ahr (Franc *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005). Lo que es claro es que el mecanismo de regulación del AHR realmente depende de la magnitud y extensión del efecto, del tipo y momento metabólico celular, del tipo de ligando, así como del tejido y si las respuestas evaluadas son *in vitro* en líneas celulares ó *in vivo* en animales de laboratorio (Gasiewicz *et al.*, 2008).

Esto puede explicar el hecho de que en el presente estudio, se observó una disminución importante de la expresión del AHR en los fumadores y aunque se propone que la proteína Ahr al unirse a su ligando sufre proteólisis por vía del proteosoma (Gasiewicz *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 2009), estos resultados sugieren que puede existir una regulación pos-transcripcional, es decir, la degradación del mensajero del gen del AHR. Lo anterior, al ser un resultado nuevo, debe ser verificado mediante el análisis por inmunohistoquímica de la disminución y/o ausencia de la proteína en cortes histológicos de pulmón de los Fum, o mediante ensayos de protección a RNasa A.

La vía del AHR requiere la participación del translocador nuclear, la proteína Arnt-1, cuando es mayor la expresión del AHR, se observa disminución en la expresión del ARNT-1, y viceversa. Sin embargo, siempre que existió expresión de ARNT-1, se dio también expresión del AHR. En cuanto al grupo de los Fum, la expresión del AHR fue la menor, y esto explica la expresión disminuida del translocador nuclear. Este hecho puede tener implicaciones biológicas importantes, ya que la activación del receptor puede realizarse independientemente de la unión de ligandos exógenos como los HAPs u otros.


Es posible que el grupo de los Fum, al no tener en niveles requeridos la presencia del complejo AHR-ARNT-1, la posibilidad de activación de genes que puedan participar en la reparación de tejido sea menor. Así, la disminución en la renovación proteolítica y/o la activación de muerte celular post-exposición al humo de cigarro, podría estar participando en generar y agudizar los daños pulmonares característicos del enfisema y/o bronquitis crónica como destrucción tisular y respuestas agudas no reguladas.

Los resultados correlacionaron directamente en cuanto a la intensidad de la expresión de un gen efector, el de la IL-8. Éste se encontró más expresado en el grupo de los residentes de Prov que en el de los Fum: 1.36 vs 0.24. Sin embargo, también se deberá analizar la

expresión de la proteína IL-8 para correlacionar este hecho. Un evento que será evaluado en el corto plazo, es la expresión del represor del AHR, el AHRR. Se ha reportado que los niveles de expresión del AHR y del AHRR son inversamente proporcionales al estímulo. Si esto es cierto, significa que probablemente las células pulmonares de los Fum pueden tener reprimidos de manera importante la expresión de los genes de la vía del AHR, debida a una expresión elevada del AHRR, que no sucede con los no fumadores: residentes tanto de la CM como de Prov.

Conclusión

La expresión del AHR y del ARNT-1 es característica del pulmón de habitantes que no están expuestos a los HAPs del humo del cigarro.

La disminución en los niveles de expresión del gen de la IL-8 como efector en los fumadores, sugiere que varios efectores de la vía AhR pueden estar afectados. 

Expectativas

Es importante realizar el análisis de otros componentes de la vía del AHR, es decir, aquellos genes que participen en el metabolismo de los compuestos xenobióticos y los que tengan un papel en la regulación del ciclo celular.

Se analizará la presencia de la proteínas principales de la vía: Ahr, Arnt-1 y Ahrr en cortes histológicos de cada uno de los grupos estudiados.

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por la Coordinación de Investigación de la Universidad Simón Bolívar, de la convocatoria de apoyo a proyectos de investigación para el ciclo escolar 2009-2010.

Referencias

- Carver, L., Hogenesch, J. y Bradfield, C. (1994). "Tissue expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs". En *Nucleic Acids Res.* 1994. 22. 3038-3044.
- Chang, H, Wang, Y., Chang, L. y Lin, P. (2005). "A histochemical and pathological study on the interrelationship between TCDD-induced AhR expression, AhR activation, and hepatotoxicity in mice". En *J Toxicol Environ Health A.* 68. 1567-79.
- Davarios, N. y Pollenz, R. (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export". En *J Biol Chem.* 274. 28708-15.
- Dolwick, K., Schmidt, J., Carver, L., Swanson, H. y Bradfield, C. (1993). "Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA". En *Mol Pharmacol.* 44. 911-917.
- Franc, M., Pohjanvirta, R., Tuomisto, J. y Okey, A. (2001). "In vivo up-regulation of aryl hydrocarbon receptor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in a dioxin-resistant model". En *Biochem Pharmacol.* 62. 1565-78.
- Gasiewicz, T., Henry, E. y Collins, L., (2008). "Expression and activity of aryl hydrocarbon receptor in development and cancer". En *Crit Rev Eukaryo Gene Exp* 18. 259-321.
- Hahn, M., Allan, L. y Sherr, D. (2009). "Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor". En *Biochem Pharmacol.* 77. 485-497.
- Li, W., Donat, S., Dohr, O., Unfried, K. y Abel, J. (1994). "Ah receptor in different tissues of C57/BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression". En *Arch Biochem Biophys.* 315. 279-284.
- Lin, P., Chang, H., Tsai, W., Wu, M., Liao, Y., Chen, J., y Su, J. (2003). "Overexpression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas". En *Tox Pathol.* 31. 22-30.
- Marshall, N., Vorachek, W., Stepan, L., Mourich, D. y Kerkviñet, N. (2008). "Functional characterization and gene expression analysis of CD4+ CD25+ regulatory T cells generated in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin". En *J Immunol.* 181. 2382-2391.
- Molina, L. y Molina, M. (2005). *La calidad del aire en la megaciudad de México. Un enfoque integral.* México: Fondo de Cultura Económica.
- Mugica-Alvarez, V., Hernández-Mayén, S., Carreón-Garabito, B. y Torres-Rodríguez, M. (2004). "Hidrocarburos aromáticos policíclicos en la atmósfera de la Ciudad de México". Recuperado en diciembre del 2009, en www.ingenieroambiental.com/4014/mugica.pdf.
- Organización Mundial de la Salud. (2000). *Guidelines for air quality.* Ginebra: OMS.
- Pollenz, R., Santostefano, M., Klett, E., Richardson, V., Necela, B. y Birnbaum, L., (1998). "Female Sprague-Dawley rats exposed to a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibit sustained depletion of aryl hydrocarbon receptor protein in liver, spleen, thymus and lung". En *Toxicol Sci.* 42.117-28.
- Quintana, F., Basso, A., Iglesias, A., Korn, T., Farez, M. y Bettelli, E. (2008). "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor". En *Nature.* 453. 65-71.
- Schlezinger, J., Liu, D., Farago, M., Seldin, D., Belguise, K. y Sonnenschein, G. (2006). "A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis". En *Biol Chem.* 387. 1175-1187.
- Trombino, A., Matulka, R., Yang, S., Hafer, L., Rogers, A. y Toselli, P. (2000). "Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcription in a rat model of mammary tumorigenesis". En *Breast Cancer Res Treat.* 62. 117-131.
- Veglia, F., Vineis, P., Overvad, K., Boeing, H., Bergmann, M. y Trichopoulou, A. (2007). "Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer". En *Epidemiology.* 6, 769-775.