



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN  
CIENCIAS AMBIENTALES

**“INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS  
MONONUCLEARES SANGUÍNEAS EXPUESTAS A DDE IN VITRO”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA

**Q.F.B. MARIANA DEL CARMEN CÁRDENAS GONZÁLEZ**

DIRECCIÓN DE TESIS:  
**DR. IVÁN N. PÉREZ MALDONADO.**

COMITÉ TUTELAR:

**DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ**

**DR. ROBERTO GONZÁLEZ AMARO**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA  
PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN  
CIENCIAS AMBIENTALES

**“INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS  
MONONUCLEARES SANGUÍNEAS EXPUESTAS A DDE IN VITRO”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA

**Q.F.B. MARIANA DEL CARMEN CÁRDENAS GONZÁLEZ**

DIRECCIÓN DE TESIS:  
**DR. IVÁN N. PÉREZ MALDONADO.**

COMITÉ TUTELAR:

**DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ**

**DR. ROBERTO GONZÁLEZ AMARO**

**SINODALES:**

**PRESIDENTE:**

DR. IVÁN N. PÉREZ MALDONADO \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:**

DR. ROBERTO GONZÁLEZ AMARO \_\_\_\_\_

**VOCAL:**

DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ \_\_\_\_\_

## **CRÉDITO INSTITUCIONALES**

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Toxicología Ambiental y el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la tutoría del Dr. Iván Nelinho Pérez Maldonado.

### **COMITÉ TUTELAR**

DIRECTOR DE TESIS  
Dr. Iván N. Pérez Maldonado.

ASESORES INTERNOS  
Dr. Fernando Díaz-Barriga Martínez  
Dr. Roberto González Amaro

### **JURADO**

Dr. Iván N. Pérez Maldonado.  
Dr. Fernando Díaz-Barriga Martínez  
Dr. Roberto González Amaro

**Septiembre 2008**

## **Agradecimientos:**

## I. RESUMEN

La inflamación es un fenómeno causado por agentes microbianos, químicos y físicos. Dado que diferentes agentes tóxicos son capaces de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias, éstos pueden ser un factor que contribuya al desarrollo de procesos inflamatorios. Durante décadas el DDT desempeñó un papel importante en los esfuerzos globales para combatir el paludismo a nivel mundial hasta su prohibición. Como resultado de la alta persistencia en el ambiente la población humana sigue estando expuesta a este compuesto y sus metabolitos. Estudios recientes sugieren la posibilidad de que el DDT y sus metabolitos actúen como agentes inmunotóxicos, con capacidad de modificar el proceso inflamatorio. Por lo que, en este estudio evaluamos el posible efecto de la exposición *in-vitro* al *p,p'*-DDE sobre la inducción de la síntesis de moléculas pro-inflamatorias por PBMC de individuos normales. Las células fueron expuestas a 10 y 80  $\mu\text{g/ml}$  de *p,p'*-DDE. La detección del porcentaje de células que produjeron las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-6 Y TNF- $\alpha$ ) se realizó mediante análisis de fluorescencia por citometría de flujo y la evaluación de las proteínas COX-2 y Casp-1 se llevo a cabo mediante la técnica de Wester Blot. Nuestros resultados demostraron que *p,p'*-DDE es capaz de inducir un aumento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias así como, la inducción de otros mediadores pro-inflamatorios, en PBMC. Finalmente, nuestros datos sugieren que el principal metabolito del DDT, el *p,p'*-DDE podría actuar como un inductor del proceso inflamatorio.

## INTRODUCCIÓN

El DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano) es un compuesto organoclorado sintético, usado ampliamente como pesticida para plagas agrícolas, especialmente del cultivo algodonero y para el control de vectores transmisores de enfermedades. En México su uso agrícola se extendió hasta 1990 y en salud pública fue la principal estrategia para la erradicación de la malaria hasta el año 2000, luego que fuera sustituido por los insecticidas piretroides (CEC, 1997; Caballero, 2001).

Debido a su estabilidad química, el compuesto tiene una alta persistencia en el ambiente, estimándose un tiempo de vida media de 15 a 30 años. Los principales productos de degradación son *p,p'*-DDE (*p,p'*-dicloro-difenil-dicloro-etileno), y *p,p'*-DDD (*p,p'*-dicloro-difenil-dicloro-etano), que también son persistentes y tiene propiedades físicas y químicas similares a las del DDT (WHO, 1979; ATCDR, 2002). Como resultado de su alta persistencia en el ambiente y debido a las elevadas cantidades que fueron rociadas en México, la población humana sigue estando expuesta a estos compuestos. La principal ruta de exposición para el humano es a través de la ingesta de alimentos contaminados (Herrera-Portugal *et al.*, 2005). En México se ha reportado la presencia de altos niveles del compuesto y sus metabolitos en matrices biológicas como sangre, leche materna y tejido adiposo (Torres-Arreola *et al.*,

1999; Waliszewski *et al.*, 1997; 2001; Díaz-Barriga *et al.*, 2002; Yañez *et al.*, 2002; Pérez-Maldonado *et al.*, 2006).

La exposición a este agente ha sido asociada a diferentes efectos tóxicos tales como: desorganización endocrina (Longnecker *et al.*, 2001), efectos sobre el sistema inmune (Vine *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2002; Núñez, Estrada y Calderon-Aranda, 2002; Beach y Whalen, 2006; Pérez-Maldonado *et al.*, 2006) y neurotoxicidad (Dorner y Plagemann, 2002; Miersma *et al.*, 2003). Sin embargo, los mecanismos de toxicidad mediante los cuales el DDT y sus metabolitos ejercen sus efectos tóxicos no han sido completamente dilucidados.

Al respecto, en nuestro laboratorio se demostró que *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD inducen apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) expuestas in-vitro a estos agentes, además de confirmar la asociación entre los niveles de *p,p'*-DDE y la inducción de apoptosis en PBMC de población expuesta (Pérez-Maldonado *et al.*, 2004; 2006). Finalmente, se demostró que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), es el mecanismo involucrado en la inducción de apoptosis de células expuestas al DDT y sus metabolitos (Pérez-Maldonado *et al.*, 2005). Estudios realizados recientemente sugieren que la apoptosis inducida por *p,p'*-DDE sobre las PBMC es precedida por un estado de activación celular que favorecería el fenómeno inflamatorio, pues las células expuestas in-vitro al compuesto mostraron un aumento en la expresión del gen que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Alegría-Torres, 2008). Todo lo anterior sugiere la posibilidad de que DDT y sus metabolitos podrían tener un efecto

relevante en la inducción del fenómeno inflamatorio, lo que sería un mecanismo de toxicidad desconocido para el DDT.

El posible efecto de diferentes agentes tóxicos sobre el fenómeno inflamatorio ha tomado gran relevancia ya que esto implicaría que la exposición a ciertos contaminantes podría estar relacionada con la aparición de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la artritis reumatoide o la aterosclerosis. Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar el posible efecto de la exposición in-vitro al *p,p'*-DDE sobre la inducción de la síntesis de moléculas pro-inflamatorias por PBMC de individuos normales.



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

**Cultivo Celular.** Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de sujetos sanos no fumadores (23 - 33 años de edad) por punción venosa, que previo a la toma de muestra no hubieran estado bajo ninguna medicación y no hayan sido sometidos a procesos quirúrgicos recientes. A partir de las muestras de sangre heparinizada, las PBMC se aislaron por gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). La concentración celular se ajustó a  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 (MP Biomedicals) suplementado (10% de suero bovino fetal, Gibco; 2mM de L-glutamina, 1% de penicilina y de estreptomina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a 37° C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tratamiento Celular.** Para la cuantificación de células productoras de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) mediante citometría de flujo, los tratamientos consistieron en la exposición de las células a diferentes intervalos de tiempo (0, 3, 6, 12 y 24 h) con 10 y 80  $\mu$ g/ml de *p,p'*-DDE disuelto en acetona (Chem Service, Inc), como control de vehículo se uso acetona al 0.2% y como control positivo se utilizó 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS serotipo 026:B6) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Los tratamientos para la evaluación de proteínas pro-inflamatorias por Western Blot, consistieron en

incubación por una hora con 1, 10, 40, y 80  $\mu\text{g/ml}$  de *p,p'*-DDE disuelto en acetona (Chem Service, Inc), acetona al 0.2% como control de vehículo y como control positivo 10  $\mu\text{g/ml}$  de lipopolisacárido.

**Viabilidad Celular.** La viabilidad celular fue evaluada en cada una de las condiciones al inicio y al final de cada periodo de incubación, mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

**Marcaje Intracelular de Citocinas.** Para todos los tratamientos la suspensión celular fue incubada con 10  $\mu\text{g/ml}$  de brefeldina A (BFA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 4 h antes de realizar el marcaje intracelular de citocinas. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4%, permeabilizadas con una solución de saponina 0.1% y marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-IL-1 $\beta$ -FITC (eBioscience, Inc.), anti-IL-6-FITC (eBioscience, Inc.) y anti-TNF- $\alpha$ -FITC (AbD Serotec), además de sus respectivos controles de isotipo, Mouse IgG1-FITC para IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y Rat IgG1-FITC para IL-6 (eBioscience, Inc.) Por último las muestras fueron fijadas nuevamente con PFA 1% para su posterior análisis en el citómetro de flujo FACSCalibur Flow Cytometer (Becton–Dickinson).

**Extracción de proteínas y Western Blot.** En cada uno de los tratamientos  $1 \times 10^7$  células fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{l}$  de Buffer RIPA 1X (Santa Cruz Biotechnology, Inc) adicionando un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) al 1 %. Después de ser incubadas en hielo por

20 min, el homogenado celular se hizo pasar por una aguja de 26 G cinco veces y fue centrifugado a 500 x g por 10 min para eliminar núcleos y células intactas. El sobrenadante se centrifugó a 10 000 x g por 30 min a 4°C para obtener la fracción citosólica. El contenido de proteína se cuantificó por medio del método de Bradford (Bio-Rad Laboratories), cantidades equivalentes a 20 µg de proteína fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Para la electrotransferencia (20V por 12 horas) se utilizaron membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories) y se bloquearon por 1 h con leche en polvo no-grasa al 5% en TBS-T (10 mM de Tris-Base pH 7.5, 150 mM de NaCl y Tween-20). Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 3 h con el anticuerpo primario y por 1.5 h con el anticuerpo secundario resuspendidos en TBS-T. Finalmente, se reveló mediante quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Anticuerpos.** Se usaron anticuerpos policlonales anti-Ciclooxigenasa-2 y anti-Caspasa-1 (United States Biological Inc y BioVision, Inc.) diluidos 1/500 y 1/700 respectivamente. El anticuerpo secundario acoplado a HRP (BioVision, Inc.) diluido 1/2000.

**Análisis Estadístico.** Se comprobó la distribución normal de los datos por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. Las medias del porcentaje de células positivas en cada uno de los tratamientos aplicados, fueron comparadas usando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de la prueba Turkey-Kramer. Los valores *p* menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Para este análisis se usó el software JMP IN 5.0.1.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

### III RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el porcentaje de células vivas a las 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE. La concentración de 80  $\mu$ g/ml fue la máxima que se estableció para usar en los ensayos, ya que a las 24 hs de incubación la viabilidad celular fue de aproximadamente un 80% y a las 12 hs fue superior al 95% (datos no mostrados). La concentración del vehículo (acetona al 0.2%) no tuvo efectos sobre la viabilidad celular.

En la Figura 2 (A) se muestra el aumento del porcentaje de células positivas para IL-1 $\alpha$  a partir de las 3 hs de incubación, que se volvió significativamente diferente al control a las 6 hs de incubación. Las células expuestas a la mayor concentración de *p,p'*-DDE (80  $\mu$ g/ml) produjeron más IL-1 $\alpha$  que las que fueron incubadas con 10  $\mu$ g/ml y con el control de vehículo ( $7.78 \pm 1.21\%$ ;  $4.5 \pm 0.15\%$  y  $3.8 \pm 0.08\%$  respectivamente,  $p < 0.05$ ).

En la Figura 2 (B) se muestra que el porcentaje de células positivas para IL-6, aumentó a partir de las 6 hs de incubación, que se volvió significativamente diferente a las 12 y 24 hs de incubación, donde las células cultivadas con 80  $\mu$ g/ml de *p,p'*-DDE produjeron más IL-6 que las que fueron incubadas con el

control ( $9.53 \pm 2.01\%$ ;  $2.54 \pm 0.36\%$  12 h y  $9.45 \pm 2.08\%$ ;  $2.54 \pm 0.36\%$  24 hs,  $p < 0.05$  para ambos casos).

En la Figura 2 (C) la síntesis de TNF- $\alpha$ , mostró un incremento estadísticamente significativo a las 12 hs de incubación y la concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$  de *p,p'*-DDE fue la que indujo la mayor producción de TNF- $\alpha$ . Los resultados mostraron una mayor producción de la citocina, en las células tratadas con el *p,p'*-DDE ( $10$  y  $80 \mu\text{g/ml}$ ) que las que fueron incubadas con el control ( $10.325 \pm 1.365 \%$  y  $7.085 \pm 1.084 \%$ ;  $2.778 \pm 0,585 \%$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  se incrementa en PBMC expuestas a *p,p'*-DDE comparadas con las células control.

La figura 3 muestra el resultado de un experimento representativo del efecto del *p,p'*-DDE sobre la expresión de COX-2. Las células tratadas con el control (vehículo) no expresaron la proteína mientras que, en las células tratadas con *p,p'*-DDE los niveles de expresión de la proteína se indujeron a partir de la concentración más baja del tóxico ( $1.0 \mu\text{g/ml}$ ), manteniendo, aparentemente el mismo nivel de expresión hasta la concentración más alta ( $80 \mu\text{g/ml}$ ). En general, estos resultados nos indican que *p,p'*-DDE es capaz de inducir la expresión de COX-2 en PBMC.

La Figura 4 muestra el resultado de un experimento representativo del efecto que tuvo el *p,p'*-DDE sobre la inducción de la expresión de caspasa-1. Las células tratadas con el control (vehículo) no expresaron la proteína, mientras que en las células tratadas con *p,p'*-DDE fueron evidentes las dos bandas de

45 y 20 kDa, que representan al precursor de la enzima y a una de las subunidades de la enzima ya activada, respectivamente. Los resultados nos indican que *p,p'*-DDE es un inductor de la expresión de la enzima Caspasa-1.

#### **IV. DISCUSIÓN.**

La inflamación es un fenómeno causado por agentes microbianos, químicos y físicos que se observa en una gran variedad de enfermedades. Ha sido demostrado que determinados agentes tóxicos son capaces de inducir moléculas relacionadas con procesos inflamatorios (Okyun *et al.*, 2002; Chen y Shi, 2002). A este respecto, la exposición crónica a Arsénico (As) se asocia con daño al endotelio vascular y aterogénesis (Tseng, 2002; 2008). La inducción de síntesis de citocinas pro-inflamatorias se propone como el mecanismo por el cual el As induce inflamación vascular (Wu *et al.*, 2003; Tsoua *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2007). El TNF- $\alpha$  es una citocina pleiotrópica que actúa como el principal mediador inflamatorio (Ming, Bersani y Mantovani, 1987; Wajant, Pfizenmaier y Scheurich, 2003).

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio, sugieren que *p,p'*-DDE induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, pues las PBMC expuestas *in vitro* a *p,p'*-DDE muestran un aumento en la expresión del gen que codifica para la citocina TNF- $\alpha$  (Alegría-Torres, 2008).

En el presente estudio se evaluó la inducción de moléculas pro-inflamatorias en PBMC tratadas con *p,p'*-DDE. Nuestros resultados demuestran el aumento en

la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) después de la incubación de las PBMC con *p,p'*-DDE. Además también se observó la inducción de otro tipo de mediadores pro-inflamatorios tales como COX-2, enzima pro-inflamatoria inducible en condiciones de estrés oxidativo e involucrada en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Kuwano *et al.*, 2004) y Caspasa1, enzima responsable del procesamiento y activación de la IL-1 $\alpha$  (Martinon y Tschopp, 2007).

Nuestros resultados coinciden con otros estudios reportados en la literatura. Por ejemplo, se ha demostrado el aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 y de Óxido Nítrico Sintasa (iNOS) enzima inducible, encargada de la producción de Óxido Nítrico (NO), por macrófagos de ratón tratados con *o,p'*-DDT (Kim *et al.*, 2004). Resultados similares fueron reportados en líneas celulares humanas de endometrio y de hígado, donde se estableció que la síntesis de TNF- $\alpha$  se incrementa cuando las células se tratan con *p,p'*-DDT (Frigo *et al.*, 2005). Estos datos sugieren un posible nuevo mecanismo de toxicidad para el DDT y sus metabolitos, a través de la inducción de un proceso inflamatorio.

Diversas patologías con componente inflamatorio se han asociado con la elevación de ROS (Rutkowski *et al.*, 2007; Bonomini *et al.*, 2008), posiblemente a través de la regulación de la expresión y/o secreción de citocinas pro-inflamatorias (Petrone *et al.*, 1980; Hsu y Wen, 2002; Azad, Rojanasakul y Vallyathan, 2008). Es importante mencionar que nuestro grupo demostró que

el DDT y sus metabolitos inducen apoptosis mediante la generación de estrés oxidativo (Pérez-Maldonado *et al.*, 2004; 2005). Aunque nuestros resultados muestran que *p,p'*-DDE es capaz de favorecer un proceso inflamatorio, el posible mecanismo por el cual la elevación de ROS inducida por DDT participa en la inducción de una respuesta inflamatoria permanece por ser dilucidado.

La expresión de las diversas moléculas involucradas en el proceso inflamatorio es altamente regulada por factores de transcripción. NF- $\kappa$ B y AP-1 son dos factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares, entre ellos la inflamación (Baeuerle y Henkel, 1994; Bakiri *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004). La activación de ambos factores de transcripción ha sido asociada con la exposición a DDT y sus metabolitos (Frigo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). La inducción de estos factores es catalizada por la familia de cinasas, las cuales integran una de las vías de señalización intracelular más importantes, sensible al estado redox celular y por lo tanto involucrada en la regulación de la respuesta celular al estrés oxidativo (Thannickal y Fanburg, 2000; Chang y Karin., 2001; Martindale y Holbrook, 2002), denominada como MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), integrada por cuatro subfamilias, activadas en respuestas a diferentes estímulos: ERK (extracellular signal-related kinases), JNK (Jun amino-terminal kinases), p38 MAPK y BMK1 (Big-MAPK 1) (Vanden *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2000; Chang y Karin., 2001; Liu, Shepherd y Nelin, 2007). Se ha demostrado la inducción de subfamilias de MAPKs como ERK1/2 y JNK por pesticidas organoclorados (Ledirac *et al.*, 2005), la de activación tiempo y dosis dependiente de JNK y ERK por As (III) (Dong, 2002) y de p38 por el isómero



*p,p'*-DDT, activación indispensable para la inducción de AP-1 (Frigo *et al.*, 2004).

En resumen, es posible que el aumento de ROS inducido por DDT y sus metabolitos en PBMC, estimule la activación de los factores de transcripción AP1 y/o NF- $\kappa$ B, a través de la activación de MAPKs. Estos factores de transcripción modulan la expresión de genes involucrados en inflamación, incrementando la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), COX-2, Caspasa-1, entre otros.

## **V. CONCLUSIONES.**

Finalmente, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que el principal metabolito del DDT, el *p,p'*-DDE actúe como un inductor del proceso inflamatorio. Este mecanismo de toxicidad desconocido para el DDT y sus metabolitos, se suma a los ya descritos para otros compuestos tóxicos como el As, y que se especula podrían exacerbar la severidad de algunas enfermedades con componentes inflamatorio (por ej., artritis reumatoide y aterosclerosis). Tomando en cuenta que el DDT es un compuesto altamente persistente y que ha sido encontrado tanto en matrices ambientales (Herrera-Portugal *et al.*, 2005) como biológicas, y aún mas importante en sangre de población general (Pérez-Maldonado *et al.*, 2006; Trejo-Acevedo *et al.*, 2008), resulta primordial la evaluación de estos biomarcadores de inflamación en

población expuesta, así como definir el papel que tienen moléculas clave del proceso inflamatorio, como MAPKs, NF- $\kappa$ B y AP-1 en el efecto tóxico de este insecticida.

## VI. REFERENCIAS.

Alegría-Torres, J. A., 2008. DDE: Mecanismos Moleculares de Apoptosis y de Respuesta Génica en Células Mononucleares de Sangre Periférica. Tesis Doctoral.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, 2002. Toxicological profile for DDT/DDE/DDD. US Public Health Service, Atlanta, GA.

Azad, N., Rojanasakul, Y. Vallyathan, V., 2008. Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *J Toxicol Environ Health*. 11: 1–15.

Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E.F., Yaniv, M., 2002. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol*. 22: 4952-4964.

Baeuerle, P.A., Henkel, T., 1994. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141–179.

Beach, T.M., Whalen, M.M., 2006. Effects of organochlorine pesticides on interleukin secretion from lymphocytes. *Hum Exp Toxicol*. 25: 651- 659.

Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., Rezzani, R., 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 23:381-390.

Caballero, R.M. Diagnóstico Regional del uso del DDT y el control de la malaria. Informe Regional para México y Centroamérica Instituto de Salud y Ambiente, México (2001) pp. 5–28.

CEC. 1997. North American Regional Action Plan On DDT, North American Working Group For The Sound Management Of Chemicals Task Force On DDT And Chlordane. Montreal: Commission for Environmental Cooperation.

Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37–40.

Chen, F. and Shi, X., 2002. Signaling from Toxic Metals to NF- $\kappa$ B and Beyond: Not Just a Matter of Reactive Oxygen Species. *Environ Health Perspect*. 110:807-811.

Díaz-Barriga, F., Borja-Aburto, V., Waliszewski, SM., Yáñez, L., 2002. DDT in Mexico. In “The handbook of environmental chemistry Vol 3, Part O Persistent

Organic Pollutants" (H. Fiedler, Ed.), pp 371–88. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Dong, Z., 2002. The molecular mechanisms of arsenic-induced cell transformation and apoptosis. *Environ Health Perspect.* 110: 757-759.

Dörner, G., Plagemann, A., 2002. DDT in human milk and mental capacities in children at school age: an additional view on PISA 2000. *Neuro Endocrinol Lett.* 23: 427–431.

Frigo, DE., Tang, Y., Beckman, BS., Scandurro, AB., Alam, J., Burow, ME., McLachlan, JA., 2004. Mechanism of AP-1- mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis.* 25: 249–261.

Frigo, DE., Vigh KA., Struckhoff AP., Elliott, S., Beckman BS., Burow, ME., McLachlan JA., 2005. Xenobiotic-induced TNF- $\alpha$  expression and apoptosis through the p38 MAPK signaling pathway. *Toxicol Lett.* 155: 227–238.

Fry, RC., Navasumrit, P., Valiathan, C., Svensson, JP., Hogan, BJ., Luo, M., Bhattacharya, S., Kandjanapa, K., Soontararuks, S., Nookabkaew, S., Mahidol, Ch., Ruchirawat, M., Samson LD., 2007. Activation of Inflammation/NF- $\kappa$ B Signaling in Infants Born to Arsenic-Exposed Mothers. *PLoS Genet.* 3: 2180-2189.

Kato, Y., Chao, TH., Hayashi, M., Tapping, RI., Lee, JD., 2000. Role of BMK in regulation of grow factor-induced cellular responses. *Immunol. Res.* 21: 233-237.

Kim, JY., Choi, CY., Lee, KJ., Shin, DW., Jung, KS., Chung, Y.C., Lee, S.S., Shin, JG., Jeong, H.G., 2004. Induction of inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression by o,p'-DDT in macrophages. *Toxicol Lett.* 147:261–269.

Kumar, A., Takada, Y., Boriek., A.M., Aggarwal, B., 2002. Nuclear factor-kB: its role in health and disease. *J Mol Med.* 82: 434–448.

Herrera-Portugal, C., Ochoa, H., Franco-Sánchez, G., Yáñez, L., Díaz-Barriga, F., 2005. Environmental pathways of exposure to DDT for children living in a malarious area of Chiapas, Mexico. *Environ Res.* 99: 158-63.

Hsu, H.Y., Wen, M.H., 2002. Lipopolysaccharide-mediated Reactive Oxygen Species and Signal Transduction in the Regulation of Interleukin-1 Gene Expression. *J Biol Chem.* 277: 22131–22139.

Huber, DV., Bauer, K., Suesal, C., Conradt, C., Opelz, G., 2002. Associations of dichlorophenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 blood levels with plasma IL-4. *Arch Environ Health.* 57: 541-47.

- Kuwano, T., Nakao, S., Yamamoto, H., Tsuneyoshi, M., Yamamoto T., Kuwano, M., Ono, M., 2004. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *The FASEB Journal*. 18:300-310.
- Kwon, O., Lee, E., Moon, TC., Jung, H., Lin, CX., Nam, KS., Baek, SH., Min, HK., Chang HW., 2002. Expression of Cyclooxygenase-2 and Pro-inflammatory Cytokines Induced by 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153) in Human Mast Cells Requires NF-k B Activation. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1165—1168
- Liu, Y., Shepherd, EG., Nelin, LD., 2007. MAPK phosphatases-regulating the immune response. *Nat Rev Immunol*. 7: 202-212.
- Longnecker, MP., Klebanoff, MA., Zhou, H., Brock, JW., 2001. Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestacional-age-babies at birth. *Lancet*. 358: 110–114.
- Martindale, JL., Holbrook, NJ., 2002. Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *J Cell Physiol*. 192: 1–15.
- Martinon, F., Tschopp, J., 2007. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches inflammation (Review). *Cell Death Differ*. 14: 10-22.
- Miersma, NA., Pepper, CB., Anderson, TA., 2003. Organochlorine pesticides in elementary school yards along the Texas-Mexico border. *Environ Pollut*. 16: 65–71.
- Ming, WJ., Bersani, L., Mantovani, A., 1987. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 138: 1469-1474.
- Núñez, MA., Estrada, I., Calderon-Aranda ES., 2002. DDT inhibits the functional activation of murine macrophages and decreases resistance to infection by *Mycobacterium microti*. *Toxicology*. 174: 201–210.
- Pérez-Maldonado, IN., Díaz-Barriga, F., De la Fuente, H., González-Amaro, R., Calderón, J., Yáñez, L., 2004. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ. Res*. 94: 38-46
- Pérez-Maldonado, IN., Herrera, C., Batres, LE., González-Amaro, R., Díaz-Barriga, F., Yáñez, L., 2005. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ. Res*. 98: 117-184.
- Pérez-Maldonado, IN., Athanasiadou, M., Yáñez, L., González-Amaro, R., Bergman, A., Díaz-Barriga, F., 2006. DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite. *Sci Total Environ*. 370: 343–351.

Petrone, WF., English, DK., Wong, K., McCord, JM., 1980. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 77:1159–1163.

Rutkowski, R., Pancewicz, SA., Rutkowski, K., Rutkowska, J., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski.* 23: 131-136.

Thannickal, VJ., Fanburg, BL., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: 1005–1028.

Torres-Arreola, L., López-Carrillo, L., Torres-Sánchez, L., Cebrian, M., Rueda, C., Reyes, R., López-Cervantes, M., 1999. Levels of dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) metabolites in maternal milk and their determinant factor. *Arch. Environ. Health* 54: 124–129.

Trejo-Acevedo, A., Díaz-Barriga, F., Domínguez, G., Costilla, R., Ize-Lema, I., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García A., Mejía-Saavedra, J., Pérez-Maldonado, IN., 2008. Biomonitoring of Persistent Organic Pollutants and Metals in Mexican Children. Tesis Doctoral.

Tseng, CH., 2002. An overview on peripheral vascular disease in blackfoot disease-hyperendemic villages in Taiwan. *Angiology.* 53: 529–537.

Tseng, CH., 2008. Cardiovascular disease in arsenic-exposed subjects living in the arseniasis-hyperendemic areas in Taiwan. *Atherosclerosis.* 199: 12 – 18.

Tsoua, TC., Yeh, SC., Tsaib, EM., Tsaia, FY., Chaod, HR., Changa, LW., 2005. Arsenite enhances tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced expression of vascular cell adhesion molecule-1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 209: 10– 18.

Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Boone, E., 1998. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 273: 3285–3290.

Vine, MF., Stein, L., Weigle, K., Schroeder, J., Degnan, D., Tse, C.K., Backer, L., 2001. Plasma 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene (DDE) levels and immune response. *Am. J. Epidemiol.* 153: 53–63.

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Review Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation.* 10: 45–65.

Waliszewski, SM., Pardio, VT., Waliszewski, KN., Chantiri, JN., Aguirre, AA., Infanzon, RM., Rivera, J., 1997. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *Sci. Total Environ.* 208: 127–132.

Waliszewski, SM., Aguirre, AA., Infanzon, RM., Silva, CS., Siliceo, J., 2001. Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz. *Arch Environ Contam Toxicol.* 40: 432–438.

WHO World Health Organization, Geneva (1979). *Environmental Health Criteria 9. DDT and its Derivatives.*

Wu, MM., Chiou, HY., Ho, IC., Chen, CJ., Lee, TC., 2003. Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ Health Perspect.* 11: 1429-1438.

Yáñez, L., Ortiz-Pérez, M., Batres, LE., Borja-Aburto, VH., Díaz-Barriga, F., 2002. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of México. *Environ. Res.* 88: 174–181.

## VII. PIE DE FIGURAS

**Figura 1.** Viabilidad celular de PBMC expuestas in-vitro a *p,p'*-DDE durante 24 h. Los resultados corresponden a la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar de la media (DS) de 3 experimentos independientes hechos por triplicado.

**Figura 2.** Cuantificación de células productoras de IL1- $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en PBMC. Las gráficas muestran el % de células positivas a cada uno de los tiempos de incubación con el agente tóxico y con el control de vehículo. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de 4 experimentos independientes hechos por triplicado. A: Producción intracelular de IL1- $\alpha$ , B: Producción intracelular de IL-6 y C: Producción intracelular de TNF- $\alpha$ .

\*  $p < 0.05$  comparando vehículo contra 10  $\mu$ g/ml de *p,p'*-DDE y 80  $\mu$ g/ml de *p,p'*-DDE.

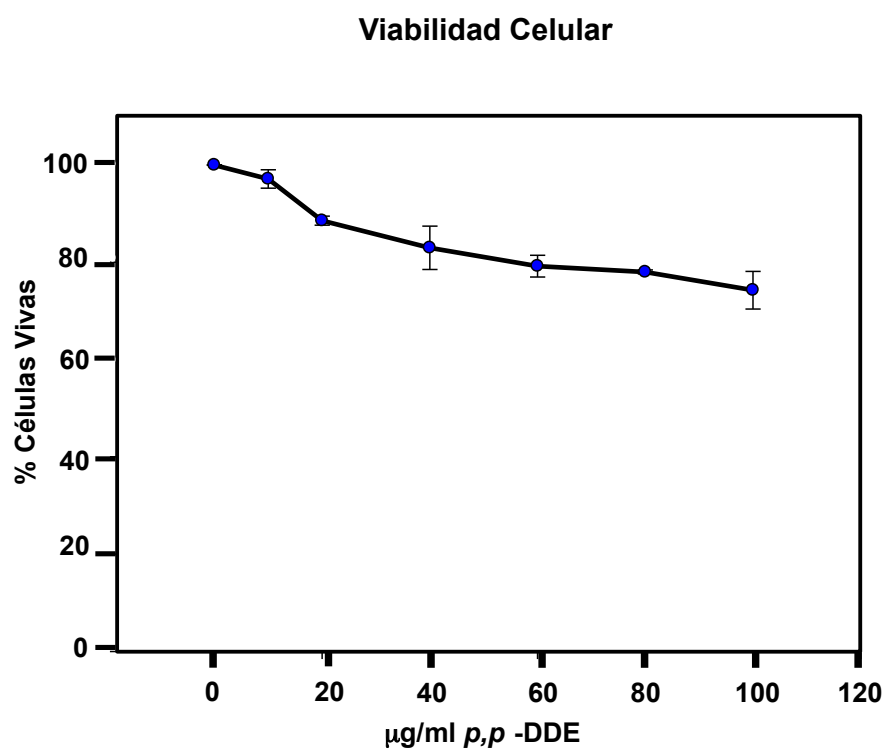
**Figura 3.** COX-2 (72kDa). Las células se trataron con diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE (1, 10, 40, 80  $\mu$ g/ml), con acetona al 2% (control de vehículo) y con 10  $\mu$ g/ml de LPS (control positivo) por 1 h. Se muestra un experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente.

**Figura 4.** Caspasa 1 (10 y 20 kDa). Las células se trataron con diferentes concentraciones de *p,p'*-DDE (1,10,40,80  $\mu$ g/ml), con acetona al 2% (control de vehículo) y con 10  $\mu$ g/ml de LPS (control positivo) por 1h. Se muestra un experimento representativo de 3 llevados a cabo de manera independiente.



## VIII. FIGURAS

Figura 1.



**Figura 2.**

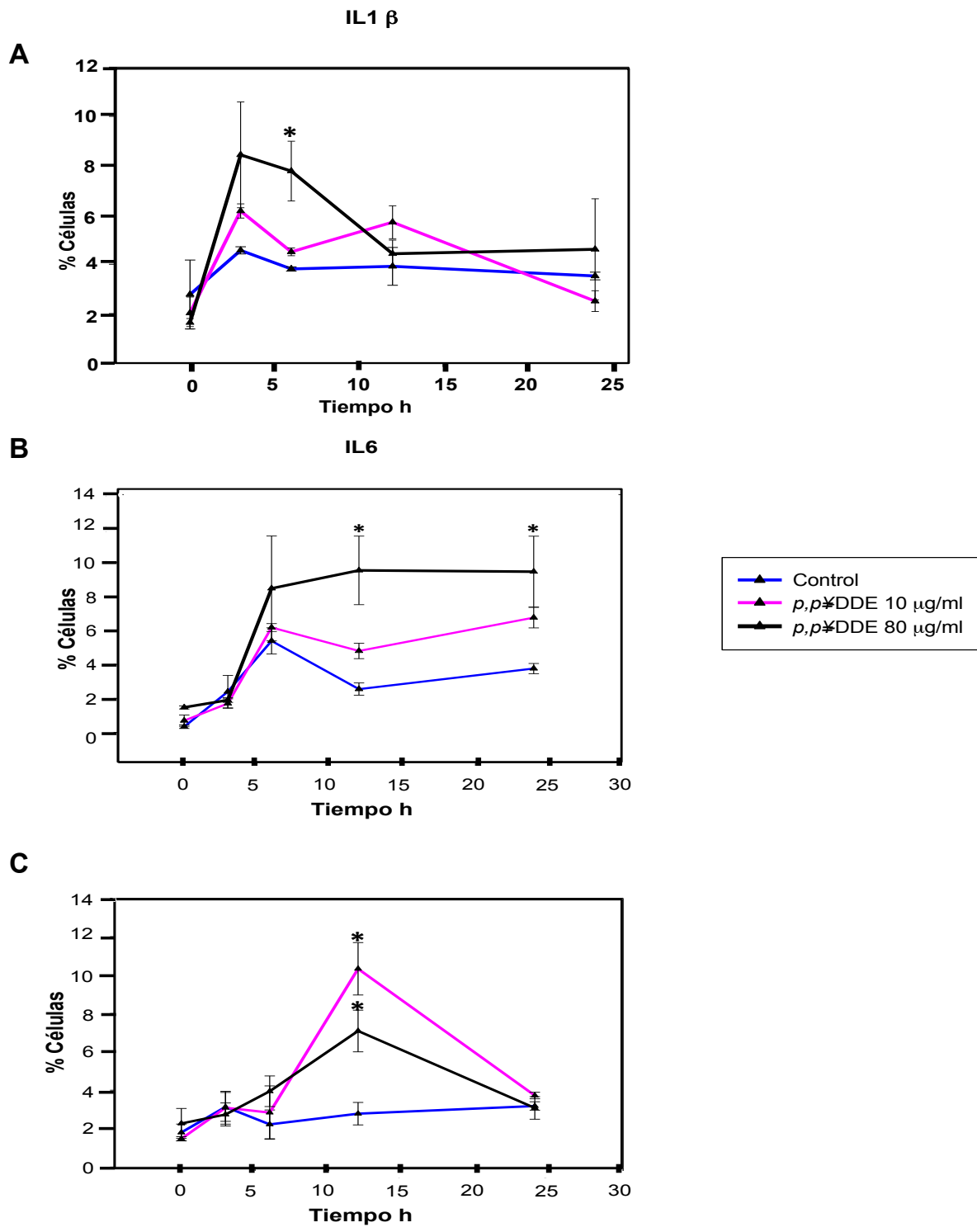


Figura 3.

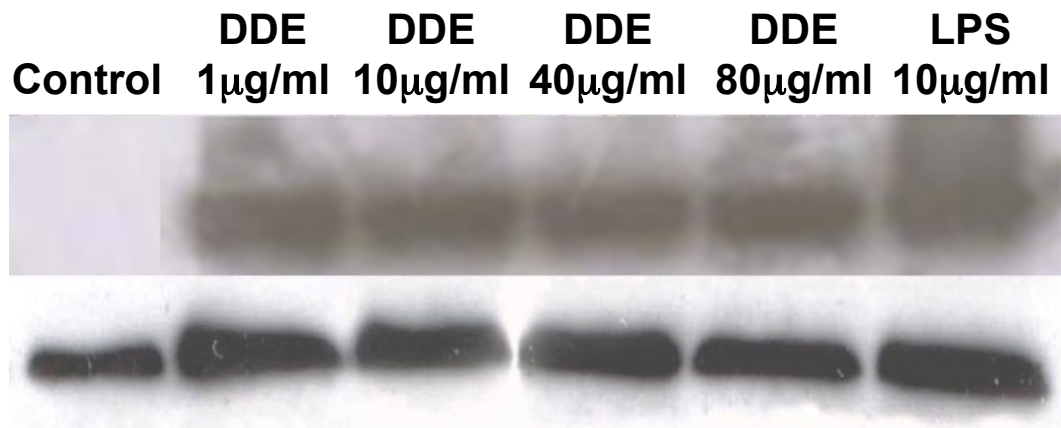


Figura 4.

**Control**

**p,p -DDE  
10  $\mu$ g/ml**

**p,p -DDE  
80  $\mu$ g/ml**

