



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TOXICIDAD INDUCIDA POR BENZO(*ghi*)PERILENO
EN CÉLULAS BRONQUIALES HUMANAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ZARAGOZA OJEDA PAOLA MONTSERRAT

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO,
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO,
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO,
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de noviembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ZARAGOZA OJEDA PAOLA MONTSERRAT** con número de cuenta **304653054**, con la tesis titulada **"TOXICIDAD INDUCIDA POR BENZO(ghi)PERILENO EN CÉLULAS BRONQUIALES HUMANAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO**:

Presidente: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
Vocal: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Secretario: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Suplente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Suplente: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de febrero de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



C.P. AGUSTIN MERCADO

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la formación profesional que recibí en el programa de maestría.

Al programa de becas para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que se me otorgó para realizar esta investigación (CVU: 508581).

A la Dirección de Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez, por el apoyo económico para la realización de este estudio: Fondos Federales proyecto: HIM/2013/012/ SSA 1064.

Un gran y sincero agradecimiento a mi tutor principal Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero y a los miembros de mi comité tutorial Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y Dra. Leda Carolina Torres Maldonado por todas las asesorías, enseñanzas, apoyo y paciencia que tuvieron conmigo durante la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A todas aquellas personas que de una forma u otra participaron en la realización de este proyecto. Ya sea ayudándome dentro o fuera del laboratorio, revisando resultados, leyendo, opinando, corrigiendo, preguntándome sus dudas y haciéndome estudiar, dejándome enseñarles lo poco que puedo, teniéndome paciencia, confiando en mi, dándome animo, brindándome su amor, amistad o cariño. Pero sobre todo rescatándome en mis crisis para nunca dejarme caer y acompañándome en mis grandes momentos de felicidad. Sé que sin todos ustedes este proceso no hubiera sido lo mismo y les agradezco infinitamente por ayudarme a ser la persona y profesionalista que soy hoy.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Origen y destino de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).....	3
1.2 Estructura y actividad biológica de los HAPs.....	6
1.3 Metabolismo de HAPs y su relación con la salud.....	7
1.4 Activación de la vía AhR.....	11
1.5 Los HAPs en el aire de las Ciudades.....	13
2. OBJETIVO GENERAL	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
3. ANTECEDENTES	15
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. METODOLOGÍAS	
6.1 Cultivo de la línea celular bronquial humana NL-20.....	20
6.2 Esquemas de exposición a BghIP.....	20
6.3 Viabilidad celular por absorción de rojo neutro.....	21
6.4 Viabilidad celular por liberación de LDH al medio.....	22
6.5 Tinción con cristal violeta.....	22
6.6 Inmunocitoquímica del receptor AhR.....	23
6.7 Expresión de los genes AhR y CYP4B1.....	23
6.7.1 Extracción de RNA total.....	23
6.7.2 Síntesis de cDNA.....	24
6.7.3 Expresión de genes por RT-qPCR.....	24
6.8 Tinción con naranja de acridina.....	25
6.9 Detección de radicales libres a través de la reducción del bromuro 3-(4,5- dimitiltiazol-2il)-2,5-difeniltrazolio (MTT).....	26
6.10 Análisis estadístico.....	26

7. RESULTADOS	
7.1 Retención de rojo neutro en las células NL-20 expuestas a <i>BghiP</i>	27
7.2 Cambios morfológicos inducidos por <i>BghiP</i> en las células NL-20.....	28
7.3 Daño en las membranas de las células.....	34
7.4 Translocación del receptor AhR al núcleo de las células.....	36
7.5 Expresión de los genes AhR y CYP4B1.....	39
7.6 Generación de estrés oxidante.....	41
8. DISCUSIÓN	
8.1 Efectos en la viabilidad de las células NL-20.....	44
8.2 Cambios morfológicos inducidos.....	46
8.3 Traslocación del receptor AhR al núcleo de las células.....	48
8.4 Expresión de los genes AhR y CYP4B1.....	49
8.5 Generación de estrés oxidante.....	51
9. CONCLUSIONES.....	53
10. LITERATURA CITADA.....	54

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Tipos de estructuras de HAPS.....	3
Figura 2: Regiones estructurales de los HAPs que contribuyen al efecto carcinogénico.....	7
Figura 3: Modelo de difusión de los HAPs a los capilares.....	10
Figura 4: Modelo de activación de la vía AhR.....	13
Figura 5: Estructura molecular del Benzo(<i>ghi</i>)perileno.....	17
Figura 6: Efecto del <i>BghiP</i> en la viabilidad de las células NL-20 medido con rojo neutro.....	27
Figura 7: Células expuestas a <i>BghiP</i> con DMSO como vehículo.....	29
Figura 8: Células expuestas a <i>BghiP</i> con ácidos omega como vehículo.....	30
Figura 9: Células expuestas a <i>BghiP</i> + CH223191 con DMSO como vehículo.....	31
Figura 10: Células expuestas a <i>BghiP</i> + CH223191 con ácidos omega como vehículo.....	32
Figura 11: Células expuestas a <i>BghiP</i> teñidas con naranja de acridina.....	33
Figura 12: Efecto del <i>BghiP</i> en la viabilidad de las células NL-20 medida con LDH....	35
Figura 13: Inmunocitoquímica de células expuestas a <i>BghiP</i> con DMSO como vehículo.....	37
Figura 14: Inmunocitoquímica de células expuestas a <i>BghiP</i> con ácidos omega como vehículo.....	38
Figura 15: Efecto del <i>BghiP</i> en la expresión de los genes AhR y CYP4B1, RT-qPCR.	40
Figura 16: Efecto del <i>BghiP</i> en la producción de especies reactivas de oxígeno.....	41
Tabla 1: Porcentaje de HAPs en la fase particulada y número de anillos.....	5
Tabla 2: Concentraciones de PM _{2.5} , BaP y <i>BghiP</i> en la atmosfera de la ciudad de México.....	16
Tabla 3: Porcentaje de viabilidad inducidos por 0.1 µg/µL de FOS.....	21
Tabla 4: Secuencias de los primers de los genes GAPDH, AhR y CYP4B1.....	25
Tabla 5: Resumen de resultados.....	42

RESUMEN

El compuesto más abundante en la atmósfera de la ciudad de México es el benzo(*ghi*)perileno (*BghiP*), un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) que se produce principalmente por quema incompleta de gasolina. La importancia de estudiar este hidrocarburo radica en que la primera vez que se evaluó por la IARC, en 1983, se clasificó con resultados inadecuados para considerarlo carcinogénico en animales, así como no clasificable como carcinogénico para seres humanos (grupo 3). Desde entonces, se ha mantenido en ese estatus ya que no se ha generado nueva información sobre él. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos tóxicos *in vitro* del *BghiP* en células bronquiales humanas de la línea celular NL-20.

Las células se expusieron a 0.272, 0.561 y 1.24 $\mu\text{g/mL}$ de *BghiP* disuelto en DMSO o ácidos omega como vehículos, en presencia y ausencia del antagonista del receptor AhR (CH-223191). Los resultados demuestran que las células expuestas a *BghiP* pierden integridad en las membranas conforme la concentración de exposición se incrementa, este efecto se observó en ambos vehículos. Las células expuestas no pierden la capacidad de retener el colorante rojo neutro, por lo que los lisosomas no se ven afectados.

A través de inmunocitoquímica se reveló que el *BghiP* causa la translocación del receptor al núcleo de las células. Lo que demuestra que este compuesto es capaz de unirse al receptor AhR, y a través de él inducir la transcripción de genes que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo de xenobióticos (activación de la vía AhR). Mediante RT-qPCR se analizó la expresión del gen AhR y CYP4B1 (como efector de la vía específica para pulmón). En las células expuestas a *BghiP* utilizando DMSO como vehículo ambos genes se sobreexpresan 1 y 2 veces más, respectivamente conforme aumenta la concentración de *BghiP* comparado con el testigo sin exposición. Mientras que al utilizar ácidos omega, AhR se expresa de 4 a 5 veces más, pero no hay sobreexpresión significativa del CYP4B1. Todos estos efectos disminuyen al bloquear el receptor con el antagonista CH-223191.

El *BghiP* induce estrés oxidante en las células expuestas y al antagonizar al receptor se eleva al doble, lo que demuestra que la activación de la vía suprime en parte la acumulación de especies reactivas. En todas las concentraciones de exposición y en ambos vehículos se observaron vesículas translucidas, no ácidas en todo el citoplasma, aun en presencia del antagonista, por lo que este efecto no está relacionado con la activación de AhR.

ABSTRACT

The most abundant pollutant in the atmosphere of Mexico City is benzo(*ghi*)perylene (*BghiP*); a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) whose main source is incomplete combustion of gasoline. The importance of studying this compound lies on the fact that the results of the first studies on this hydrocarbon, carried in 1983 by the IARC, led to its classification as non-carcinogenic in humans (group 3) and with inadequate results in experimental animals. Since then, it has kept such status as no further information has been obtained. The aim of this work was to evaluate the toxic effects of *BghiP* on human NL-20 bronchial cells in vitro.

Cells were exposed to *BghiP* in three concentrations: 0.272, 0.561 and 1.24 µg/mL in DMSO or Omega acids as vehicles, in two conditions: presence or absence of AhR receptor antagonist (CH-223191). Results showed that exposure to *BghiP* affects membrane integrity in a dose dependent manner, regardless of vehicle. Lysosomes are not affected by exposure, as it was observed by neutral red staining.

Immunocytochemistry revealed that *BghiP* provokes nuclear translocation of AhR receptor, which indicates that this compound can induce transcription of genes coding for enzymes related to xenobiotic metabolism via receptor binding (AhR pathway activation). Expression of AhR and CYP4B1 (a lung-specific effector) was analyzed by RT-qPCR. In the cells exposed to *BghiP* in DMSO as vehicle, expression of both genes is augmented in a dose dependent manner compared to control cells without exposure. When omega acids were used as vehicle, only AhR is over expressed. All these effects diminish when AhR receptor is blocked with antagonist CH-223191.

BghiP induced oxidative stress in exposed cells; such stress is even higher when receptor is blocked, which demonstrates that pathway activation contributes in part to suppression of reactive species accumulation. Translucent, non-acidic vesicles in cytosol were observed in cells exposed to *BghiP* in both vehicles at all concentrations, even in presence of antagonist; thus, this effect is not related to AhR activation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen y destino de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes ambientales que se forman con la combustión incompleta de virtualmente cualquier tipo de materia orgánica. La mayor parte de éstos se generan por actividades antropogénicas: la quema de combustibles, basura y otras sustancias orgánicas como el tabaco o vegetación, por citar algunos. Sin embargo los incendios forestales y erupciones volcánicas, a pesar de su origen natural contribuyen, aunque en menor cantidad, a la formación y acumulación de hidrocarburos (Harvey, 1997; Ziad, 2008; Kim *et al.*, 2013).

Todos los HAPs son similares en estructura la cual consiste en 2 o más anillos de benceno fusionados de forma lineal, en racimo o angularmente. Se clasifican como peri-condensados a aquellos compuestos que forman ciclos, es decir que todas sus líneas están conectadas al centro, esta categoría se subdivide en: alternantes formados por miembros con anillos de 6 carbonos y los no alternantes con miembros de anillos insaturados de 4, 5 ó 6 carbonos. Los HAPs cata-condensados, no forman ciclos y se clasifican como ramificados o no ramificados, estos hidrocarburos son más estables termodinámicamente y menos reactivos que los cíclicos (Fig. 1) (Ramesh *et al.* 2004; Baird *et al.* 2005).

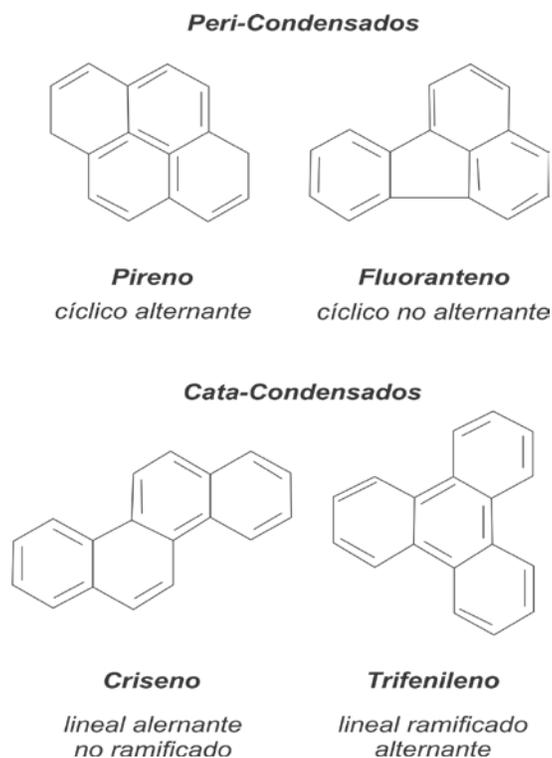


Figura 1. Tipos de estructuras de HAPs. Adaptado de Ramesh *et al.* (2004).

Los HAPs están ampliamente distribuidos en la atmosfera y pueden transportarse grandes distancias. Su comportamiento dependerá en gran medida de las características físico-químicas que posean individualmente, las interacciones que puedan tener con otros contaminantes, las transformaciones fotoquímicas que se puedan generar y a las condiciones meteorológicas a las que se encuentren expuestos. Una vez dentro de la atmosfera pueden permanecer en dos fases, dependiendo de factores ambientales (como temperatura, humedad relativa, entre otros), la naturaleza de su fuente y sus características químicas. La fase en la que se encuentren es de suma importancia ya que determinará las cantidades relativas de deposición en el ambiente que cada HAP tendrá, las cuales pueden ser húmeda (precipitación), seca (partículas) o por intercambio gaseoso entre la interfase de aire y agua (Tasdemir y Esen, 2007; Kim *et al.*, 2013).

Por lo general los HAPs de bajo peso molecular, que contienen de 2 a 4 anillos, son más solubles en agua y más volátiles (con bajas temperaturas de condensación) por lo que permanecen en la troposfera en fase vapor. Aunque éstos se consideran menos tóxicos, tienen la capacidad de reaccionar con otros contaminantes (como ozono, oxidos de nitrógeno y dióxidos de azufre) para formar diones, nitro- o dinitro-HAPs y acidos sulfúricos, respectivamente, lo que incrementa su toxicidad. Mientras que los de alto peso molecular, con más de 4 anillos fusionados, tienen muy poca vaporización en condiciones ambientales y al ser altamente lipofílicos y no polares son adsorbidos en la materia particulada o pueden condensarse generando partículas con diámetro menor a 10 μm (PM_{10}) o diámetro menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$). Entre el 80 y 100 % de los HAPs con 5 o más anillos, se encuentran asociados a materia particulada (Tabla 1). De esta manera persisten por mucho tiempo en el ambiente, formando el aerosol (Kuusimäki *et al.*, 2003; Rajput y Lakhani, 2010; Kim *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Slezakova *et al.* (2013) en la ciudad de Oporto (Portugal) se demostró que los niveles de HAPs asociados a materia particulada son significativamente más elevados dentro de las zonas urbanas. Al evaluar un total de 17 HAPs en $\text{PM}_{2.5}$ y PM_{10} , la concentración se elevó en 2240 % y 640 % respectivamente, dentro de la zona urbana en comparación con la zona de referencia. Para ambos sitios los compuestos con 5 anillos fueron los más abundantes (siendo el 36 % de los HAPs totales) seguidos por los compuestos de 6 anillos (28 % de los HAPs totales). Lo cual indica que los HAPs se asocian predominantemente a partículas de menor tamaño, esto es especialmente importante ya que son éstas las que mayores efectos en la salud ocasionan (Kuusimäki *et al.*, 2003; Slezakova *et al.*, 2013).

Tabla 1. Porcentaje de HAPs en la fase particulada y su número de anillos. Modificada de Kim *et al.* (2013).

HAP	Numero de anillos	Porcentaje total en la fase particulada
Naftaleno	2	2 %
Fluoreno	3	5 %
Acenafteno	3	4 %
Acenaftileno	3	11 %
Fenantreno	3	9 %
Antraceno	3	8 %
Fluoranteno	4	16 %
Pireno	4	55 %
Benzo(a)antraceno	4	78 %
Criseno	4	89 %
Benzo(b) fluoranteno	5	91 %
Benzo(a)pireno	5	89 %
Benzo(e)pireno	5	85 %
Perileno	5	100 %
Benzo(ah)perileno	6	83 %
Indeno(1,2,3-cd)pireno	6	100 %
Antantreno	6	100 %
Coroneno	7	100 %

Como otros contaminantes, los HAPs unidos a materia particulada se depositan del aire a la biosfera terrestre. Ésta es una de las principales rutas por la que los HAPs entran en los ecosistemas. Por su carácter lipofílico, se encuentran principalmente en suelo, sedimento y sustancias oleicas, por lo cual los seres humanos y otros organismos pueden estar expuestos al consumir las plantas que crecen en el suelo contaminado. Aunque la principal ruta de exposición para la población en general es a través de la respiración, algunos casos pueden también involucrar múltiples rutas afectando la dosis total de absorción (Kim *et al.*, 2013).

Otro aspecto relevante que puede variar la concentración de HAPs en el aire es la temporalidad. En la mayoría de zonas urbanas, residenciales y rurales donde las fuentes de producción de HAPs se deben a calefacción residencial o comercial y a la cantidad de tráfico vehicular, hay gran variabilidad en el tipo y concentración de hidrocarburos dependiendo de la temporada del año. Los impactos en la salud y en el ambiente que producen los transportes es hoy en día un tema de gran discusión ya que su volumen crece cada año. En consecuencia muchos contaminantes como óxidos de nitrógeno, materia particulada y HAPs se emiten a la atmosfera causando una gran baja en la calidad del aire (Kim *et al.*, 2013; Slezakova *et al.*, 2013).

1.2 Estructura y actividad biológica de los HAPs

La actividad biológica de los HAPs se debe en gran parte a la composición química que poseen. El número de anillos de benceno, los sitios de fusión, el punto de condensación, el grado y localización de los sitios de metilación u oxidación, son algunas de las características que influyen los efectos biológicos de cada HAP. De acuerdo a Jacob (1996), los HAPs que contienen más de tres anillos aromáticos son, potencialmente, más dañinos (Marin-Morales *et al.*, 2009).

Existen también algunos arreglos estructurales en los anillos de benceno que se toman en cuenta para caracterizar las propiedades carcinogénicas de los HAPs y sus derivados. Entre ellas están las regiones bahía que consisten en 3 anillos aromáticos, conectados de forma angular, creando un hueco (Fig. 2a). Una región pseudo-bahía está compuesta por dos anillos aromáticos y un anillo alifático terminal (Fig. 2b). Una región golfo es el resultado de la disposición angular de 4 anillos aromáticos (Fig. 2c) y en el caso de una región pseudo-golfo el anillo terminal se encuentra saturado (Fig. 2d) (Luczyński *et al.*, 2005; Marin-Morales *et al.*, 2009).

De acuerdo con Baird *et al.* (2005), los HAPs que tienen regiones bahía o golfo, suelen ser carcinógenos muy potentes. Los metabolitos derivados de HAPs con región bahía tienen una gran tendencia a formar iones carbonio, haciéndolos más reactivos. Otra característica estructural de los HAPs es la presencia de una región altamente electrodensa denominada "K". Ésta permite la formación de epóxidos, altamente reactivos por el hecho de permitir dobles enlaces, además de ser el sitio principal que se ataca en las reacciones metabólicas (Ramesh *et al.* 2004; Baird *et al.* 2005; Luczyński *et al.*, 2005; Marin-Morales *et al.*, 2009).

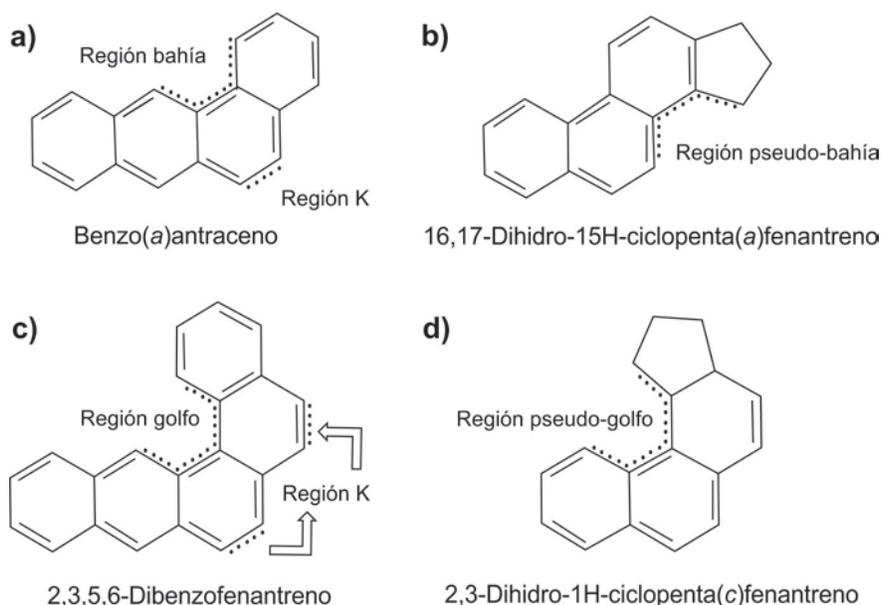


FIGURA 2. Ejemplos de regiones estructurales de los HAPs que contribuyen al efecto carcinogénico. Adaptado de Marin-Morales *et al.* (2009).

1.3 Metabolismo de HAPs y su relación con la salud

Los seres humanos se encuentran continuamente expuestos a mezclas complejas de contaminantes en el aire, el agua y el suelo, sin embargo no se sabe exactamente cuáles pueden ser las consecuencias a largo plazo que esto provoca. Los efectos biológicos de los HAPs en general han sido objeto de estudio durante varios años y en la actualidad existen muchas evidencias de que pueden causar tumores, ser agentes mutagénicos o promutagénicos e incluso actuar como inductores enzimáticos (Brant y Watson, 2003; Ziad, 2008).

Las investigaciones sobre los efectos de los HAPs comienzan con exposiciones a mezclas complejas como el hollín o carbón, fue así que en 1915 se demostró que restos de carbón, aplicados en orejas de conejos, inducían la formación tumores y que las exposiciones laborales (hombres que limpiaban chimeneas) provocaban que desarrollaran tumores en los testículos. Después la atención de los científicos se centro en identificar los compuestos individuales responsables de la formación de tumores. Fue así como a principio de los años 30, Hieger demostró que pequeñas cantidades de benzo(a)pireno (BaP), que extrajo de restos de carbón, causaba tumores en ratones (Yamagiwa y Ichikawa, 1915; Hieger, 1930; Pott, 2002).

Posteriormente se realizaron ensayos de largo plazo, exposiciones de 2 años, utilizando el alquitrán de la hulla que se dio a ingerir a ratones en concentraciones de 0.01 al 1 %. Como resultado éstos desarrollaron tumores en hígado, pulmón, estómago y otros órganos. De manera paralela se realizaron ensayos en ratón utilizando BaP y este fue capaz de inducir tumores en estómago, esófago y lengua. A partir de estas observaciones se comenzaron a estudiar diferentes HAPs en aplicaciones tópicas o inyecciones subcutáneas en ratones, para identificar la relación que existe entre su estructura, su metabolismo y su potencial carcinógeno. Sin embargo, ya que el BaP fue el primer hidrocarburo aislado y está demostrado que es un potente carcinógeno hasta la fecha se utiliza como compuesto modelo de carcinogénesis inducida por HAPs (Phillips, 1983; Ziad, 2008).

En 1940 se observó que dosis bajas de HAPs aplicados en la espalda de ratones no inducía tumores, pero al aplicarlos con aceite de piñón los tumores crecían, por lo que se consideró que el aceite era un agente promotor. En 1973 Borgen y colaboradores reportaron que un metabolito del BaP, el 7,8-dihidrodiol en pruebas *in vitro* se unía 10 veces más al DNA que su precursor, lo que causaba mayor toxicidad. Gracias a estos resultados se descubrió que la mayoría de los HAPs requieren lo que se conoce como activación metabólica para convertirlos en intermediarios electrofílicos reactivos que pueden unirse covalentemente a blancos nucleofílicos como el DNA, RNA y proteínas (Borgen *et al.*, 1973; Sims *et al.*, 1974; Binková y Šrám, 2004).

En general las reacciones responsables de la transformación metabólica de los xenobióticos consta de 2 fases: en la fase I se hacen las reacciones de activación y en la fase II las reacciones de conjugación. Las enzimas de fase I convierten compuestos no reactivos a intermediarios químicos y biológicamente activos, las enzimas responsables de esta activación son normalmente los citocromos (CYP) que forman epóxidos por hidrólisis; o la vía de orto-quinonas catalizada por aldoceto reductasas (AKR). Durante la fase II los productos activos de la fase I se unen covalentemente a alguna molécula hidrofílica endógena para formar un conjugado soluble en agua. El propósito principal de estas dos fases es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos para facilitar la excreción de los xenobióticos (Coleman *et al.*, 1997; Xue y Warshawsky, 2005; Shimada, 2006).

Los efectos agudos de los HAPs en la salud dependen principalmente del tiempo de exposición, concentración, toxicidad y ruta de exposición (inhalación, ingestión o dérmica). En exposiciones laborales en las cuales los trabajadores están en contacto con mezclas de HAPs, se ha reportado una serie de problemas en la salud (incremento de riesgo de cáncer de piel, pulmón, vejiga y gastrointestinales). De igual forma en animales de laboratorio expuestos crónicamente se han identificado problemas de reproducción y desarrollo. Se sabe también que los HAPs tienen el potencial para interferir con sistemas hormonales, lo que puede afectar a la reproducción y al sistema inmune. Además el daño al DNA también se ha reportado por varios autores (Borgen *et al.*, 1973; Sims *et al.*, 1974; Binková y Šrám, 2004).

Los pulmones se encuentran continuamente expuestos a los contaminantes atmosféricos. Cuando los HAPs están asociados a partículas y éstas son inhaladas, su tamaño es un factor determinante en cuanto a riesgo a la salud que representan, ya que es inversamente proporcional a la profundidad dentro del sistema respiratorio a la que pueden llegar, reportándose incluso en los alveolos. Esto ha despertado gran interés en los investigadores ya que como se ha venido mencionado, la materia particulada (PM) es muy abundante y aun no es claro si el principal responsable de los daños a la salud que éstas pueden causar se debe al parámetro físico (tamaño) o el químico (composición). Lo que sí se puede afirmar es que los HAPs asociados contribuyen al potenciamiento de los efectos. Según la EEA del 80 al 90% de la población en E UA está expuesta a niveles de PM mayores de los recomendados (Tokiwa *et al.*, 1998; Alfaro-Moreno *et al.*, 2002; Jardim *et al.*, 2009; Villalobos-Pietrini *et al.*, 2011; Slezakova *et al.*, 2013).

El metabolismo y activación de los xenobióticos se lleva a cabo principalmente en el hígado. Sin embargo, ya que la principal vía de exposición a HAPs es por inhalación, el pulmón es otro de los órganos que puede llevar a cabo su activación. Si los HAPs se encuentran asociados a partículas, la toxicidad de estos aumenta. Ya que al ser altamente lipofílicos no difunden rápidamente y por tanto se prolonga la retención de estos compuestos en el pulmón y como resultado se aumenta la dosis efectiva de exposición. Mientras más lipofílico sea el HAP (mayor peso molecular), será más bajo su ritmo de difusión desde el epitelio respiratorio al endotelio vascular y por lo tanto su mayor retención en el epitelio. Esto se demostró utilizando al BaP como modelo, encontrando dosis locales mayores en el epitelio traqueobronquial y bajas concentraciones en sangre. Si disminuye el carácter lipofílico del compuesto (reduciendo su peso molecular) se incrementa la tasa de difusión por el endotelio capilar (Fig. 3).

Los HAPs de más de 4 anillos, al tener poca capacidad de difusión pueden sufrir modificación y activación metabólica directamente por el epitelio bronquial, sin verse afectado por la activación sistémica que proviene de la actividad de los citocromos del hígado (Böstrom *et al.*, 2002; Brant y Watson, 2003; Xue y Warshawsky, 2005; Shimada, 2006).

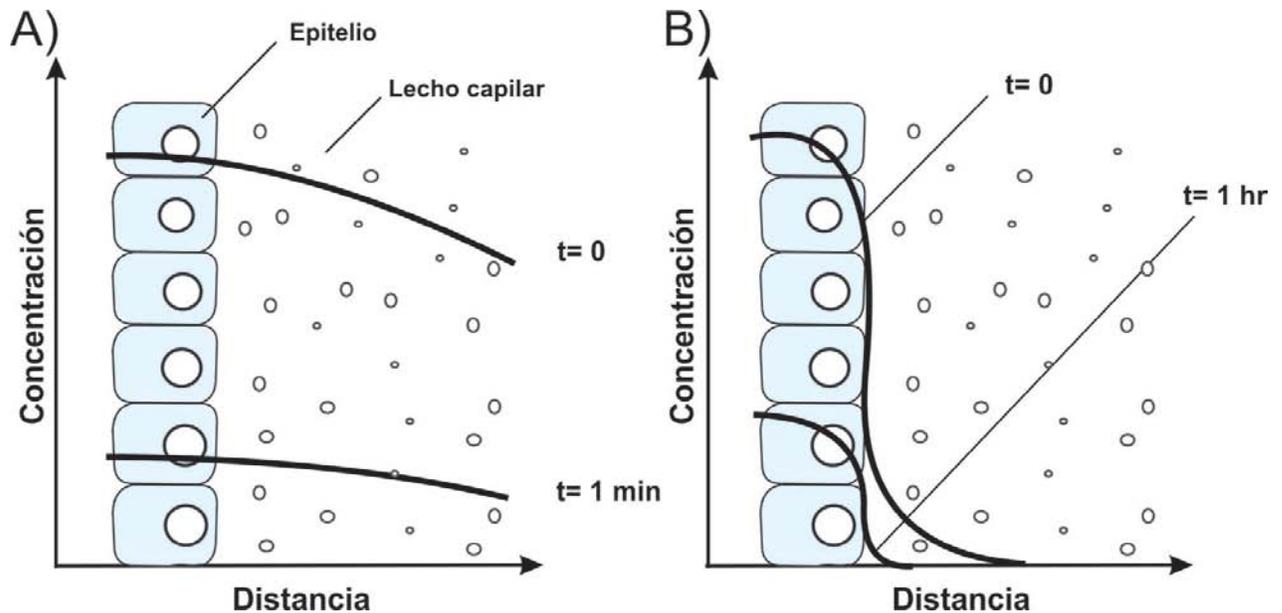


FIGURA 3. Modelo de difusión de los HAP a los capilares, favorecido en los menos lipofílicos (A) y disminuido en los más lipofílicos pues se retienen en mayor cantidad en las membranas celulares (B). Tomado de Böstrom *et al.* (2002).

La carcinogénesis y el desarrollo de tumores son los efectos inducidos por HAPs más reportados, pero no son los únicos. Se han demostrado también alteraciones inmunológicas y reproductivas. Además, muchos HAPs poseen estructuras similares a las hormonas esteroideas, esto sugiere que tienen el potencial de inducir respuestas estrogénicas y anti-estrogénicas en seres humanos, mediadas por la activación del receptor de estrógenos (ER) y la degradación de éste, respectivamente. La toxicidad mediada por ER tiene que ver con la capacidad que tenga el HAP para competir con los estrógenos naturales y unirse al receptor (Santodonato, 1997; Brunnberg *et al.*, 2012).

Otro tipo de respuesta puede darse por la unión de los HAPs con receptores no estrogénicos, como el receptor aril hidrocarburo (AhR), que puede regular al ER a varios niveles. Ya que la unión del complejo AhR/Arnt en los elementos de respuesta a xenobióticos localizados en la proximidad del elemento de respuesta a estradiol, puede impedir la activación de genes dependientes de ER. Al activarse la vía de AhR debido a los HAPs, puede incrementarse la actividad de citocromos y éstos pueden modificar la molécula de estradiol y generar metabolitos con menos afinidad de unión al receptor ER. El receptor AhR unido a ligandos tipo HAPs, favorece el marcaje del ER para ser degradado por el sistema de ubiquitina y posteriormente vía proteosoma. La activación simultánea del ER y de AhR lleva a la competencia por los co-activadores de la transcripción (acetilasas de histonas) y puede afectar la expresión de los genes de ambas vías (Brunnberg *et al.*, 2012).

1.4 Activación de la vía AhR

Las células poseen varios mecanismos de protección ante la exposición a los compuestos tóxicos, entre ellos mecanismos moleculares que inducen o reducen la actividad de genes en respuesta a compuestos xenobióticos. Los HAPs pueden producir su propia biotransformación, ya que incrementan la expresión de varios genes al unirse al receptor aril-hidrocarburo (AhR) éste es un factor de transcripción ligando-dependiente, miembro de la familia hélice-asa-hélice básica (bHLH) con un par de dominios Per/Arnt/Sim (PAS), estos dominios se han encontrado en las proteínas **Per** (un factor que participa en la regulación del ciclo circadiano), también en **ARNT** que es la proteína con la que hace heterodimerización AhR y finalmente en una proteína (que participa en el desarrollo neuronal en *Drosophila*) "**single-minded**" o **Sim**, de ahí el nombre del dominio PAS. AhR se une a un gran variedad de compuestos exógenos, incluyendo xenobióticos como el benzo(a)pireno (BaP) y el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) (Opitz *et al.*, 2011; Ma, 2012).

El AhR se encuentra en el citoplasma en un complejo multiprotéico que incluye dos moléculas de proteínas chaperonas hsp90 (heat shock proteins de 90 kDa) que ayudan a mantener la conformación del receptor, una proteína AIP (auxiliar interacting protein), también conocida como XAP2 (**X-associated protein 2**) o Ara9 (AHR-associated protein 9) que estabiliza la interacción entre las hsp90 y el receptor, y una proteína co-chaperona p23 que estabiliza al complejo intermediario ligando-AhR. En presencia de un ligando, que se une con alta afinidad al AhR, el complejo multiprotéico se desacopla y el AhR-ligando se transloca rápidamente al núcleo, donde forma un heterodímero con Arnt (translocador nuclear del receptor aril hidrocarburo) (Arenas-Huertero *et al.* 2011; Opitz *et al.*, 2011).

El complejo AhR-Arnt se une a los XRE (del inglés: “xenobiotic response elements”) que contengan la secuencia consenso 5’- TNGCGTG -3’ lo que induce la transcripción de genes blanco que codifican para enzimas que participan en la activación y desintoxicación: enzimas de fase I y fase II, como citocromos (CYPs) y aldocetoreductasas (AKRs), respectivamente; y enzimas que participan en la activación de procesos como el ciclo celular, la adhesión, la migración, la apoptosis. Una vez liberado el AhR de su ligando, éste se ubiquitina y se degrada en el núcleo por la vía del proteosoma. Esta vía tiene su propia regulación negativa por AhRR (represor del receptor aril hidrocarburo) que se transactiva por el heterodímero AhR/Arnt, suprime la actividad transcripcional de AhR al competir por la dimerización con Arnt y la unión a XRE (Fig. 4) (Roberts y Whitelaw, 1999; Arenas-Huertero *et al.* 2011).

En animales experimentales, la activación de AhR por HAPs induce una variedad de efectos biológicos como el incremento de proliferación, inhibición de diferenciación, perturbación del balance endócrino y promoción de tumores. Esta vía representa una respuesta metabólica que protege al organismo de los contaminantes, aunque la función principal de estos procesos es desintoxicar al organismo, en algunos casos sucede exactamente lo contrario. Los derivados de estas reacciones resultan iguales o más tóxicos que el compuesto original; por ejemplo los ratones “knock out” del receptor AhR (AhR *-/-*) no presentan toxicidad inducida por TCDD, mientras que los “wild type” si, esto indica que la toxicidad de TCDD esta mediada por AhR. Lo mismo sucede con el BaP solo genera tumores en ratones que tienen AhR y no en los “knock out” (Coleman *et al.*, 1997; Opitz *et al.*, 2011).

Si bien se conoce que la vía de AhR se activa frente a una gran variedad de xenobióticos, su función fisiológica con ligandos endógenos comienza a estudiarse, se sabe que se regula diferencialmente dependiendo del tejido, como por ejemplo el cerebro y los metabolitos del triptófano. Se ha postulado con base en los patrones de expresión del AhR que juega un papel importante en el crecimiento normal y el desarrollo de embriones humanos y de ratón, aunque no se conoce el mecanismo de su participación. También se ha identificado que la quirurenina (Kyn), un catabolito del triptófano que se genera constitutivamente en células tumorales por la enzima TDO (triptófano 2,3- dioxigenasa) puede ser un ligando endógeno del AhR en seres humanos, la activación de AhR por Kyn se ha reportado en glioma, linfoma de células B, sarcoma de Ewing y cáncer de vejiga, de cervix, colorectal, de ovario y de pulmón (Opitz *et al.*, 2011).

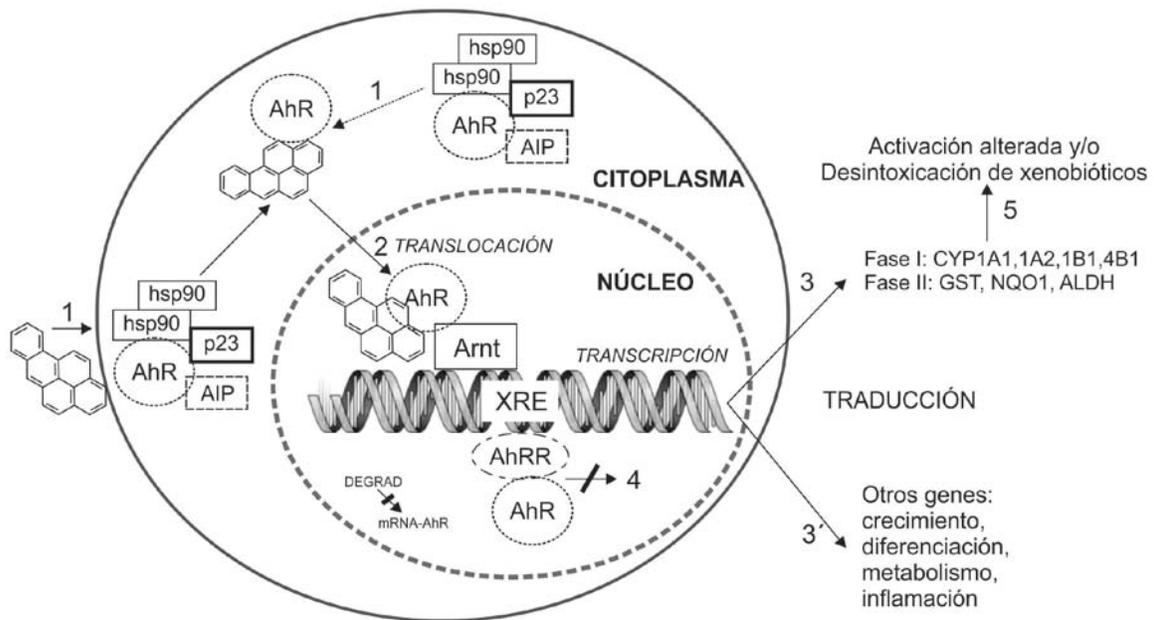


FIGURA 4. Activación de la vía AhR. Los HAPs interactúan con el receptor AhR citosólico que se encuentra asistido por otras proteínas como hsp90, p23 y AIP (1). Con la unión a ligando el complejo multiprotéico se desacopla y el AhR-HAP se transloca al núcleo (2) donde forma un heterodímero con Arnt. Éste reconoce y se une a las secuencias XRE en el DNA lo que activa la transcripción de genes blanco, que incluyen: genes de desintoxicación (fase I y fase II) (3), así como algunos que participan en otras respuestas celulares (3'). AhRR se transactiva como regulación negativa de la vía, al competir con AhR, por la dimerización de Arnt, lo que provoca que la inhibición de la transcripción de AhR y genes blanco (4). Los genes blanco inician el metabolismo de xenobióticos (5). Modificado de Arenas-Huertero *et al.* (2011).

1.5 Los HAPs en el aire de las Ciudades

El inventario nacional de emisiones atmosféricas del Reino Unido (National Atmospheric Emissions Inventory NAEI, 2013) demostró que durante el 2010 la emisión total de HAPs generados antropogénicamente, fue de 621 toneladas dentro de las cuales se encuentran los 16 HAPs de prioridad marcados por la EPA. Los HAPs atmosféricos se han estudiado ampliamente en gran variedad de localidades (ambientes urbanos, rurales y sitios remotos) (Tasdemir y Esen, 2007; Kim *et al.*, 2013).

Se sabe que la incidencia de cáncer de pulmón generalmente es más alta en las ciudades que en las zonas rurales, esto probablemente se debe a la presencia y concentración de algunos contaminantes que hay en el aire de las ciudades. Los niveles de HAPs en la atmosfera de las zonas urbanas dependen de factores como la densidad poblacional, los recursos locales, condiciones atmosféricas y condiciones geográficas, entre otras. En un esfuerzo por reducir los niveles de contaminación y con esto el riesgo de cáncer por exposición a HAPs, en 1996 la Comisión Gubernamental de Salud Ambiental propuso que en el año 2020 los niveles de BaP no deberán exceder 0.1 ng/m^3 (Böstrom *et al.*, 2002).

Se eligió al BaP como indicador por su alto potencial carcinógeno, sin embargo la mayoría de los estudios realizados por exposición a BaP se han hecho en condiciones de exposición ocupacional, las cuales suelen ser concentraciones muy altas y comparadas con los niveles de HAPs presentes en la atmosfera. Hoy en día difieren de manera importante los resultados de las exposiciones ambientales y ocupacionales; es por esto que el uso de BaP se ha cuestionado mucho (Böstrom *et al.*, 2002). Actualmente, los vehículos de motor se han convertido en la fuente más importante de HAPs en las ciudades. El transporte vehicular es uno de los mayores generadores de HAPs contribuyendo con cerca del 60% de las emisiones totales (Harvey, 1997; Ciganek *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2013).

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos tóxicos *in vitro* del benzo(*ghi*)perileno en células bronquiales humanas de la línea celular NL-20.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto del B*ghi*P en:

1. La viabilidad celular.
2. Los cambios morfológicos inducidos, con énfasis en la inducción de muerte celular.
3. La activación de la vía AhR, así como la expresión de algunos de sus genes efectores.

3. ANTECEDENTES

La Ciudad de México y el Área Metropolitana (CMAM) están localizadas en una cuenca dentro de la meseta central de México, con una población de alrededor de 20 millones. Además cuenta con 4 millones de vehículos y 35000 industrias. Tiene una latitud tropical (19°25'42"N; 99°07'39"O), el área urbana es de alrededor de 3500 Km² a una altitud de 2240 m y se encuentra rodeada por altas montañas, todas estas características hacen que la calidad del aire se degrade. En México el límite máximo permisible de PM₁₀ es de 120 µg/m³ en 24 horas (NOM-025-SSA1-1993).

Amador-Muñoz *et al.* (2013) reportaron que este límite nunca se excedió durante la época de enero de 1999 a diciembre 2002 en la Ciudad de México, sin embargo el promedio anual que se limita a 50 µg/m³ se rebasó durante los 4 años. Los promedios anuales de PM₁₀ encontrados en la Ciudad de México son parecidos a los reportados en muchas ciudades de EUA y Europa que tienen rangos de 20 a 70 µg/m³ y son mucho menores que las que se registran en ciudades de Asia que van de 35 a 220 µg/m³ (Amador-Muñoz *et al.*, 2011; 2013).

En el mismo estudio se reportan los niveles de HAPs asociados a PM₁₀ en la Ciudad de México durante los años 1999 a 2002, sus resultados demuestran que los HAPs pesados fueron mucho más abundantes (5274 pg/m³ promedio) con respecto a los ligeros (831.25 pg/m³ promedio). Esto se debe a que en la Ciudad de México la mayor parte de los HAPs se producen por combustión de gasolina y diesel. La cantidad de HAPs en la atmosfera aumenta en la temporada de seca (Noviembre a Abril). También encontraron un aumento lineal significativo durante los 4 años en las concentraciones de Fenantreno, Fluoranteno, Benzo(a)pireno y Benzo(ghi)perileno. Otro dato importante de este trabajo es que el BghiP fue el HAP más abundante en la atmosfera durante los 4 años con un promedio de 1457.25 pg/m³. En el estudio de Guzmán-Torres *et al.* (2009) en el que se examinaron dos sitios de la Ciudad de México (centro y suroeste) durante 2003, también se encontró al BghiP como el HAP más abundante, este mismo resultado obtuvieron Múgica *et al.* (2010) en su estudio realizado de febrero del 2005 a enero del 2006 (Guzmán-Torres *et al.*, 2009; Múgica *et al.*, 2010; Amador-Muñoz *et al.*, 2013).

El trabajo de Amador-Muñoz *et al.* (2011) demuestra que en la Ciudad de México, los contaminantes atmosféricos se distribuyen de acuerdo a las características y actividades de cada zona de la ciudad. Este estudio se realizó con muestras de PM_{2.5} recolectadas durante el año 2006 en 5 zonas de la Ciudad de México: Tlalnepantla al Noroeste (NO), San Agustín al Noreste (NE), Merced en el centro (C), Coyoacán en el Suroeste (SO) y UAM-Iztapalapa en el Sureste (SE).

Los resultados confirman que las concentraciones de los contaminantes en la Ciudad varían dependiendo de la temporada del año y las condiciones meteorológicas presentes. Sin embargo la tendencia es que las concentraciones de PM_{2.5}, HAP-pesados y Nitro-HAP son más elevadas en la temporada de sequía (Noviembre a Abril) que en la de lluvia (Mayo a Octubre) (Amador-Muñoz *et al.*, 2011).

La zona centro fue la que mayores concentraciones de contaminantes presentó. Las concentraciones totales de PAH pesados asociados a las PM_{2.5} en la Ciudad de México son de 6.089 ng/m³ en la zona centro y 3.402 ng/m³ en la zona suroeste y nuevamente el PAH más abundante en la atmosfera fue benzo(*ghi*)perileno (B*ghi*P), con medias anuales de 1.19 ng/m³ en la zona suroeste y 1.84 ng/m³ en la zona centro. La presencia de elevadas concentraciones de B*ghi*P en la atmosfera confirma que las emisiones por tráfico vehicular son la mayor fuente de HAPs en la ciudad (Amador-Muñoz *et al.*, 2011; Arenas-Huertero *et al.*, 2011).

Tabla 2. Concentración de PM_{2.5}, Benzo-a-pireno (BaP) y Benzo(*ghi*)perileno (B*ghi*P) en filtros de la atmósfera de la ciudad de México en diferentes zonas. Estos datos corresponden al año 2006. Tomado de Amador-Muñoz *et al.* (2011).

	NE		CENTRO		SW	
	SEQUÍA	LLUVIA	SEQUÍA	LLUVIA	SEQUÍA	LLUVIA
PM _{2.5} (µg/m ³)	25.56 ± 5.0	11.25 ± 5.50	27.0 ± 7.20	14.80 ± 7.0	22.61 ± 5.50	12.2 ± 5.27
BaP (ng/m ³)	0.41 ± 0.18	0.28 ± 0.12	0.35 ± 0.44	0.32 ± 0.12	0.27 ± 0.14	0.19 ± 0.09
B <i>ghi</i> P (ng/m ³)	1.21 ± 0.41	0.82 ± 0.27	1.70 ± 0.42	1.25 ± 0.36	1.04 ± 0.40	0.78 ± 0.27

El benzo[*ghi*]perileno (B*ghi*P) es un hidrocarburo peri-condensado, alternante de 6 anillos (Fig. 5), tiene un peso molecular de 276 y en su estructura no presenta regiones “bahía”, por lo que correlaciona con la carencia de efectos carcinogénicos. Presenta 2 regiones “K” (entre los carbonos 3, 4 y 11, 12) que lo hacen propenso a formar epóxidos, por permitir la formación de dobles enlaces, además de hacerlo un blanco para la generación de metabolitos reactivos. Este HAP es indicador de contaminación por vehículos que usan gasolina y puede estar unido a PM_{2.5} (IARC, 1983).

La IARC es el organismo rector que evalúa los riesgos y las propiedades carcinogénicas de muchos compuestos xenobióticos, entre ellos a los HAPs. La última evaluación y reporte de la IARC para el BghiP fue en 2010. En ésta se reportó que en experimentos en los cuales se probó su carácter carcinogénico por aplicación a la piel de ratones hembras, los resultados fueron negativos. No mostró efectos iniciador y/o promotor en el modelo de inducción de tumores de piel en ratones. En otros dos estudios en ratones, tampoco se observó la inducción de tumores mediante la inyección subcutánea. La aplicación intrapulmonar en ratas no generó material concluyente para una adecuada observación, sin embargo se produjeron algunos tumores pulmonares (IARC, 1983; 2010).

Cuando se administra de forma simultánea con el BaP de manera superficial en la piel del ratón, se desarrollan tumores en la piel más pronto, que cuando se aplica solo el BaP. No existen datos que comprueben su efecto teratogénico y no se tiene evidencia contundente de ser activo en bioensayos típicos de genotoxicidad (IARC, 1983; 2010).

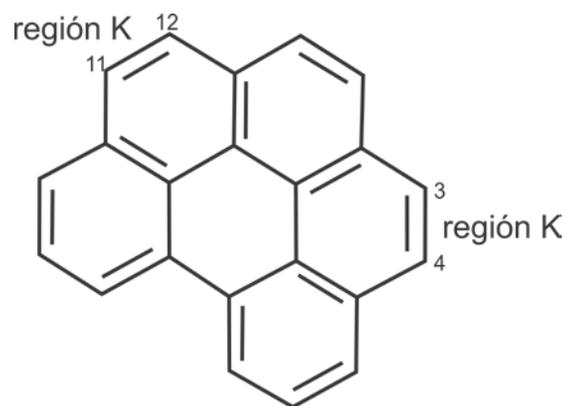


Figura 5. Estructura molecular del benzo[*ghi*]perileno. Es un HAP de 6 anillos, 5 bencénicos, con un peso molecular de 276 que le permite ser estable y permanecer adsorbido a las partículas PM_{2.5} de la atmósfera de la ciudad de México.

Los datos con seres humanos solo sugieren que la exposición por vía inhalada mediante el humo del tabaco, aire contaminado y por ingestión en agua contaminada pueden ser las vías de entrada, pero no existe, hasta el momento, ningún tipo de datos de sus efectos tanto en células humanas *in vitro* como *in vivo* por lo que la IARC lo tiene clasificado dentro del grupo 3 (no clasificable como carcinógeno para seres humanos) y con pruebas inadecuadas para clasificarlo como carcinógeno en animales experimentales (IARC, 1983; 2010).

Sin embargo existen estudios que demuestran que el B(*ghi*)P puede acumularse en los pulmones. Seto *et al.* (1993) analizaron por HPLC, 364 muestras de pulmón tomadas de autopsias de 3 hospitales gubernamentales metropolitanos de Tokio durante los años de 1986 a 1989. Encontrando la presencia de BaP (0.54 ng/g peso seco), BkF (0.44 ng/g peso seco) y B*ghi*P (0.87 ng/g peso seco) siendo éste último el que se halló en mayor cantidad en todas las muestras, que incluían hombres y mujeres fumadores y no fumadores. Demostrando así que los HAPs asociados a partículas finas se pueden acumular en el pulmón. Por otra parte, corroboraron que existía una relación entre la cantidad de HAPs detectados y la edad de los pacientes, lo que refleja que existe una continua exposición al inhalar estos compuestos ubicuos en el aire (Seto *et al.*, 1993).

En 1998 Tokiwa *et al.* analizaron 356 muestras de pulmón con y sin carcinoma (293 y 63, respectivamente) en dos periodos, de 1961 a 1962 cuando había gran contaminación sin legislación y 1991 a 1996 periodo en el que la contaminación se regulaba en Japón, para determinar la acumulación de HAPs en los tejidos. El Pireno, Fluoranteno y B(*ghi*)P fueron los que se reportaron con mayores concentraciones en ambas condiciones, durante los dos periodos del estudio, siendo mayores durante 1961 a 1962 (Tokiwa *et al.*, 1998).

En el estudio de Tasdemir y Ensen (2007) donde exploran las concentraciones, abundancia y temporalidad de HAPs en fase gaseosa y particulada de un sitio con excesivo tráfico en Turquía, durante agosto del 2004 a mayo del 2005, reportaron la presencia de B *ghi*P únicamente en la fase particulada de la atmósfera (Tasdemir y Ensen, 2007).

En un estudio clásico de mutagenicidad con *S. typhimurium*, al no tener una activación metabólica externa, no se producen colonias revertantes en las cepas TA100 y TA98. Sin embargo al agregar una fracción enzimática externa (S9 de hígado de rata) la mutagenicidad del B(*ghi*)P aumenta 4.3 revertantes por nmol en la cepa TA100, y solo 1.3 revertantes por nmol en la TA98. Al agregar un inhibidor de epóxido hidrolasa la mutagenicidad se eleva a 5.0 revertantes por nmol en TA98 (Platt y Grupe, 2005).

Un aspecto importante de resaltar en el estudio de Cho *et al.* (2005) es que el BghiP se asocia a actividad de ditioneitol, DTT, que es una forma cuantitativa *in vitro* de la formación de especies reactivas de oxígeno, por lo que deberá considerarse su evaluación en sistemas biológicos y corroborar entre otros efectos, justo la formación de estas moléculas (Cho *et al.*, 2005; Lezama, 2006; Amador-Muñoz *et al.*, 2011).

4. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del aire en zonas urbanas se debe en gran parte a las actividades antropogénicas: las fuentes más importantes de contaminantes incluyen emisiones de gas y materia particulada producida por quema de combustibles fósiles en vehículos y procesos industriales. En la ciudad de México hay alrededor de 20 millones de habitantes, 4 millones de vehículos y poco más de 35000 industrias. Por su posición geográfica y la cantidad de actividades que se realizan en ella, tiene altos niveles de contaminación por compuestos orgánicos, materia particulada e hidrocarburos aromáticos policíclicos. El más abundante de éstos últimos es el BghiP, que es un indicador de contaminación por combustión de gasolina. Actualmente no existen reportes sobre los efectos que éste compuesto puede causar en un sistema *in vitro* de células bronquiales humanas. Lo que este estudio pretende realizar es una evaluación de los efectos del BghiP, exponiendo a las células de la línea NL-20 (bronquiales humanas) a las concentraciones reportadas en la atmosfera de la ciudad de México y así conocer los efectos biológicos de éste compuesto.

5. HIPÓTESIS

El BghiP es capaz de producir *in vitro* alteraciones en la viabilidad celular, cambios morfológicos y alteraciones en la expresión de genes en las células bronquiales humanas de la línea NL-20.

6. METODOLOGÍAS

6.1 Cultivo de la línea celular bronquial humana NL-20

La línea celular NL-20 proviene de células bronquiales humanas, inmortalizadas a partir de células no tumorales, son epiteliales y adherentes y fue obtenida de la ATCC (CRL-2503). Se eligió esta línea celular, para poder simular *in vitro*, el efecto que tiene el B*ghiP* en una célula pulmonar libre de enfermedades. Se siembran en medio de cultivo HAM-F12 complementado con 4 % de suero fetal bovino, 2.0 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 5 µg/mL de insulina, 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 1 µg/mL de transferrina, 500 ng/mL de hidrocortisona, 100 µg/mL de sulfato de estreptomina y 100 µg/mL de penicilina-G. Bajo las siguientes condiciones 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad hasta que llegan a confluencia. Se despegan incubando con una solución de tripsina 0.05 % y verseno 0.01 %, durante 10 minutos a 37 °C, una vez que se desprenden se centrifugan a 120 00 rpm por 5 minutos. Posteriormente estas células se utilizaron para los micro-ensayos de exposición y para la expansión de la línea celular.

6.2 Esquemas de exposición a B*ghiP*

A partir de los resultados del estudio de Miguel-Pérez *et al.* (2012), se calculó el porcentaje de B*ghiP* en la fracción orgánica extraída de PM_{2.5} (FOS) de dos estaciones de monitoreo ubicadas en el centro y noreste de la ciudad de México, respectivamente. Con el fin de escalar al estudio las concentraciones reales en la atmosfera de la ciudad. Obteniendo como resultado 3 concentraciones que se utilizaron para todas las metodologías: 0.272, 0.561 y 1.24 µg/mL de B*ghiP* (Tabla 3). Éste se disolvió en 2 vehículos, medio acuoso (DMSO) y medio lipídico (ácidos omega). Las células se expusieron durante 48 horas bajo el siguiente esquema experimental: Testigo (sin exposición), control de vehículos: medio + DMSO y medio + ácidos omega, concentraciones de exposición a B*ghiP* en ambos vehículos, con ausencia y presencia del antagonista del receptor de AhR, CH223191 10 µM. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, en tres series distintas (n= 9).

Tabla 3. Porcentajes de viabilidad inducidos por 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de FOS en células NL-20 y porcentaje de *BghiP* contenido en la misma, de las estaciones NE y centro de la ciudad de México, durante dos temporadas (Tomados de Miguel-Pérez *et al.*, 2012). A partir de los cuales se calcularon las concentraciones de exposición para el estudio.

	ESTACIÓN NE		ESTACIÓN CENTRO	
	SEQUÍA	LLUVIA	SEQUÍA	LLUVIA
% de viabilidad al exponer a 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de FOS	91.2%	85.0%	52.4%	54.2%
% de <i>BghiP</i> (en 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FOS)	1.6%	1.7%	7.3%	3.3%
$\mu\text{g}/\text{mL}$ de <i>BghiP</i> contenido en FOS	0.272 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.289 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.561 $\mu\text{g}/\text{mL}$

6.3 Viabilidad celular por absorción de rojo neutro

Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana de los lisosomas. El colorante rojo neutro se acumula en su forma protonada dentro del ambiente ácido de los lisosomas, lo cual ocurre solo en células sin daño, es decir que son viables. Se siembran 15000 células por pozo en placas de 96 pozos y se dejan 24 horas en incubación, para posteriormente realizar la exposición a *BghiP* como se explicó anteriormente. Tres horas antes de que se complete el tiempo de exposición (21 horas) se retira el medio a las células y se agregan 200 μL de colorante rojo neutro (3 amino-7 dimetil amino-2 metil furazide hidroclorehídrico) preparado en PBS pH 7.4 (30 mg/L), diluido 1:1 con medio de cultivo. Después de 3 horas se retira el medio y se extrae el colorante con una solución de ácido acético al 1 % y etanol 50 % (1:1), se deja reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y se cuantifica en un lector de placas a una longitud de onda de 540 nm. Al igual que en la técnica anterior se considera como el 100 % de viabilidad a la absorbancia proveniente de las células control con sus respectivos vehículos. A partir de ésta se calculan los porcentajes de viabilidad en cada caso expuesto.

6.4 Viabilidad celular por liberación de LDH al medio

Esta técnica se basa en el hecho de que las enzimas intracelulares, como la lactato deshidrogenasa (LDH), solo se liberan al medio cuando hay daño a las membranas celulares, por lo tanto se puede utilizar como indicador relativo de viabilidad en función de la integridad de la membrana. Se siembran 15000 células por pozo en placas de 96 pozos y se dejan 24 horas en incubación, para posteriormente realizar la exposición a *BghIP*. Terminado el tiempo de exposición, se centrifuga la placa a 2500 rpm por 4 minutos y se transfieren 50 μ L de medio de cada pozo a una placa nueva, en la cual se llevará a cabo el análisis enzimático, utilizando el kit TOX7 de Sigma. Se mezcla en volúmenes iguales (1:1) la solución de sustrato, solución de tinción y preparación de cofactor 1x. En oscuridad se agregan 30 μ L de la mezcla anterior por pozo y se incuba durante 20 minutos. La reacción se detiene agregando a cada pozo HCl 1N (1:10). Se cuantifica en un lector de placas a una longitud de onda de 490 nm, como absorbancia principal y a una longitud de onda de 690 nm para medir absorbancia de fondo, ésta última se restará de la principal. El porcentaje de LDH liberado se calcula con base en la absorbancia obtenida del testigo sin exposición.

6.5 Tinción con cristal violeta

Las células se tiñeron para evaluar cambios morfológicos a través de microfotografías obtenidas en un microscopio óptico invertido. Se siembran 15000 células por pozo en placas de 96 pozos y se dejan 24 horas en incubación, para posteriormente realizar la exposición a *BghIP* como se explicó anteriormente. Terminado el tiempo de exposición, las células se lavan con 100 μ L por pozo de solución salina al 0.9 %. Se retira la solución y se fijan las células agregando 100 μ L por pozo de formol al 10 %, se lava con agua y se deja secar a temperatura ambiente. Se agregan 100 μ L de solución de cristal violeta 0.1 % (CV) a cada pozo y se deja actuar durante 10 minutos, para después lavar de nuevo la placa con agua hasta retirar todos los residuos de CV y se deja secar.

6.6 Inmunocitoquímica del receptor AhR

En placas de 6 pozos se coloca un cubreobjetos esterilizado en cada pozo y se siembran 30000 células en cada uno y se exponen bajo el mismo esquema. Posteriormente, se elimina el medio de cultivo de cada pozo y se realizan dos lavados con 1 mL de solución salina fisiológica 0.9 %. Se fijan con 1 mL de paraformaldehído al 4 % en PBS por media hora y se lavan con 3 cambios de solución salina fisiológica 0.9 %. Se coloca dentro de una cámara húmeda, se lavan las células 3 veces por 5 minutos con la solución de bloqueo (PBS 1x y 0.1 % de BSA) y posteriormente se agrega la solución blanqueadora (PBS 0.3 % de Tritón x-100 y 10 % de suero de cabra) se incuba durante 45 minutos. Se agrega el anticuerpo primario anti-AhR diluido 1:50 en suero normal de cabra y se deja toda la noche a 4 °C. Al término se lava 3 veces durante 5 minutos cada uno, utilizando solución salina fisiológica 0.9 %. Finalmente se incuba durante 30 minutos, con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (HRP) diluido 1:100 en 10 % de suero normal de cabra. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario, se revela utilizando las soluciones y la técnica del kit de Cell Marque. Se lava 3 veces con el amortiguador de lavado. A continuación se agrega el complejo HRP (ultramarque label) y se incuba 10 minutos. Finalmente, se lava 3 veces con el amortiguador de lavado y se agrega el cromógeno (DAB) hasta la aparición de color café de la peroxidasa, se lava con agua destilada y se contrastan los núcleos con hematoxilina. Se monta utilizando glicerol al 50 %.

6.7 Expresión de los genes de la vía AhR y genes efectores

6.7.1 Extracción de RNA total

Se siembran 15000 células por pozo en placas de 96 pozos y se dejan 24 horas en incubación, posteriormente, se exponen como anteriormente se explicó. Transcurridas 48 horas, las células se lisan agregando 100 µL de Trizol por pozo. Se incuba el homogeneizado por 5 minutos a temperatura ambiente, se añaden 60 µL de cloroformo y se deja reposar por 3 minutos. Se centrifuga a 12000 rpm por 10 minutos, se obtienen 3 fases, de las cuales se recupera la fase acuosa.

Ésta se transfiere a un tubo con 150 µL de isopropanol frío y 1 µL de glucógeno, se incuba 30 minutos y se centrifuga de nuevo a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se remueve el sobrenadante y se lava con 100 µL de etanol 70 %, se agita en vortex y se centrifuga a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Finalmente se decanta y se deja secar en baño seco, se resuspende en 10 µL de agua libre de nucleasas y se cuantifica la concentración de RNA en un espectrofotómetro de microvolumenes Genova Nano[®], utilizando los cocientes 260/280 y 260/230 nm de las absorbancias para obtener la pureza del RNA.

6.7.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realiza a partir de 200 ng de RNA total. Utilizando el kit First strand cDNA synthesis de Thermo Scientific[®]. En un termociclador de punto final con las siguientes condiciones: 37 °C por 60 minutos, 70 °C por 10 minutos y 22 °C por un minuto.

6.7.3 Expresión de genes por RT-qPCR

La cuantificación en tiempo real se realiza utilizando SYBR green como fluorocromo principal y ROX[™] como colorante pasivo de referencia, incluidos en el kit Maxima SYBER green qPCR Master mix, de Thermo Scientific[®]. Ya que ésta técnica puede amplificar productos no específicos; se debe corroborar que la curva de disociación tenga un único producto. Se utilizan los primers específicos para cada gen (Tabla 1) y las reacciones se llevan a cabo en un termociclador Stratagene Mx3005P Agilent[®], utilizando el siguiente perfil de temperaturas: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y TM de cada primer por 1 minuto, para finalizar con un ciclo de 95 °C por 1 minuto, 58 °C por 30 segundos y 95 °C por 30 segundos. Los niveles de expresión relativa se analizan con el algoritmo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como gen endógeno la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

$$\text{Cambio en nivel de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct \text{ tratamiento} - \Delta Ct \text{ calibrador} = \Delta\Delta Ct$$

$$Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct \text{ tratamiento}$$

$$Ct \text{ gen de interés (testigo)} - Ct \text{ gen endógeno (testigo)} = \Delta Ct \text{ calibrador}$$

TABLA 4. Secuencias de los primers forward (F) y reverse (R) de los genes explorados, se muestra el tamaño en pares de bases (Pb) de cada producto amplificado y la TM óptima para el RTq-PCR.

	Secuencias Primers		tamaño del amplificado	TM	Concentración del primer
GAPDH	F	CGGAGTCAACGGATTTGGTC	96	58	0.3 mM
	R	ATGAAGGGGTCATTGATGGCA			
AhR	F	GCCGGTGCAGAAAACAGTAA	80	58	0.6 mM
	R	TAAGTCGGTCTCTATGCCGC			
CYP4B1	F	CCACTCTGGTTCGGACAGTT	72	58	0.6 mM
	R	GCTGTACACAGCTTTGGCAT			

6.8 Tinción con naranja de acridina

La naranja de acridina (AO) es un colorante sensible al pH que puede ser usada para la detección de compartimentos ácidos, donde se protona y acumula. A pH ácido AO emite fluorescencia roja con una intensidad proporcional al grado de acidez, además tiñe el DNA y citoplasma en color verde. La formación de vacuolas ácidas en células teñidas con AO pueden ser observadas mediante microscopio de fluorescencia. En placas de 6 pozos se coloca un cubreobjetos esterilizado en cada pozo y se siembran 30000 células en cada uno y se exponen bajo el mismo esquema. Posteriormente, se elimina el medio de cultivo de cada pozo y se agrega 1 mL de solución salina fisiológica 0.9 % para realizar dos lavados. Se fijan con 1 mL de paraformaldehído al 4 % en PBS por media hora y se lavan con 3 cambios de solución salina fisiológica 0.9 %. Posteriormente en cuarto oscuro se añade 1 mL de amortiguador 1 (20 mM citrato-fosfato, pH 3.0, 0.1 mM EDTA, 0.2 M sacarosa, 0.1 % Triton X-100) por 5 minutos. Se retira el amortiguador 1 y se agrega 0.02 mg/mL de naranja de acridina disuelta en el amortiguador 2 (10 mM citrato-fosfato, pH 3.8, 0.1 M NaCl) por 10 minutos. Finalmente se lavan con PBS y se montan utilizando glicerol al 50 % y se analizan en un microscopio de fluorescencia (LEIKA DM RX). Los lisosomas se visualizan en color rojo con un filtro de excitación de 550 nm (540-560 nm).

6.9 Detección de radicales libres a través de la reducción del bromuro 3-(4, 5-dimitiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT).

Esta técnica determina la acumulación total de radicales libres, los cristales de formazan se producen cuando el MTT se reduce a causa de interacciones con los radicales libres. Se siembran 15000 células por pozo en placas de 96 pozos y se dejan 24 horas en incubación, para posteriormente realizar la exposición a BghiP como se explicó anteriormente. Tres horas antes de terminar el tiempo de exposición (45 horas) se agrega a cada pozo 20 μ L de MTT (5 mg/mL en PBS) y se deja terminar el tiempo de exposición en la incubadora. Finalizado el tiempo se remueve el medio con cuidado de no absorber los cristales formados, se agregan 150 μ L de solución disolvente. Se agita para disolver los cristales de formazan y se cuantifica en un lector de placas a una longitud de onda de 540 nm, como absorbancia principal y a una longitud de onda de 620 nm para medir absorbancia de fondo, ésta última se restará de la principal. El porcentaje de MTT reducido se calcula con base en la absorbancia obtenida del testigo sin exposición (Liu y Nair, 2010; Valcheva-Traykova *et al.*, 2014).

6.10 Análisis estadístico

Se comparan los porcentajes de viabilidad obtenidos por los métodos de rojo neutro y LDH; la expresión relativa de los genes se comparara entre los controles sin exposición (testigos) y las células expuestas a las diferentes concentraciones de BghiP utilizando ANOVA de una vía con Tukey como prueba *post hoc*. Todas las pruebas se realizan empleando el programa estadístico GraphPad Prism 5. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de p fue ≤ 0.05 .

7. RESULTADOS

7.1 Retención de rojo neutro en las células NL-20 expuestas a BghiP.

Los resultados analizados con rojo neutro mostraron que existe un aumento significativo en el porcentaje de absorbancia en las células expuestas a las concentraciones de 0.561 y 1.24 $\mu\text{g/mL}$ de BghiP ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo, utilizando al DMSO como vehículo. Sin embargo, la absorbancia comenzó a disminuir a expensas del aumento de la concentración del hidrocarburo cuando se agregó el BghiP en medio con vehículo lipofílico (ácidos omega), siendo únicamente las células expuestas a la concentración más alta (1.24 $\mu\text{g/mL}$) las que presentan diferencias significativas con respecto al testigo.

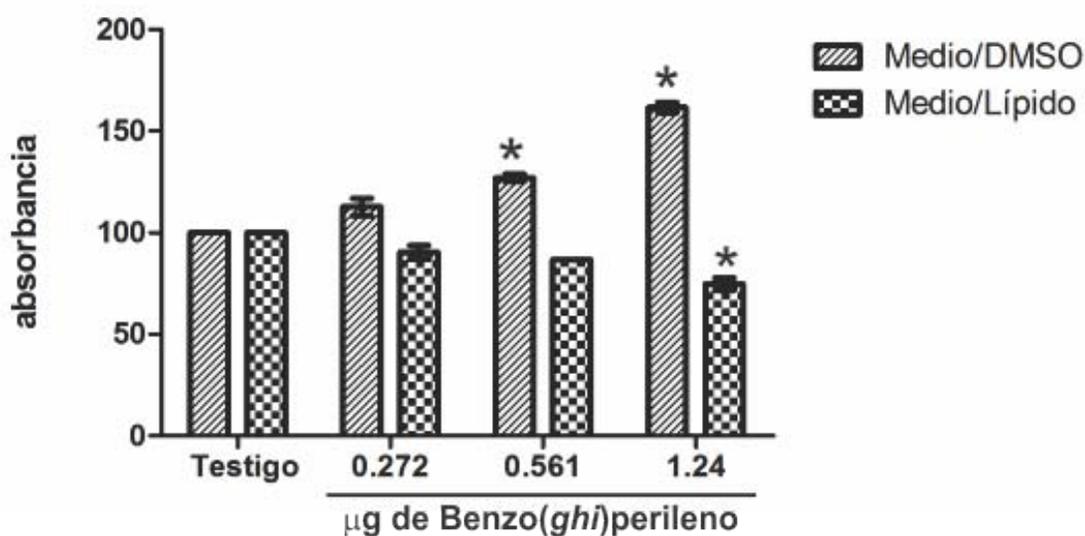


FIGURA 6. Efecto del BghiP en la viabilidad de las células NL-20 medida con el método de rojo neutro. La exposición se realizó con 2 vehículos: en medio con DMSO y medio con lípido (ácidos omega). Cada barra representa la media \pm e.e. del porcentaje de absorbancia de 3 repeticiones de 3 series de experimentos distintos ($n=9$). Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

7.2 Cambios morfológicos inducidos por BghiP en las células NL-20.

En las figuras 7 y 8 se muestran las morfologías de las células testigo y los controles con DMSO y ácidos omega, respectivamente, en las cuales no se observan cambios provocados por los vehículos de exposición con respecto a la morfología presentada en las células que no fueron expuestas (Testigo). Lo que demuestra que los vehículos por sí mismos no afectan la morfología celular, por lo cual cualquier cambio registrado en células expuestas puede ser explicado como efecto del BghiP.

En el caso de las células expuestas con DMSO como vehículo (Fig. 7), desde la concentración más baja (0.272 µg/mL, Fig. 7a) se puede ver la formación de pequeñas vesículas en todo el citoplasma de las células, éste efecto también está presente en las otras dos concentraciones y parece aumentar directamente con la concentración de exposición. Incluso en la concentración más alta (1.24 µg/mL, Fig. 7c) se observan grandes vesículas en el citoplasma.

Por otra parte, en las células con ácidos omega como vehículo (Fig. 8), se observan pequeñas vesículas en el citoplasma en las tres concentraciones de exposición y parece que el volumen del citoplasma se encuentra disminuido, ya que las células se ven ligeramente más pequeñas. Ambos efectos incrementan directamente conforme se aumenta la concentración de exposición a BghiP.

Un dato importante es que en ambos vehículos y en todas las concentraciones, los núcleos de las células se encuentran intactos, por lo cual se puede descartar que cause fragmentación nuclear. Tampoco se observan daños provocados por necrosis o apoptosis en las células.

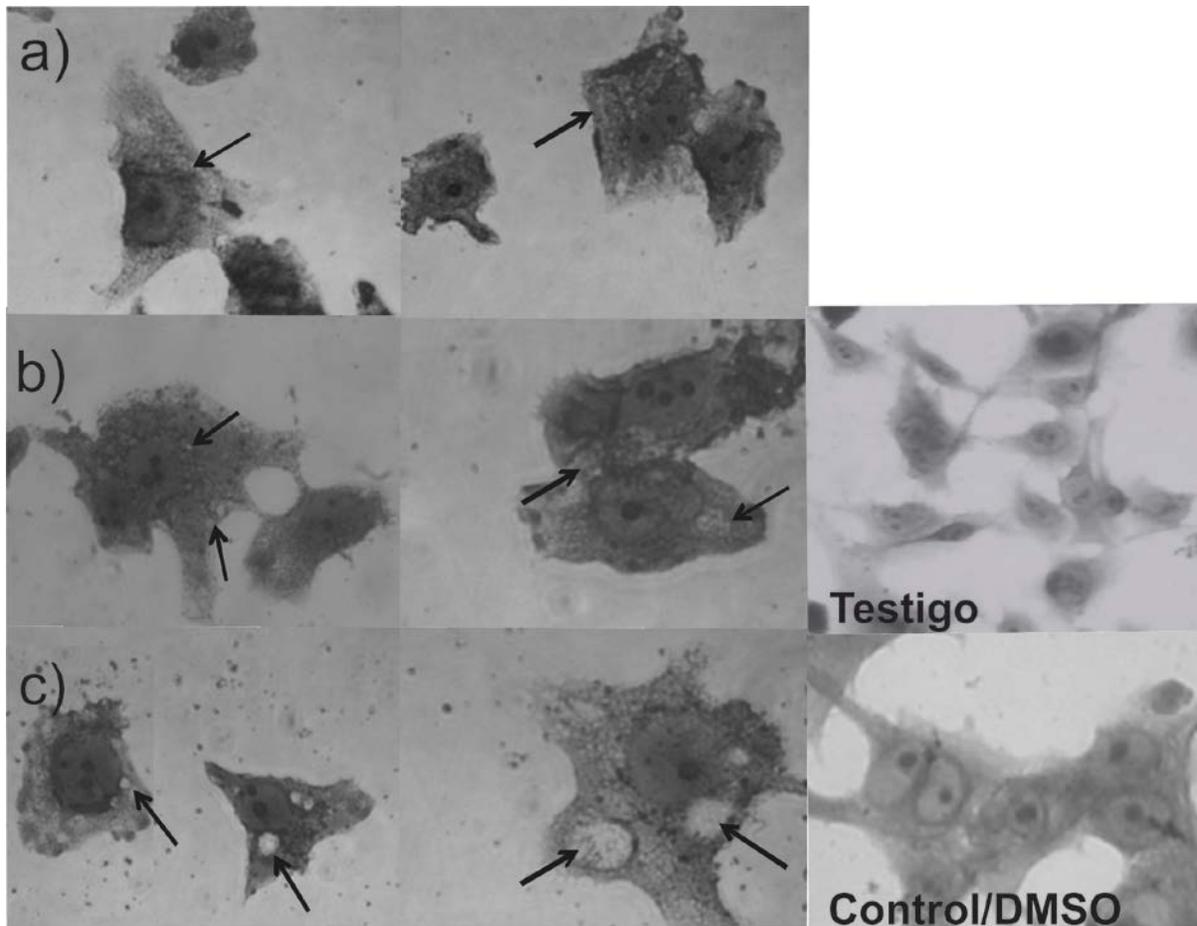


FIGURA 7. Campos representativos de células NL-20 expuestas a BghiP en medio con DMSO como vehículo, teñidas con cristal violeta. Testigo: células sin exposición, Control/DMSO: medio + DMSO, **a)** células expuestas a **0.272 µg/mL** de BghiP, **b)** células expuestas a **0.561 µg/mL** de BghiP, **c)** células expuestas a **1.24 µg/mL** de BghiP. Fotografías tomadas en microscopio invertido 40x. Las flechas señalan la localización de las vesículas.

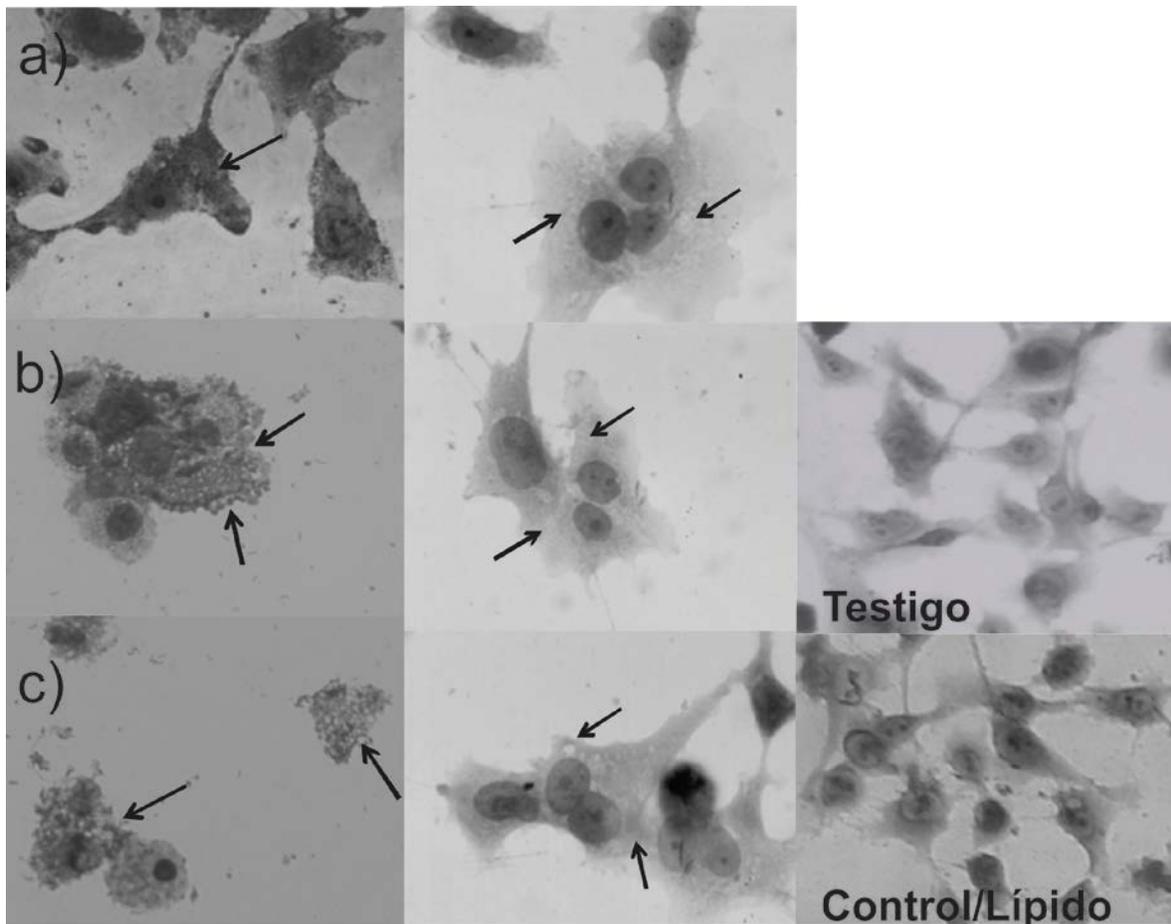


FIGURA 8. Campos representativos de células NL-20 expuestas a *BghiP* en medio con ácidos omega como vehículo, teñidas con cristal violeta. Testigo: células sin exposición, Control/Lípido: medio + ácidos omega, **a)** células expuestas a **0.272 µg/mL** de *BghiP*, **b)** células expuestas a **0.561 µg/mL** de *BghiP*, **c)** células expuestas a **1.24 µg/mL** de *BghiP*. Fotografías tomadas en microscopio invertido 40x. Las flechas señalan la localización de las vesículas.

Se analizaron los efectos en la morfología de las células expuestas a *BghiP* en presencia del antagonista del receptor AhR, CH-223191. Utilizando 2 concentraciones de antagonista (10 μ M y 50 μ M) se observó que en ambos vehículos aun existe la presencia de vesículas en el citoplasma de las células. En el caso del medio con DMSO como vehículo + 10 μ M CH-223191 las vesículas presentes son muy parecidas en forma y abundancia a las que se habían reportado en ausencia del antagonista (Fig. 9a-9c). Sin embargo al incrementar la concentración del antagonista a 50 μ M se aprecia un mayor daño en las membranas, las cuales parecen tener grandes rupturas (Fig. 9d-9f).

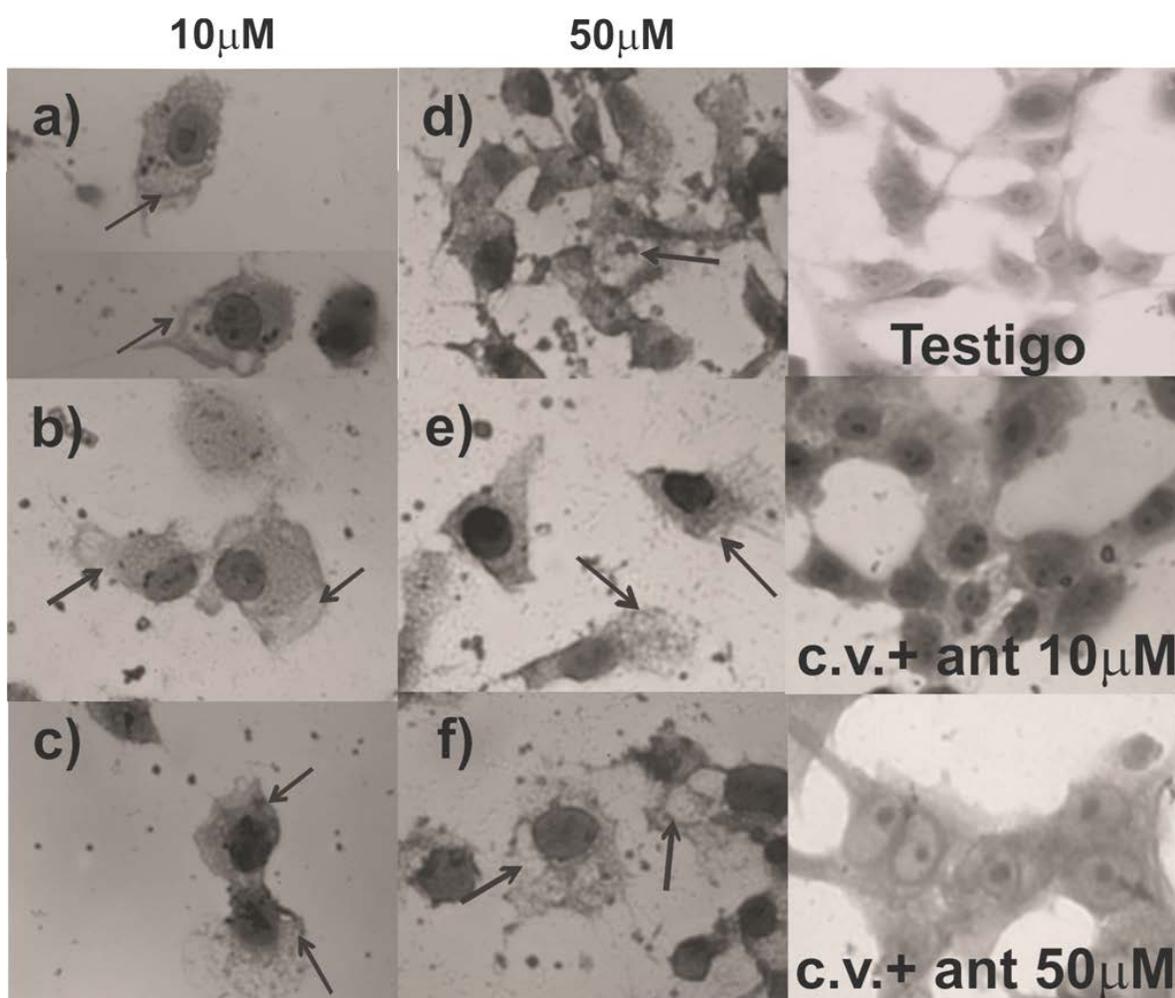


FIGURA 9. Campos representativos de células NL-20 expuestas a *BghiP* en medio con DMSO como vehículo, teñidas con cristal violeta. Testigo: células sin exposición, c.v: medio + DMSO + CH-223191. Células expuestas a **0.272 μ g/mL** de *BghiP* (a y d); Células expuestas a **0.561 μ g/mL** de *BghiP* (b y e); Células expuestas a **1.24 μ g/mL** de *BghiP* (c y f). Fotografías tomadas en microscopio invertido 40x. Las flechas señalan la localización de las vesículas.

En ambas concentraciones de CH-223191 aunque los núcleos no tienen fragmentación presentan hiperchromía la cual aumenta directamente con la concentración del *BghiP* y los nucleólos solo se aprecian en la concentración de 10 μM . En el caso del medio con ácidos omega como vehículo al agregar 10 μM CH-223191 existe aun la presencia de pequeñas vesículas y las células tienden a redondearse y como en el caso anterior aún se observan los nucleólos; sin embargo al aumentar la concentración a 50 μM ya no se observan las vesículas, las células están redondeadas, los nucleólos desaparecen y el núcleo no se tiñe como en los casos anteriores (Fig. 10).

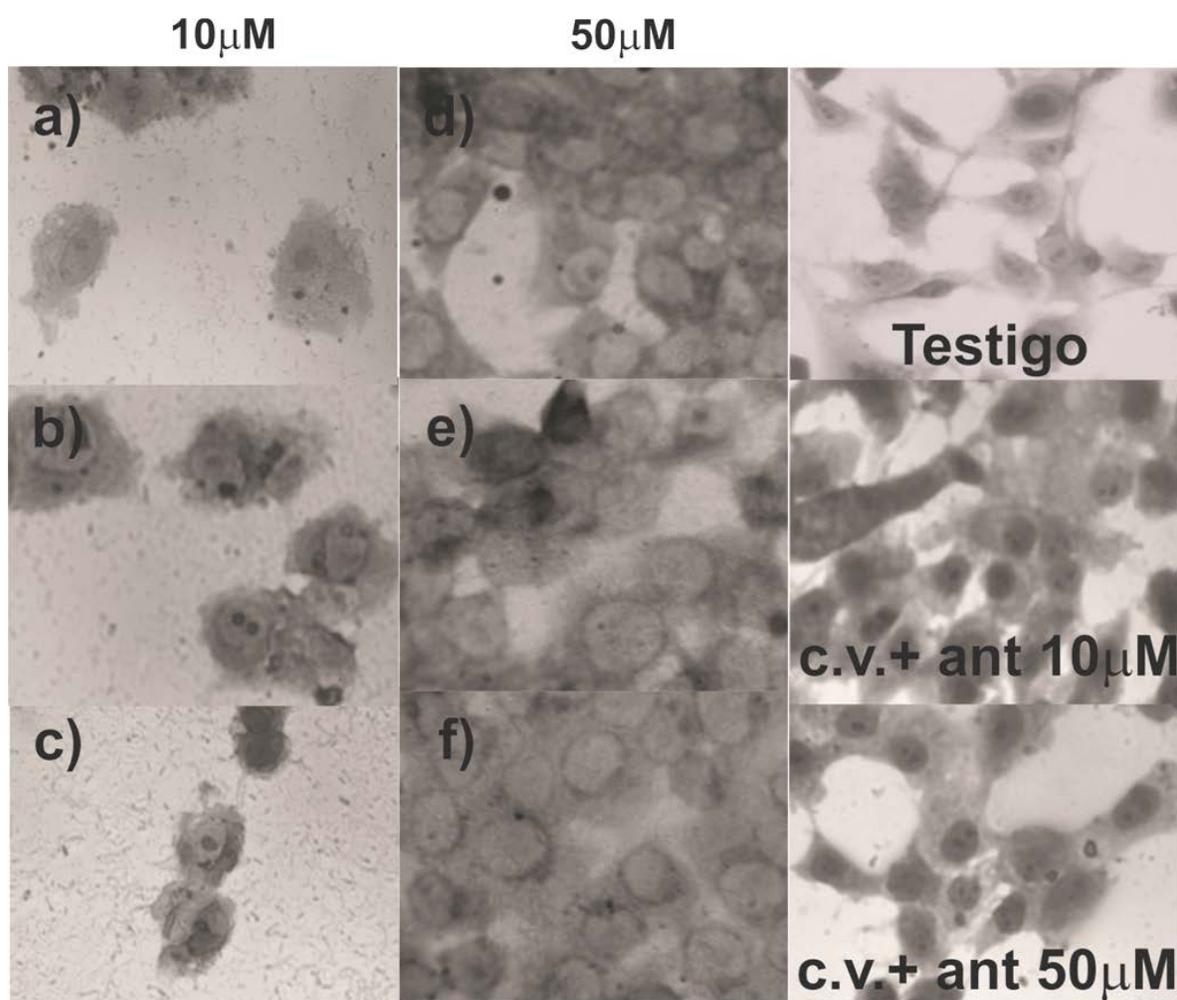


FIGURA 10. Campos representativos de células NL-20 expuestas a *BghiP* en medio con ácidos omega como vehículo, teñidas con cristal violeta. Testigo: células sin exposición, c.v: medio + lípido + CH-223191. Células expuestas a **0.272 $\mu\text{g/mL}$** de *BghiP* (a y d); Células expuestas a **0.561 $\mu\text{g/mL}$** de *BghiP* (b y e); Células expuestas a **1.24 $\mu\text{g/mL}$** de *BghiP* (c y f). Fotografías tomadas en microscopio invertido 40x. Las flechas señalan la localización de las vesículas.

Para evaluar la naturaleza de las vesículas observadas en los cambios morfológicos inducidos por la exposición a *BghiP*, se utilizó la tinción de naranja de acridina en las células tratadas. Las microfotografías analizadas no mostraron la presencia de vacuolas acídicas de color rojo que corresponderían a lisosomas, y que co-localicen las vesículas inducidas por el *BghiP*, en ninguna de las concentraciones de exposición en ambos vehículos. Las vesículas son traslucidas y se encuentran vacías y el colorante solo se localiza alrededor de ellas. Estos hallazgos sugieren que tampoco existe la activación de un proceso de autofagia debida al *BghiP* (Fig. 11).

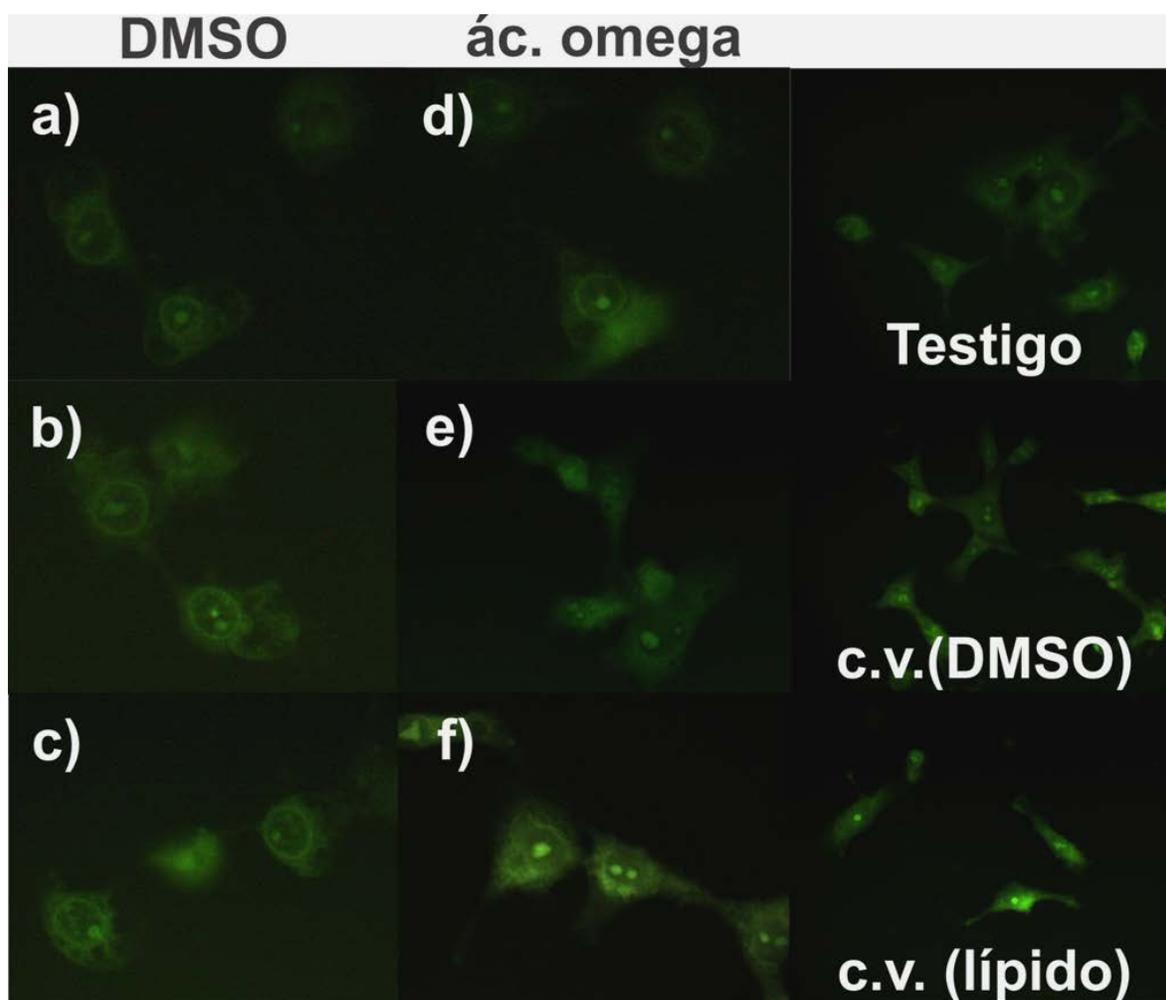


FIGURA 11. Campos representativos de células NL-20 expuestas a *BghiP*. Teñidas con naranja de acridina. La exposición se realizó con 2 vehículos: DMSO y lípido (ácidos omega). Testigo: células sin exposición, c.v: control de vehículo. Células expuestas a **0.272 µg/mL** de *BghiP* (a y d); Células expuestas a **0.561 µg/mL** de *BghiP* (b y e); Células expuestas a **1.24 µg/mL** de *BghiP* (c y f). Fotografías tomadas en microscopio de fluorescencia canal rojo, 40x.

7.3 Daño en las membranas de las células NL-20 inducido por BghiP.

Debido a que el BghiP genera un cambio morfológico en las células al inducir la acumulación de una gran cantidad de vesículas, y dado que el colorante rojo neutro se acumula en los lisosomas, este hecho podría generar un artefacto al retenerse el colorante en estas. Por lo que se utilizó la prueba basada en la liberación de LDH, para confirmar la pérdida de integridad de la membrana celular. Para comprobar esto se realizaron los ensayos de exposición al BghiP en ausencia y en presencia del antagonista del receptor CH-223191 (10 μ M).

La exposición a BghiP y su efecto sobre las membranas se evaluó a las 24, 48 y 72 horas. A las 24 horas de exposición, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en todas las concentraciones de exposición en ambos vehículos al compararlos con el testigo y solo la concentración más alta (1.24 μ g/mL) en ambos vehículos presentó un aumento significativo en la liberación de LDH con respecto al control de vehículo (Fig. 12a y 12b, respectivamente). Al agregar el antagonista se puede observar que el daño disminuye; en el caso de las células con DMSO como vehículo hay una reducción de cerca del 30 % con respecto al mismo tratamiento sin antagonista en las concentraciones de 0.272 y 0.561 μ g/mL y del 66 % en la concentración de exposición más alta (Fig. 12a, barras blancas). Mientras que en el medio con lípido como vehículo el daño se reduce más del 90 % en todas las concentraciones de exposición al compararlas con la misma dosis sin antagonista (Fig. 12c, barras blancas).

A las 48 horas de exposición es cuando más diferencias se observaron en las 3 concentraciones. En el medio con DMSO como vehículo, hay una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la liberación de LDH con respecto al testigo en las 2 concentraciones más altas; al comparar con el control de vehículo solo la concentración más alta (1.24 μ g/mL) presenta diferencia significativa, siendo de nuevo en la que más daño se observó (Fig. 12c). En presencia del antagonista la liberación de LDH disminuyó en 68 y 95 % en las concentraciones de 0.561 y 1.24 μ g/mL respectivamente (Fig. 12c, barras blancas). Mientras que en el medio lipofílico en ausencia del antagonista, el daño en membrana aumenta significativamente conforme se incrementa la concentración de BghiP, encontrando diferencias significativas con respecto al testigo y al control de vehículo en las concentraciones de 0.561 y 1.24 μ g/mL (Fig. 12d) y nuevamente en presencia del antagonista se bloquea totalmente el daño, reduciendo el 100 % en todas las concentraciones de exposición al compararlas con la misma dosis sin antagonista (Fig. 12d, barras blancas). A las 72 horas de exposición ya no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos, esto es quizá porque el mayor daño se da a las 48 hrs y el LDH se degrada en el transcurso de 48 a 72 horas (los resultados no se muestran).

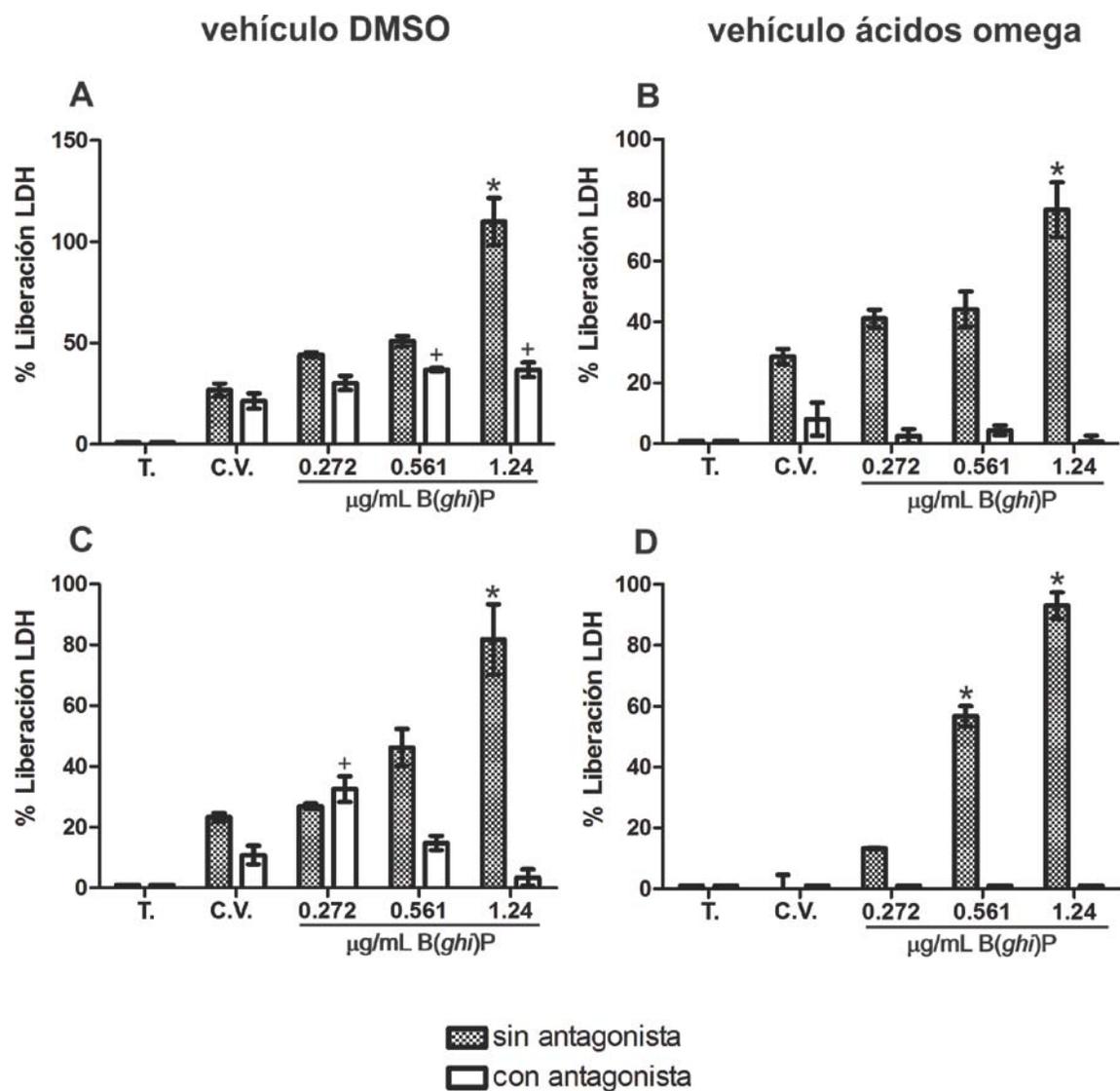


FIGURA 12. Efecto del B(ghi)P en la viabilidad de las células NL-20 medida con liberación de LDH al medio. Cada barra representa la media \pm e.e. de 3 repeticiones de 3 series de experimentos diferentes (n= 9). Los * indican diferencias significativas con respecto al control de vehículo en ausencia del antagonista del receptor AhR. Los + indican diferencias significativas con respecto al control de vehículo en presencia del antagonista del receptor AhR, ANOVA una v ía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$). **A** y **B**: 24 horas de exposición **C** y **D**: 48 horas de exposición T: testigo (células sin exposición); C.V: control de vehículo.

7.4 Traslocación del receptor AhR al núcleo de las células.

Cuando el receptor AhR se une a un ligando como el *BghiP*, se forma un complejo ligando-AhR que se transloca al núcleo de las células, promoviendo de esta forma la transcripción de genes blanco. Para comprobar que esto sucediera en el modelo, se realizó una inmunocitoquímica para revelar la presencia del receptor AhR y su localización en las células expuestas a *BghiP*.

En las figuras 13 y 14 se muestran las imágenes de los testigos sin exposición, en los cuales se observa que el receptor se encuentra preferentemente en el citoplasma (color café) y que los núcleos mantienen la tinción con hematoxilina (color azul), lo que indica que la vía no se encuentra activa en las células testigo y que la sola presencia de los vehículos no causa un efecto de activación de la misma.

En las figuras 13a-13c, se muestran imágenes de células que estuvieron expuestas a *BghiP* en medio con DMSO como vehículo, en donde en las tres concentraciones se puede observar que el receptor se encuentra en el núcleo de las células incluso desde la concentración de exposición más baja (0.272 µg/mL) y aun se puede ver tinción positiva en el citoplasma de las células. Al agregar el antagonista del receptor CH-223191, existe la presencia de algunos núcleos positivos en la concentración más baja de exposición (0.272 µg/mL), mientras que en las otras concentraciones solo aparece la señal en el citoplasma (Fig. 13d-13f) lo que indica bloqueo de la translocación al núcleo por efecto del antagonista en las concentraciones más altas de exposición.

Por otro lado, en las figuras 14a-14c, que muestran las células en las mismas condiciones de exposición, pero con ácidos omega como vehículo en el medio, la translocación del receptor se hace mucho más evidente en los tres casos, incluso en la concentración más alta se puede ver como la totalidad de la señal del receptor se encuentra dentro del núcleo y no en el citoplasma. Al agregar el antagonista del receptor CH-223191, confirmamos que se bloquea completamente la translocación al núcleo en las 3 concentraciones de exposición (Fig. 14d-14f). Lo cual sugiere fuertemente que el *BghiP* es el responsable de la translocación del receptor al núcleo.

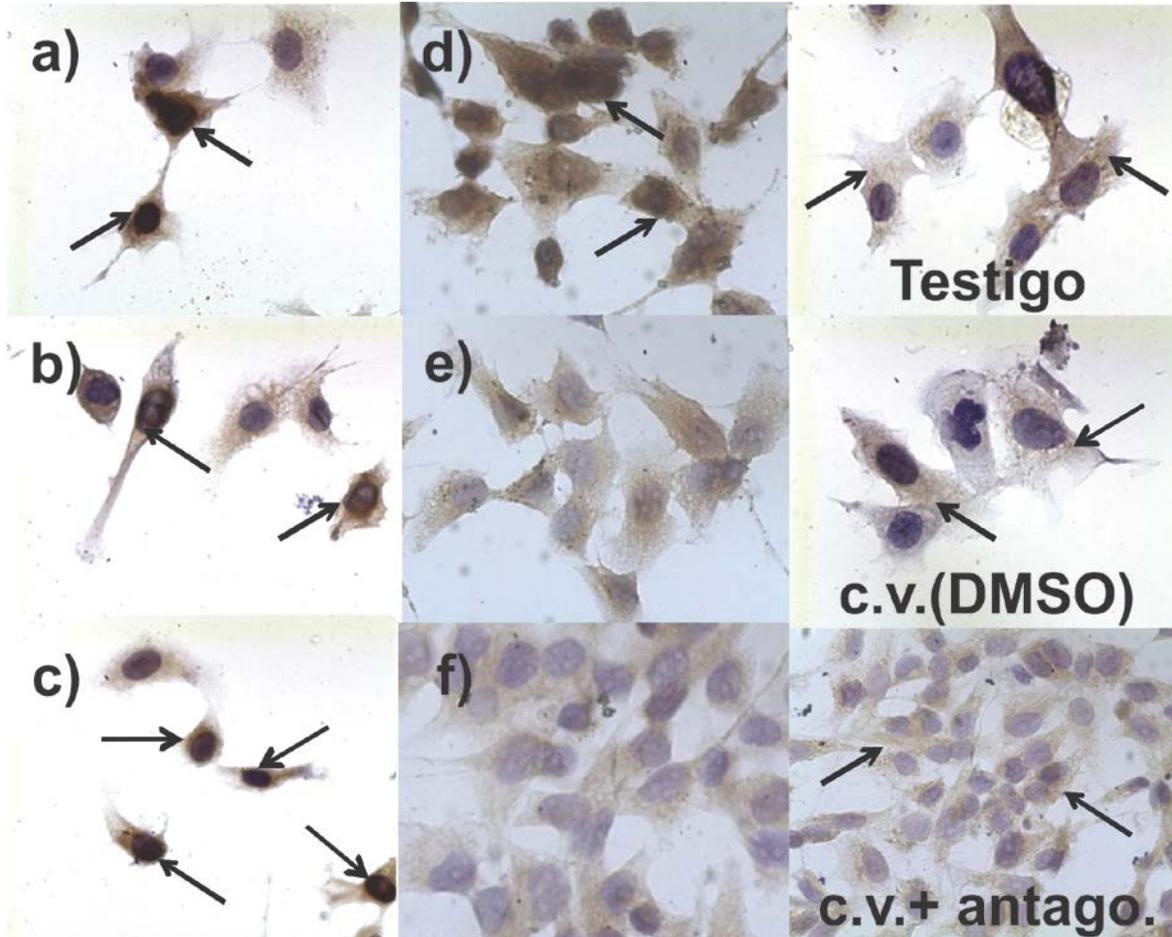


FIGURA 13. Campos representativos de células NL-20 expuestas a BghiP en medio con DMSO como vehículo, inmunohistoquímica AhR (color café), contratinción nuclear hematoxilina (color azul). Testigo: células sin exposición, c.v: medio + DMSO, + antago: CH-223191 (10 μ M). Células expuestas a **0.272 μ g/mL** de BghiP (a y d); Células expuestas a **0.561 μ g/mL** de BghiP (b y e); Células expuestas a **1.24 μ g/mL** de BghiP (c y f). Fotografías tomadas en microscopio óptico 40x. Las flechas indican la localización del receptor.

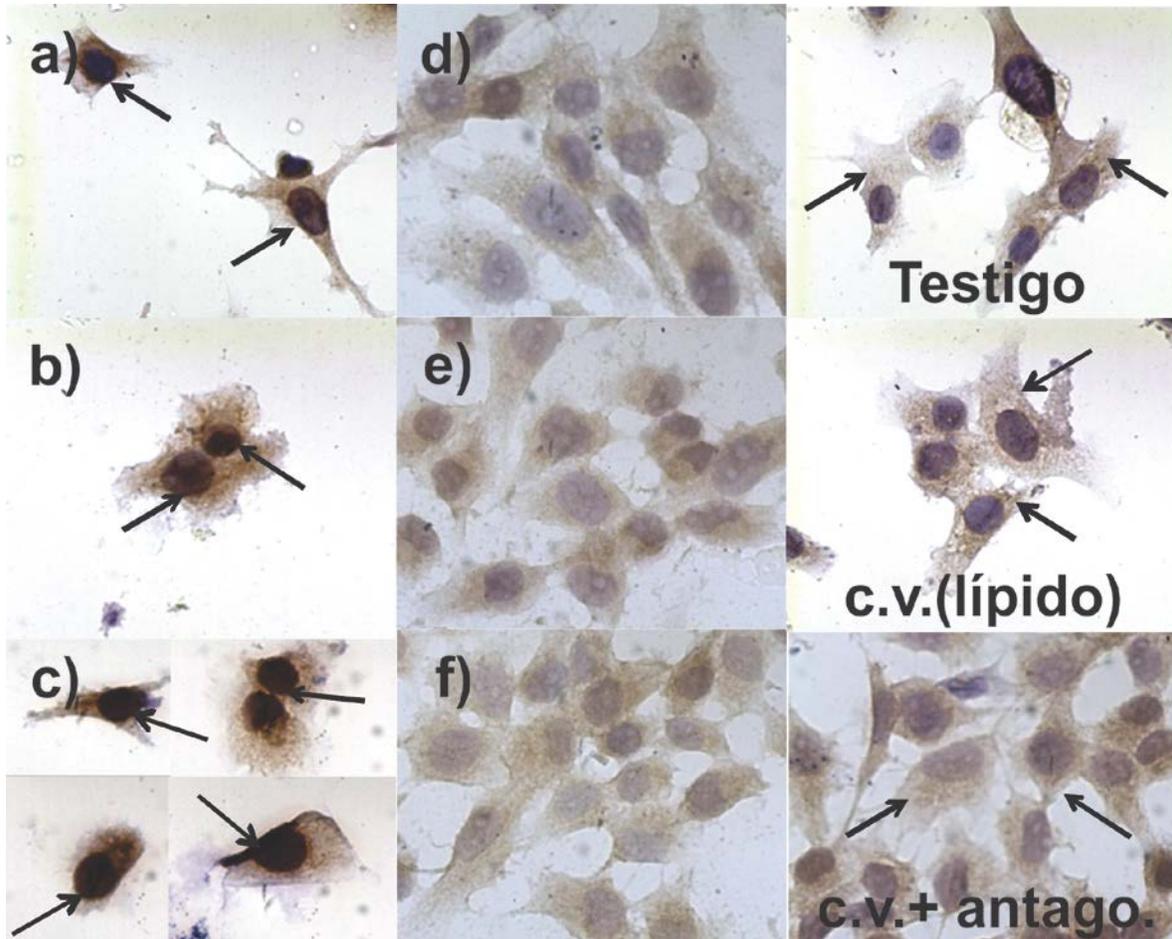


FIGURA 14. Campos representativos de células NL-20 expuestas a *BghiP* en medio con ácidos omega como vehículo, inmunohistoquímica AhR (color café), contratinción nuclear hematoxilina (color azul). Testigo: células sin exposición, c.v: medio + lípido, + antago: CH-223191 (10 μ M). Células expuestas a **0.272 μ g/mL** de *BghiP* (a y d); Células expuestas a **0.561 μ g/mL** de *BghiP* (b y e); Células expuestas a **1.24 μ g/mL** de *BghiP* (c y f). Fotografías tomadas en microscopio óptico 40x. Las flechas indican la localización del receptor.

7.5 Expresión de los genes AhR y CYP4B1.

Utilizando RT-qPCR se realizó la cuantificación de los mRNAs de AhR y CYP4B1 como gen de respuesta específico de pulmón, para comprobar si existen cambios de expresión de estos genes debido al efecto del *BghiP*. Siempre se comprobó la presencia de un gráfico con un solo pico en la curva de disociación, lo que verifica la amplificación de un producto específico (datos no mostrados).

Los resultados de la expresión del mRNA de AhR mostraron que no existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la expresión tanto de las células del control de vehículo (DMSO) como en la concentración de exposición más baja (0.272 $\mu\text{g/mL}$), en comparación con el testigo; sin embargo, en las células expuestas a las otras dos concentraciones (0.561 y 1.24 $\mu\text{g/mL}$) existe una sobre-expresión (2 veces mayor) en relación con los niveles observados en las células testigo y el control de vehículo (Fig.15a). Por otra parte, cuando el medio contiene ácidos omega como vehículo, el mRNA de AhR se encuentra significativamente sobre-expresado (3 veces más) en el control de vehículo (ácidos omega) y en la concentración de exposición más baja (0.272 $\mu\text{g/mL}$), al compararse con el testigo ($p \leq 0.05$). Y como en el caso anterior, las otras dos concentraciones (0.561 y 1.24 $\mu\text{g/mL}$) muestran mayor sobre-expresión de 5 y 6 veces más que el testigo, respectivamente y de 2 y 3 veces más, comparada con el control de vehículo (Fig. 15b). Un dato importante es que la expresión del gen en presencia del antagonista CH-223191 (10 μM) disminuye de manera importante en todas las concentraciones de exposición al *BghiP* en comparación con la expresión en las células en ausencia el antagonista (Figs. 15a-15b, barras blancas).

Los resultados de la expresión del mRNA de CYP4B1 muestran que a diferencia del AhR, este gen no altera su expresión debido al vehículo. Cuando el *BghiP* se encuentra con ácidos omega como vehículo, se observa un incremento en la expresión del mRNA del CYP4B1 que no es significativo (Fig. 15d). Pero cuando el *BghiP* se disuelve en medio con DMSO como vehículo, el gen de CYP4B1 se expresa hasta 2 veces más que el testigo, en las tres concentraciones de exposición (Fig. 15c).

Al agregar el antagonista del receptor AhR (CH-223191) en las células con DMSO como vehículo con las 3 concentraciones de exposición, los niveles de expresión de este gen disminuyen significativamente, al compararlos con las condiciones en ausencia del antagonista. Sin embargo, no hay efecto en el control de vehículo. En el caso de las células expuestas al *BghiP* en ácidos omega como vehículo, la expresión del gen baja significativamente en las 3 concentraciones de exposición y en el control de vehículo (Figs. 15c-15d, barras blancas).

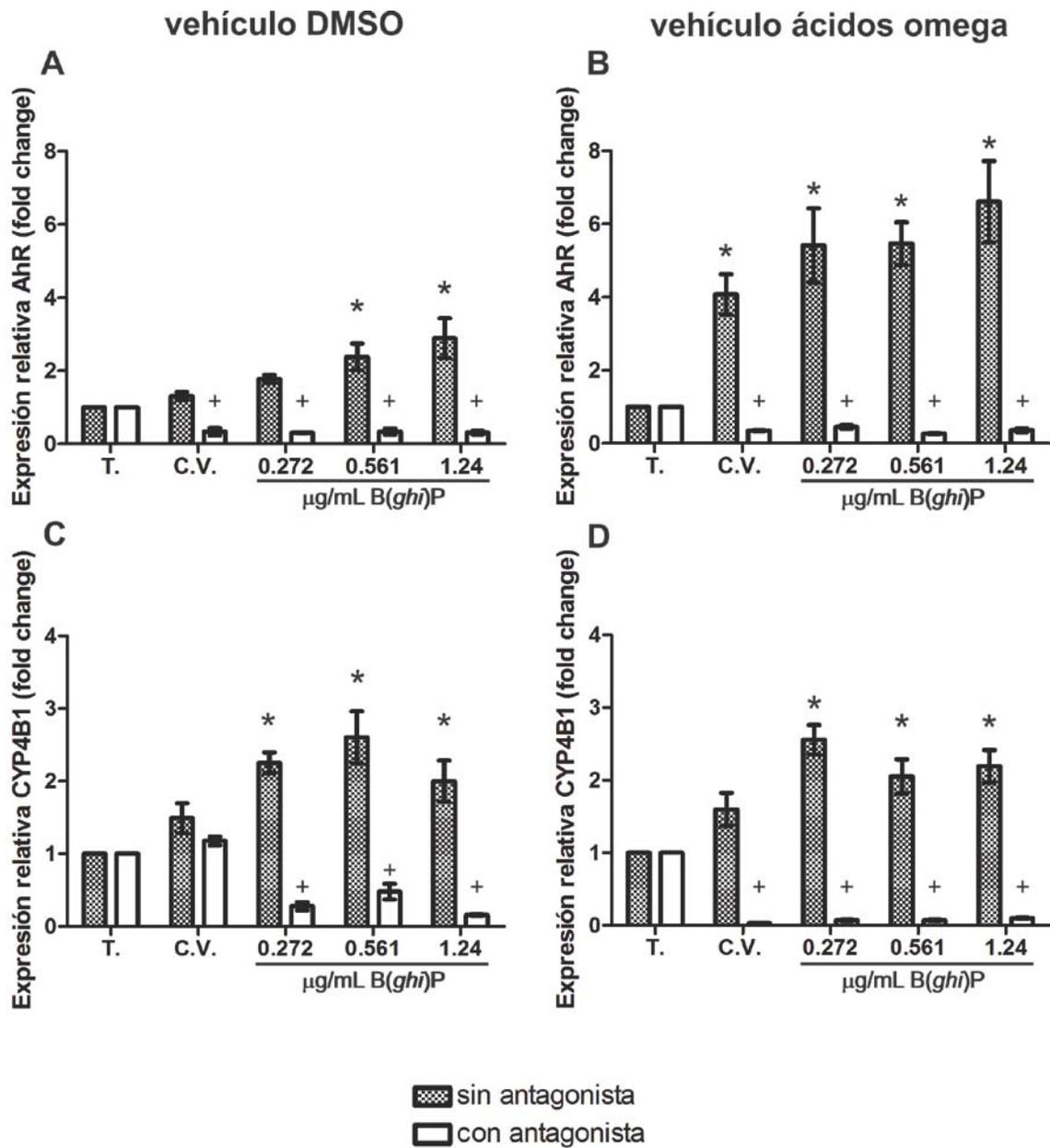


FIGURA 15. Efecto del B(ghi)P en la expresión relativa de los genes AhR y CYP4B1 en células NL-20 medida con RT-qPCR utilizando SYBR GREEN® como fluorocromo. Cada barra representa la media \pm e.e. de 3 repeticiones de 3 series de experimentos distintos (n= 9). Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo en ausencia del antagonista del receptor AhR. Los + indican diferencias significativas con respecto al testigo en presencia del antagonista del receptor AhR, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$). **A)** Expresión AhR, vehículo DMSO; **B)** Expresión AhR, vehículo ácidos omega; **C)** Expresión CYP4B1, vehículo DMSO; **D)** Expresión CYP4B1, vehículo ácidos omega; T: testigo (células sin exposición); C.V: control de vehículo.

7.6 Generación de estrés oxidante.

Se evaluó la reducción MTT en las células expuestas a BghiP disuelto en ambos vehículos, en presencia y ausencia del antagonista. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las células crecidas con DMSO como vehículo y el testigo sin exposición. Pero se observaron diferencias en la inducción de especies reactivas en las células expuestas a las 3 diferentes concentraciones de BghiP con respecto al control de vehículo. Al agregar el antagonista la cantidad de especies reactivas se eleva al doble en comparación al tratamiento sin antagonista, nuevamente existen diferencias significativas en las 3 concentraciones de exposición a BghiP comparadas con el control de vehículo, pero no se encontraron diferencias al incrementar la concentración de BghiP. Por lo cual se puede afirmar que existen especies oxidantes generadas en las células debido al efecto del BghiP y que este efecto de inducción no es dependiente de concentración de BghiP (fig. 16a). En el caso de las células expuestas a BghiP en medio con ácidos omega como vehículo, se observaron diferencias significativas entre el control de vehículo y el testigo con respecto a las 3 concentraciones de exposición de BghiP, sin embargo esta diferencia se debe a que la producción de especies reactivas es menor que la del testigo sin exposición, esta misma respuesta se da en presencia del antagonista (Fig. 16b). Estos datos sugieren que hay una disminución de estrés oxidante en el medio con ácidos omega como vehículo.

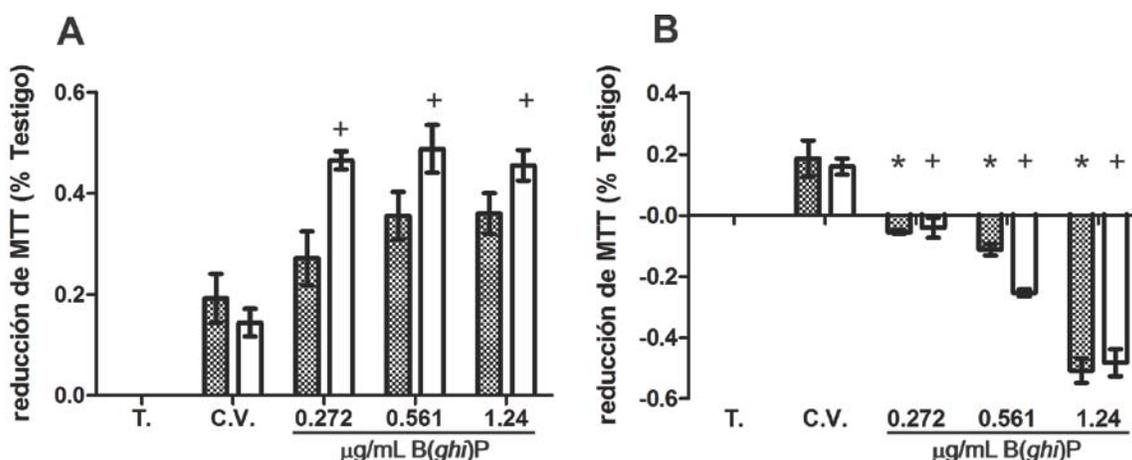


FIGURA 16. Efecto del BghiP en la producción de especies reactivas en células NL-20 a través de la reducción del bromuro 3-(4, 5-dimitiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT). Cada barra representa la media \pm e.e. de 3 repeticiones de 3 series de experimentos diferentes (n= 9). Los * indican diferencias significativas con respecto al c.v. en ausencia del antagonista del receptor AhR. Los ⁺ indican diferencias significativas con respecto al c.v. en presencia del antagonista, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey (p \leq 0.05). A) Células expuestas con DMSO como vehículo; B) Células expuestas con ácidos omega como vehículo; T: testigo (células sin exposición); C.V: control de vehículo.

Concentración de exposición

Vehículo de exposición	0.272 µg/µL		0.561 µg/µL		1.24 µg/µL	
	BghIP	BghIP + CH-223191	BghIP	BghIP + CH-223191	BghIP	BghIP + CH-223191
Morfología/ tinción con cristal violeta	DMSO	Presencia de vesículas translucidas. Núcleos hipercrómicos.	Presencia de vesículas translucidas en todo el citoplasma. Sin daño aparente en el núcleo.	Presencia de vesículas translucidas. Núcleos hipercrómicos.	Presencia de vesículas translucidas en todo el citoplasma. No hay fragmentación nuclear.	Presencia de vesículas translucidas. Núcleos hipercrómicos .
	Ácidos omega	Poca presencia de vesículas, células redondas y poca tinción en el núcleo.	Poca presencia de vesículas, células redondas y poca tinción en el núcleo.	Poca presencia de vesículas, células redondas y poca tinción en el núcleo.	Poca presencia de vesículas, células redondas y poca tinción en el núcleo.	Poca presencia de vesículas, células redondas y poca tinción en el núcleo.
Presencia de vesículas ácidas	DMSO	NO	NO	NO	NO	NO
	Ácidos omega	NO	NO	NO	NO	NO
Liberación de LDH al medio con respecto al control de vehículo	DMSO	Aumento no significativo	Aumento no significativo	Aumento no significativo	Aumento significativo (24 y 48 Hrs.)	Reducción del 66 % (24 Hrs.) 95 % (48 Hrs.)
	Ácidos omega	Aumento no significativo	Reducción de más del 90 % (24 y 48 Hrs.)	Aumento significativo (48 Hrs.)	Reducción de más del 90 % (24 y 48 Hrs.)	Reducción de más del 90 % (24 y 48 Hrs.)
Localización celular de Ahr/ Inmunohistoquímica	DMSO	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	Citoplasma
	Ácidos omega	Núcleo y citoplasma	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Citoplasma

8. DISCUSIÓN

La Ciudad de México enfrenta serios problemas de contaminación atmosférica por compuestos orgánicos, materia particulada e hidrocarburos aromáticos policíclicos ocasionados en gran parte por la gran cantidad de habitantes, actividades y tráfico vehicular en la metrópolis. Ésta situación se ve agravada debido a la falta de dispersión de los contaminantes, ya que al estar rodeada en tres de sus lados por montañas y volcanes de más de 3000 metros de altura, hay poca circulación del viento para acelerar su diseminación. La altitud de la Ciudad de México contribuye además a que exista una combustión ineficiente, por lo cual se favorece la formación de los HAPs. La gran preocupación de esta clase de contaminantes se debe al hecho de que varios de estos compuestos provocan efectos dañinos al organismo, que pueden poner en peligro la salud de sus habitantes (Molina y Molina, 2004; Mugica *et al.*, 2010).

Muchos trabajos se han realizado en diversos laboratorios distribuidos alrededor del mundo, con diferentes metodologías y organismos de estudio, con el fin de cuantificar el impacto de estos HAPs y conocer sus mecanismos de toxicidad. Existen muy pocos estudios enfocados a los efectos de la exposición de seres humanos a los HAPs de forma individual, ya que la mayoría de las veces se realizan con mezclas de hidrocarburos. Sin embargo, al investigarse de esta forma el potencial tóxico de cada uno puede cambiar y por tanto no demostrar el verdadero efecto que generan por separado (Binková y Šrám, 2004). Por consiguiente, existe una necesidad real de compilar todos los datos que ya existen en la literatura, obtenidos *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, derivados de experimentos de simulación, exposiciones ocupacionales o desastres ambientales, para generar un banco de información relacionada a los principales efectos de cada uno de los contaminantes e identificar aquellos que no cuentan con información suficiente sobre su toxicidad: tal es el caso del BghIP. La importancia de estudiar este hidrocarburo radica en que la primera vez que se estudió por la IARC, en 1983, se clasificó con resultados inadecuados para considerarlo carcinogénico en animales, así como no clasificable como carcinogénico para seres humanos (grupo 3). Desde entonces, se ha mantenido en ese estatus en las revisiones de 1998, 2002 y 2010 ya que no se ha generado nueva información sobre este compuesto (IARC, 1983; 2010; WHO/IPCS, 1998; SCF, 2002).

8.1 Efectos en la viabilidad de las células NL-20.

En estudios realizados por diferentes grupos de investigación en la Ciudad de México (desde 1999 hasta 2013) se ha demostrado que el contaminante más abundante en la atmósfera es el BghiP (Guzmán-Torres *et al.*, 2009; Múgica *et al.*, 2010; Amador-Muñoz *et al.* 2011; 2013). Es un HAP peri-condensado, de 6 anillos, asociado a las PM_{2.5}. Las concentraciones elevadas de BghiP confirman que las emisiones por tráfico vehicular son la mayor fuente de este HAP en la ciudad (Marr *et al.*, 1999; 2006). Estos hechos justificaron plantear como objetivo principal de este trabajo, el evaluar los efectos tóxicos del BghiP en células bronquiales humanas de la línea NL-20, y así confirmar *in vitro* los efectos biológicos de este compuesto.

Las concentraciones de exposición que se utilizaron en este trabajo fueron obtenidas con base a las reportadas en las PM_{2.5} de la atmósfera de la ciudad de México por el estudio de Amador-Muñoz *et al.* (2011) y tomando en cuenta datos anteriores de nuestro laboratorio (Miguel- Perez *et al.*, 2012) en el cual se expuso la misma línea celular (NL-20) a la fracción orgánica extraíble de PM_{2.5} obtenida de 5 filtros localizados en diferentes puntos de la ciudad de México. Para ello, se utilizaron 2 vehículos para disolver el BghiP y exponer a las células: DMSO y ácidos omega, ya que algunas veces la absorción de compuestos por las membranas biológicas pueden verse favorecidos al usar un medio lipofílico. Se midió la viabilidad de las células expuestas a BghiP por dos métodos: rojo neutro y liberación de LDH al medio. Ambos mostraron resultados contradictorios.

Esta diferencia en los resultados puede deberse a la naturaleza de cada ensayo. La técnica de LDH se basa en la liberación de la enzima después de que el daño a las membranas de la célula ya fue hecho, esto se puede utilizar como indicador relativo de viabilidad en función de la integridad celular. Mientras que el método del rojo neutro se basa en la retención del colorante por lisosomas funcionales que se puede dar a pesar de que la célula pierda integridad en las membranas citoplásmicas. Para los propósitos de éste estudio es posible considerar que el ensayo de rojo neutro podría ser una técnica para detectar daños a los lisosomas, mas no en la pérdida de integridad de la membrana plasmática, la cual se ve mejor reflejada por la liberación de LDH. Por lo que es importante utilizar más de una técnica para poder distinguir entre efectos de ciertos compuestos en los organelos o citotoxicidad general, como pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Fotakis y Timbrell, 2006).

Una posible explicación es que de acuerdo a modelos que utilizan vesículas multilamelares (MLVs), los HAPs son capaces de desordenar las membranas artificiales en una forma que responde a la concentración, cuando se utilizan disolventes orgánicos o lipídicos, pero esto no ocurre en soluciones acuosas. De igual forma pueden transferirse de vesículas cargadas con el hidrocarburo a vesículas vacías por lo que se sugiere que los agentes lipofílicos favorecen la absorción y entrada de estos compuestos a las membranas (Castelli *et al.*, 2002; Librando *et al.*, 2003).

Otra explicación puede atribuirse a la activación del receptor AhR por el BghiP. Para comprobar este hecho, se evaluó el efecto de un antagonista del receptor AhR, el 2-metil-2H-pirazol-3-ácido carboxílico (2-metil-4-*o*-tolilazo-fenil)-amida (CH-223191). El CH-223191 no tiene actividad de agonista frente a AhR, es un antagonista puro, que ejerce su efecto por su habilidad para actuar como un ligando competitivo e inhibiendo la transformación del receptor. El efecto del antagonista se ha demostrado tanto en análisis de unión a ligando, como en inhibición de expresión de genes inducidos por TCDD, dependientes de AhR tanto *in vivo* (en ratones) como *in vitro* en distintos tipos de líneas celulares (Kim *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012).

Los resultados demostraron que el daño a las células disminuye en presencia de CH-223191. En el caso de las células con DMSO como vehículo, hay una reducción en la liberación de LDH de casi del 30 % con respecto al mismo tratamiento sin antagonista (en las concentraciones de 0.272 y 0.561 µg/mL) y del 66 % (en la concentración de 1.24 µg/mL) a las 24 horas de exposición. Mientras que en las células con ácidos omega como vehículo el daño se reduce en más del 90 % en todas las concentraciones de exposición al compararlas con la misma dosis sin antagonista a las 24 y 48 horas de exposición. Esto sugiere que el daño está asociado a la activación de la vía AhR ya que el antagonista redujo el daño provocado en las células expuestas. Este efecto protector del CH-223191 a las membranas es más evidente cuando se utiliza un medio lipofílico como los ácidos omega, lo que demuestra que el medio en el que se encuentre el BghiP parece influir en la forma en la que es recibido por las células, concordando con los modelos de membranas artificiales de Castelli *et al.* (2002) y Librando *et al.* (2003).

8.2 Cambios morfológicos inducidos.

Al analizar la morfología celular no se observaron diferencias entre las células testigo y los controles de vehículo, lo que confirma que el DMSO y los ácidos omega (ambos al 1 %) por sí mismos no afectan la morfología de las células. Cuando se exponen al BghiP en ambos vehículos, el compartimiento citoplasmático muestra un gran número de vesículas confiriéndole una apariencia espumosa. En el caso específico las células con DMSO como vehículo, éste efecto parece aumentar directamente con la concentración de exposición dado que, en la concentración más alta (1.24 µg/mL), se aprecian incluso vesículas más grandes. Mientras que en las células con ácidos omega como vehículo, se observan más pequeñas las vesículas en el citoplasma en las tres concentraciones de exposición. Un dato importante es que con ambos vehículos y en todas las concentraciones, los núcleos de las células aparecen hipercrómicos cerca de la membrana nuclear, este hecho se manifiesta típicamente en núcleos bien preservados, activos, con aumento del tamaño de la cromatina.

Cabe resaltar que también cuentan con una membrana nuclear bien definida y con nucléolos prominentes, por lo cual se descarta que exista fragmentación nuclear. Tampoco se observan daños causados por necrosis o apoptosis en las células, por lo que la disminución en la viabilidad que se observa con la liberación de LDH no se puede asociar a estos tipos de muerte celular. Este efecto de bloqueo de la apoptosis fue reportado por Ferecatu *et al.* (2010), y lo demostraron al exponer durante 24 a 72 horas a células bronquiales (16HBE, BEAS-2B y NCI-H292) a PM_{2.5} recolectadas en la ciudad de París. Observaron que las células no presentaron incremento importante en los marcadores de daño por apoptosis cuantificados a través de disminución en potencial de membrana de la mitocondria con DiOC6(3), aumento del potencial oxidante cuantificado con hidrogenperóxido, exposición de fosfatidil serina a través de tinción positiva con Anexina V-FITC y permeabilización de la membrana por la incorporación de yoduro de propidio. El hecho de que el BghiP no promueva la apoptosis no significa que no pueda modificar el estado de las células bronquiales. En realidad, tal como sucede en el estudio de Ferecatu *et al.* (2010), podría significar que el BghiP puede inhibir la capacidad de las células para morir por apoptosis a través de activar la vía de AhR. En su trabajo utilizando un inductor de apoptosis (A23187) demuestran que al activar la vía AhR por un agonista (β-naftoflavona), se incrementa el efecto antiapoptótico en las células bronquiales, contrario a lo que sucede al emplear un RNA de silenciamiento del AhR e introducirlo a las células, donde el nivel de apoptosis en las células se incrementa (Ferecatu *et al.*, 2010). De acuerdo con los criterios establecidos por el NCDD (Nomenclature Committee on Cell Death) en 2009, la apoptosis se puede describir por una serie de aspectos morfológicos

específicos que incluyen: que las células se tornen redondas, la retracción de pseudópodos, la reducción del volumen de la célula, la condensación de la cromatina (puede haber fragmentación nuclear en algunos casos), que existan pocos cambios ultraestructurales o modificaciones en los organelos citoplasmáticos y que la membrana plasmática se mantenga hasta las últimas etapas del proceso. En el modelo propuesto en este trabajo se pueden apreciar algunos de estos cambios en las células en presencia de CH-223191, lo que podría respaldar que la activación de la vía AhR por BghiP permite el bloqueo de la apoptosis como se describe en el trabajo de Ferecatu *et al.* (2010) sin embargo esto tendría que comprobarse con técnicas bioquímicas (Kroemer *et al.*, 2009).

Por otra parte el antagonista CH-223191 no disminuye el número de las vesículas en el citoplasma de las células en ninguno de los vehículos o concentraciones de exposición, lo que sugiere fuertemente que este evento no se encuentra asociado a la actividad del receptor AhR. Ya que las células expuestas retienen el colorante rojo neutro y presentan un gran número de vesículas en el citoplasma, se verificó si éstas podrían tener relación con el proceso de autofagia y el cambio corresponda a la acumulación de autofagosomas y autofagolisosomas. La naranja de acridina es un colorante sensible al pH que puede ser usado para la detección de compartimentos ácidos, donde se protona y se acumula. A pH ácido emite fluorescencia roja con una intensidad proporcional al grado de acidez, además tiñe el DNA y citoplasma en color verde. Sin embargo, los resultados muestran solo los núcleos y el citoplasma teñidos y no aparecen las vesículas rojas que se asocian a su naturaleza ácida, incluso la tinción verde se encuentra alrededor de las vesículas en las células expuestas al BghiP, pero no hay fluorescencia dentro de ellas, lo que permitió descartar esta vía como la responsable del incremento en el número de vesículas.

Existen reportes de un tipo de respuesta celular denominada “methuosis” y se ha agregado a la lista de muertes celulares no apoptóticas. Se caracteriza por la acumulación de vesículas en el citoplasma que se originan a partir de macropinosomas. Éste tipo de macropinocitosis no controlada es un proceso de endocitosis independiente de clatrina, por el cual las células internalizan fluido extracelular generando prolongaciones en la membrana celular que atrapan los fluidos y los rodean para transportarlos dentro del citoplasma, donde se acumulan: de ahí el término que significa “beber hasta la intoxicación”. En las células con “methuosis”, las vesículas poseen una sola membrana, se encuentran rellenas de fluido no ácido y no presentan alteraciones a nivel nuclear (Maltese y Overmeyer, 2014). Éste puede ser el proceso que explique lo que el BghiP provoca en las células NL-20, sin embargo se tendrá que confirmar con marcadores moleculares y ultraestructura de las células expuestas al BghiP.

8.3 Translocación del receptor al núcleo de las células

El receptor AhR es un factor de transcripción ligando-dependiente que regula un gran número de respuestas tejido-dependientes. Los ligandos clásicos del receptor son los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), numerosos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y compuestos similares a HAPs. Se han caracterizado por tener mayor afinidad por el receptor y son los responsables de producir las respuestas típicas dependientes de la activación de la vía.

Sin embargo, en los últimos 10 años se han identificado y caracterizado un gran número de agonistas naturales, sintéticos y endógenos para el receptor AhR cuyas estructuras y características fisicoquímicas son dramáticamente diferentes a los ligandos clásicos como los HAPs. La potencia relativa de los ligandos para activar la vía de AhR es directamente proporcional a la afinidad con la que se une al receptor. A mayor proporción de ocupación del receptor, mayor es la probabilidad de que el complejo receptor-ligando interactúe con las regiones XRE en el DNA. Durante muchos años se creyó que un requerimiento estructural importante para la unión de un HAP al receptor, era la presencia de “regiones bahía” e incluso se les caracterizó como carcinógenos a todos aquellos HAPs que tuviesen estas estructuras (Boström *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015).

Con los resultados del presente estudio se demostró que a pesar de que el BghiP no presenta estructuras bahía, tiene la suficiente afinidad para unirse al receptor y lograr translocarlo al núcleo de las células NL-20. Esto sucedió con el BghiP disuelto en ambos vehículos y en todas las concentraciones de exposición. Éste efecto parece ser específico de la unión del BghiP al receptor, ya que al agregar el antagonista CH-223191, se bloquea la translocación al núcleo. Estos resultados corroboran lo reportado anteriormente por Miguel-Pérez *et al.* (2012) quienes usando la misma línea celular pero expuesta a la fracción orgánica de las PM_{2.5} (MOE) de la ciudad de México, también indujo la translocación del receptor al núcleo; cabe aclarar que la MOE es una mezcla de alcanos de cadenas largas e hidrocarburos, entre ellos el BghiP. Este dato es importante ya que demuestra uno de los pasos críticos para la activación de la vía AhR. El complejo AhR:Arnt tiene alta afinidad para unirse a sitios de reconocimiento en el DNA que estimulan la transcripción tanto de AhR, como de un grupo de genes blanco que incluyen a aquellos que participan en el metabolismo de xenobióticos (DeGroot *et al.*, 2012).

8.4 Expresión de los genes AhR y CYP4B1.

Al cuantificar la expresión del gen AhR en el modelo propuesto en este trabajo, los resultados muestran en primer lugar que los ácidos omega, provocan la sobre-expresión del transcrito de AhR, mientras que el DMSO no tiene tal efecto. Sin embargo, si los resultados de expresión se normalizan con respecto a los controles de su vehículo (DMSO o ácidos omega), los niveles de expresión siguen el mismo comportamiento en ambos casos, es decir que conforme se aumenta la concentración de BghiP en el medio donde crecen las células, la cantidad de transcrito de AhR también se elevó hasta 3 veces más que el control de vehículo en la concentración de exposición más alta. Al agregar el antagonista CH-223191 a las células expuestas al BghiP disuelto en ambos vehículos y en todas las concentraciones de exposición, la cantidad de transcrito de AhR disminuye significativamente.

Por lo cual se puede proponer que el BghiP provoca cambios en la expresión del gen AhR en las células bronquiales humanas de la línea NL-20. Ya que el receptor AhR puede tener amplia gama de unión a ligandos, los resultados sugieren fuertemente que la estructura de los ácidos omega puede ser reconocida por el receptor y que esta sea la razón por la cual el transcrito se sobre-expresa en este vehículo. El hecho de que al antagonizar al receptor también se reduce la expresión del mensajero de AhR en el control de vehículo de ácidos omega, reafirma que el efecto ésta asociado a la actividad del receptor (DeGroot *et al.*, 2012).

Los resultados de la expresión del mRNA de CYP4B1 muestran que a diferencia del AhR, este gen no altera su expresión debido al vehículo en el cual se encuentra disuelto el BghiP. Al exponer las células al BghiP cuando el medio contiene DMSO, el transcrito de este citocromo se encontró en mayor cantidad (hasta 2 veces más que el testigo) mientras que en las células con medio lipofílico aunque la expresión es mayor que en el testigo no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa. Al agregar el antagonista CH-223191, la expresión de CYP4B1 se reduce casi en su totalidad en todos los casos excepto en el control del vehículo de DMSO. Lo cual sugiere muy fuertemente que la sobre-expresión del CYP4B1 es realmente un efecto inducido por la expresión de AhR. El tejido pulmonar tiene la capacidad de biotransformar compuestos como HAPs en intermediarios reactivos, siendo isoformas de los citocromos CYP P450 los productores del metabolismo oxidante y la activación metabólica de xenobióticos. En un estudio de Leclerc *et al.* (2011) se demostró que los CYP2S1, CYP4B1, AKR1A1 y EPHX1 son las enzimas metabolizadoras de xenobióticos mas expresadas en la mucosa bronquial (BM) y en el parénquima pulmonar (PP). En general el CYP4B1 es un citocromo extrahepático en casi todos los animales y se

expresa predominantemente en el pulmón, con muy poca o nula expresión en hígado. En seres humanos se expresa mayormente (70 %) en pulmón, bronquios, alveolos y tráquea. Este citocromo es el único miembro de la familia CYP4 que tiene actividad contra xenobióticos (Castell *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2010; Leclerc *et al.*, 2011). En un trabajo de Courcot *et al.* (2012) en el que se caracterizó la expresión de 3 80 genes que participan en el metabolismo de xenobióticos en 10 líneas celulares de pulmón que se utilizan regularmente en los laboratorios (A549, H292, H358, H460, H727, Calu-1, 16HBE, 1HAEO, BEAS-2B y L-132) y 4 cultivos primarios de células bronquiales epiteliales humanas, se demostró que aunque el CYP4B1 tiene altos niveles de expresión en el tejido pulmonar *in vivo* (especialmente en PP y BM), solo la línea BEAS-2B y los cultivos primarios tienen la capacidad de expresar este gen (Leclerc *et al.*, 2011; Courcot *et al.*, 2012). Los resultados demuestran que las células bronquiales de la línea NL-20 también tienen la capacidad de expresar el CYP4B1, por lo tanto sugiere que pueden tener la capacidad de metabolizar xenobióticos y confirma que son un buen modelo *in vitro*.

Es claro que se debe confirmar a través de CHIP (inmunoprecipitación de la cromatina) o ensayos funcionales con genes reporteros, el efecto regulador de AhR sobre CYP4B1, ya que existe muy poca información al respecto por el hecho de que siempre se utiliza al CYP1A1 como el efector canónico de la vía. Sin embargo, hay 2 reportes que respaldan los resultados obtenidos. El primero de Mastuyugin *et al.* (2004) en el cual al buscar bioinformáticamente secuencias consenso de unión para HIF-1 α dentro del promotor de CYP4B1 de conejo, se encontró un sitio al que denominaron HIF-1-like (XRE) en la región -75 cerca de la TATA box putativa con la secuencia consenso (5'-GCGTG-3'), que no respondía a la transcripción del gen al inducir hipoxia, pero incrementaba la expresión de CYP4B1 al doble al agregar 3-metilcolantreno (3-MC) sugiriendo que este sitio tenía una mayor afinidad en respuesta a xenobióticos y ligandos de AhR que a respuesta de hipoxia (Mastuyugin *et al.*, 2004). La segunda es un estudio de Curran *et al.* (2015) en el cual buscaban una asociación entre la densidad de colágena y la activación de respuestas a hipoxia o xenobióticos en células epiteliales de mamífero. Para lo cual construyeron un plásmido reportero con el elemento de respuesta a hipoxia (HRE) y uno con el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE). Y los probaron en ausencia y en presencia de un inductor de hipoxia (DFMO) y un agonista de AhR, el tranilast en células MCF10A. Al agregar tranilast la respuesta de HRE disminuyó pero la de XRE aumentó. Para comprobar la respuesta de XRE en las células, examinaron la expresión de CYP1A1 y CYP4B1 la cual se incrementó en presencia de tranilast, lo cual sugiere la activación de la vía AhR (Curran *et al.*, 2015). Y por tanto refuerza la hipótesis de que CYP4B1 puede ser efector de la vía de AhR en las células NL-20 expuestas a BghiP.

Finalmente, la evidencia directa es que analizando la región 5' del promotor cercano del CYP4B1 (GenBank: BC017758.1), antes del ATG del inicio de la transcripción en la secuencia de humano, se localiza un elemento de respuesta a xenobióticos, XRE y que tiene la secuencia 5'-TGGCTG-3', similar a la secuencia consenso que es 5'-TNGCGTG-3' (Gasiewicz *et al.*, 2008).

8.5 Generación de estrés oxidante.

La vía AhR se activa e induce la expresión de los citocromos con el objeto de metabolizar a los HAPs. Como consecuencia de esta acción, se pueden provocar estrés oxidante y metabolitos reactivos que pueden causar daños al unirse covalentemente a sitios nucleofílicos de biomoléculas, o alterando las vías de señalización y supervivencia de las células (Visciano y Perugini, 2009). El término estrés oxidante se refiere a cualquier condición que aumenta el estado de oxidación de las células, generando un cambio en el equilibrio redox. Generalmente se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en comparación con los niveles de antioxidantes (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001; Benítez-Zequeira, 2006). El estrés oxidante no necesariamente produce toxicidad, pero es un mecanismo importante de muchos procesos tóxicos. En el caso específico del BghiP se ha reportado que por acción de los citocromos pueden formarse dos epóxidos como últimos metabolitos del compuesto original: el 3,4-epoxi-3,4-dihidro-BghiP (3,4-óxido) y el 3,4,11,12-bisepoxi-3,4,11,12-tetrahidro-BghiP (3,4,11,12-bisóxido), los cuales tienen efecto mutagénico en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, y se considera a este tipo de epóxidos (óxidos arenos) como intermediarios altamente reactivos. Por esta razón se corroboró la formación de estas moléculas en el modelo de células NL-20, a partir de la formación de cristales de MTT-formazan generados por interacciones de los radicales libres con el reactivo de MTT (Liu y Nair, 2010; Valcheva-Traykova *et al.*, 2014). Los resultados demuestran que cuando las células se exponen a BghiP utilizando DMSO como vehículo se induce la producción de especies reactivas. En un estudio realizado por Cho *et al.* (2005) se demostró que el BghiP puede catalizar la reducción de DTT, una medida cuantitativa de la formación *in vitro* de ROS (Cho *et al.*, 2005; Platt *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2013).

Al agregar el antagonista CH-223191 a las células expuestas, la cantidad de especies reactivas se eleva al doble en comparación al tratamiento sin antagonista. Este hecho correlaciona con la baja en la expresión del receptor AhR, que al no activarse afecta el metabolismo de xénobioticos. En el modelo se comprobó que el antagonista reduce la expresión del CYP4B1 y se puede hipotetizar que de la misma forma se reducen enzimas de fase II, por lo cual no existen suficientes enzimas antioxidantes y se genera la acumulación de especies reactivas de oxígeno causando estrés oxidante en las células. Durante un estrés ambiental sostenido, se promueve la producción de ROS por largo tiempo, lo que puede causar daños importantes en la estructura y funcionamiento celular, entre ellas inducir mutaciones somáticas o transformaciones neoplásicas. De hecho, la iniciación del cáncer y su progresión se ha asociado al incremento de estrés oxidante (Collins *et al.*, 1997; Picada *et al.*, 2003).

Varios estudios han probado que en las PM_{2.5}, los HAPs y sus metabolitos causan inestabilidad en el estado redox de las células. Gualtieri *et al.* (2012) demostraron que las PM_{2.5} obtenidas de la ciudad de Milán causan la alteración de 68 genes, la producción de ROS y daño al DNA en células A549. Øvrevik *et al.* (2010) demostraron la potencia de los nitro- y amino-HAPs para inducir la respuesta inflamatoria por ROS, por la producción de citocinas y quimiocinas en células bronquiales BEAS-2B (Øvrevik *et al.*, 2010; Gualtieri *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2013).

Para lograr el balance entre la producción y eliminación de ROS, además de la actividad de las enzimas de fase I y fase II, pueden actuar sistemas antioxidantes exógenos. El uso de ácidos omega como vehículo, puede explicar los resultados obtenidos en el caso de las células expuestas a BghiP disuelto en este vehículo. La cantidad de ROS en las células expuestas con este vehículo es menor que la del testigo sin exposición en presencia y en ausencia del antagonista. Lo que sugiere una disminución de estrés oxidante debido a la capacidad antioxidante de los ácidos omega. El hecho de no encontrar estrés oxidante en este medio, no revela que no exista la generación de ROS, sino que los ácidos omega podrían funcionar como captadores de radicales libres (Mason y Jacob, 2015). Estos resultados concuerdan con el trabajo de Wenbin *et al.* (2014) quienes indujeron estrés oxidante por BaP en células bronquiales BEAS-2B y posteriormente redujeron 72 % su producción al agregar vitamina E y 85 % al agregar curcumina (Mooney *et al.*, 2005; Benítez-Zequiera, 2006; Wenbin *et al.*, 2014).

9. CONCLUSIONES

- El daño en la integridad de las membranas celulares, medido por la liberación de LDH, está asociado a la actividad del receptor AhR.
- El BghiP induce la formación de vesículas no acídicas en el citoplasma de las células bronquiales humanas NL-20. Ésta respuesta no se encuentra asociada al receptor AhR.
- El BghiP no induce un efecto apoptótico o necrótico en las células expuestas, mientras la vía de AhR se encuentra activada.
- El BghiP induce la activación “canónica” de la vía AhR, ya que al exponer las células NL-20 al HAP, el receptor se transloca al núcleo de las células y provoca el incremento de expresión tanto del gen AhR como del gen efector de la vía CYP4B1. Al antagonizar al receptor ambos efectos se abaten.
- Por último, el BghiP induce estrés oxidante en las células expuestas y al antagonizar al receptor se eleva al doble, lo que demuestra que la activación de la vía suprime en parte la acumulación de especies reactivas.
- Al estar en un medio con capacidad antioxidante como son los ácidos omega, el estrés oxidante se abate en las células NL-20 expuestas a BghiP.

10. LITERATURA CITADA

Alfaro-Moreno E., Martínez L. y García-Cuellar C. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM₁₀ from three different zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives*. **110**:715-720.

Amador-Muñoz O., Bazán-Torija S., Villa-Ferreira S.A., Villalobos-Pietrini R., Bravo-Cabrera J.L., Munive-Colín Z., Hernández-Mena L., Saldarriaga-Noreña H. y Murillo-Tovar M.A. (2013). Opposing seasonal trends for polycyclic aromatic hydrocarbons and PM10: Health risk and sources in southwest Mexico City. *Atmospheric Research*. **122**:199-212.

Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Miranda J. y Vera-Avila L.E. (2011). Organic compounds of PM2.5 in Mexico Valley: Spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Science of the Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.11.026.

Arenas-Huertero F., Apátiga-Vega E., Miguel-Pérez G., Villeda-Cuevas D. y Trillo-Tinoco J. (2011). Molecular Markers Associated with the Biological Response to Aromatic Hydrocarbons from Urban Air in Humans, *Air Pollution - New Developments*, Prof. Anca Moldoveanu (Ed.), ISBN: 978-953-307-527-3, InTech, DOI: 10.5772/17999.

Baird W.M., Hooven L.A. y Mahadevan B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **45**(2-3):106-114.

Benítez-Zequeira D.E. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. **25** (2).

Binková B. y Šrám R.J. (2004). The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutation Research*. **547**: 109-121.

Borgen A., Darvey H., Castagnoli N., Crocker T.T., Rasmussen R.E. y Wang I.Y. (1973). Metabolic conversion of benzo(a)pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid. *Journal of Medicinal Chemistry*. **16**(5):502-506.

Boström C.E, Gerde P., Hanberg A., Jernström B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K. y Westerholm R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives*. **110**:451-488.

Brandt H.C. y Watson W.P. (2003). Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *The Annals of Occupational Hygiene*. **47**(5):349-378.

Brunnberg S., Swedenborg E. y Gustafsson, J.-Å. (2012). Functional Interactions of AHR with other Receptors. En: *The AH Receptor in Biology and Toxicology* (ed R. Pohjanvirta), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. Capítulo 9.

Castell J.B., Donato M.T. y Gómez-Lechón M.J. (2005). Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **57**: 189-204.

Castelli F., Librando V. y Grazia Sarpietro M. (2002). Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. *Environmental Science and Technology*. **36**(12):2717-2723.

Cho A.K., Sioutas C., Miguel A.H., Kumagai Y., Schmitz D.A. y Singh M. (2005). Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental Research*. **99**: 40-7.

Choi E.Y., Lee H., Cameron Dingle R.W., Kim K.B. y Swanson H.I. (2012). Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology*. **81**: 3–11.

Ciganek M., Neca J., Adamec V., Janosek J., Machala M. (2004). A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment*. **334-335**:141-148.

Coleman J., Blake-Kalff M. y Davies E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*. **2**: 144-151.

Collins A., Cadet J., Epe B. y Gedik C. (1997). Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation. *Carcinogenesis*. **18**: 1833-1836.

Courcot E., Leclerc J., Lafitte J.J., Mensier E., Jaillard S., Gosset P., Shirali P., Pottier N., Broly F. y Lo-Guidice J.M. (2012). Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metabolism and Disposition*. **40**(10):1953-65.

Curran C.S., Carrillo E.R., Ponik S.M. y Keely P.J. (2015). Collagen density regulates xenobiotic and hypoxic response of mammary epithelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **39**(1): 114–124.

DeGroot D., He G., Fracalvieri D., Bonati L., Pandini A. y Denison M. S. (2012). AHR Ligands: Promiscuity in Binding and Diversity in Response. En: *The AH Receptor in Biology and Toxicology* (ed R. Pohjanvirta), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. Capitulo 4.

Ferecatu I., Borot M.C., Bossard C., Leroux M., Boggetto N., Marano F., Baeza-Squiban A. y Andreau K. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Particle and Fibre Toxicology*. **7**:18.

Fotakis G. y Timbrell J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* **160**: 171–177.

Gasiewicz T.A., Henry E.C. y Collins L.L. (2008). Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. **18**(4):279–321.

Gualtieri M., Longhin E., Mattioli M., Mantecca P., Tinaglia V., Mangano E., Proverbio M.C., Bestetti G., Camatini M., Battaglia C. (2012). Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM_{2.5}. *Toxicology Letters*. **209**: 136–145.

Guzmán-Torres D., Eiguren-Fernández A. y Cicero-Fernández P. (2009). Effects of meteorology on diurnal and nocturnal levels of priority polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental and organic carbon in PM₁₀ at a source and a receptor area in Mexico City. *Atmospheric Environment*. **43**: 2693–2699.

Harvey R.G. (1997). *Polycyclic aromatic hydrocarbons*. New York: Wiley-VCH.

Hieger I. (1930). The spectra of cancer producing tars and oils and of related substances. *Biochemical Journal*. **24**(2):505-511.

IARC. (1983). Polynuclear aromatic compounds, Part 1: Chemical, environmental and experimental data. En: *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. IARC Press. Volumen 32. Lyon, Francia.

IARC. (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. En: *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. IARC Press. Volumen 92. Lyon, Francia.

Jardim M. J., Fry R. C., Jaspers I., Dailey L. y Diaz-Sanchez D. (2009). Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environmental Health Perspectives*. **117**(11): 1745-1751.

Kim K.H., Jahan S.A., Kabir E. y Brown R.J.C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*. **60**:71-80.

Kim S.H., Henry E.C., Kim D.K., Kim Y.H., Shin K.J., Han M.S., Lee T.G., Kang J. K., Gasiewicz T.A., Ryu S.H., et al. (2006). Novel compound 2-methyl 2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-(4-o-tolylazophenyl)amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology*. **69**: 1871–1878.

Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kishimoto, T., 2009. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med*. **31**(9), 2027-35.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. y Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. **16** :3-11.

Kuusimäki L., Peltonen K., Mutanen P. y Savela K. (2003). Analysis of particle and vapour phase PAHs from the personal air samples of bus garage workers exposed to diesel exhaust. *The Annals of Occupational Hygiene*. **47**(5): 389-398.

Leclerc J., Courcot E., Cauffiez C., Allorge D., Pottier N., Lafitte J.J, Debaert M., Jaillard S., Broly F. y Lo-Guidice J.M. (2011). Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: Transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie*. **93**: 1012-1027.

Lee S., Shin W-H, Hong S., Kang H., Jung D., Yim U.H., Shim W.J., Khim S.J., Seok C., Giesy J.P y Choi K. (2015). Measured and predicted affinities of binding and relative potencies to activate the AhR of PAHs and their alkylated analogues. *Chemosphere*. **139**: 23–29.

Lezama J L. II. Medio ambiente, sociedad y gobierno: la cuestión institucional. México: El Colegio de México; 2006.

Librando V., Grazia Sarpietro M. y Castelli F. (2003). Role of lipophilic medium in the absorption of polycyclic aromatic compounds by biomembranes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **14**(1-2): 25-32.

Liu Y. y Nair M.G. (2010). An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. *Journal of Natural Products*. **73**: 1193–1195.

Luczynski M.K., Góra M., Brzuzan P., Wilamowski J., Kozik B. (2005). Oxidative metabolism, mutagenic and carcinogenic properties of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Biotechnology*. **1**: 16-28.

Ma, Q. (2012). Overview of AhR functional domains and the classical AhR signaling pathway: Induction of drug metabolizing enzymes. En: *The AH Receptor in Biology and Toxicology* (ed R. Pohjanvirta), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. Capitulo 2.

Maltese W. y Overmeyer J. (2014). Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *The American Journal of Pathology*. **184**: 1630-1642.

Marin-Morales M.A., Morais Leme D. y Christofolletti Mazzeo D.E. (2009). A review of the hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. In: Polycyclic aromatic hydrocarbons: Pollution, Health effects and chemistry. Nova sciences publishers, Inc. ed. Pierre A. Haines and Milton D. Hendrickson. ISBN 978-1-60741-462-9.

Marr L.C., Dzepina K., Jimenez J.L., Reisen F., Bethel H.L., Arey J., Gaffney J.S., Marley N.A., Molina L.T. y Molina M.J. (2006). Sources and transformations of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico City. *Atmospheric chemistry and physics*. **6**: 1733-1745.

Marr L.C., Kirchstetter T.W., Harley R.A., Miguel A.H., Hering S.V. y Hammond S. K. (1999). Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions. *Environmental Science and Technology*. **33**: 3091-3099.

Mason R.P. y Jacob R.F. (2015). Eicosapentaenoic acid inhibits glucose-induced membrane cholesterol crystalline domain formation through a potent antioxidant mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1848(2): 502-509.

Miguel-Pérez G., Maya G., Flores-Márquez A. R., Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Eguía-Aguilar P., PérezPeña-DiazConti M., Arenas-Huertero F. (2013). Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **70**:107-115.

Molina L.T. y Molina M.J. (2004). Megacities and atmospheric pollution. *JAWMA* **54**: (644-680).

Mooney L.A., Madsen A.M., Tang D., Orjuela M.A., Tsai W.Y., Garduno E.R. y Perera F.P. (2005). Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene-DNA adducts and potential cancer risk in female smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. **14**(1):237-42.

Mugica V., Hernández S., Torres M. (2010). Seasonal Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure Levels in Mexico City. *Journal of the Air and Waste Management Association*. **60**:548-555.

Murray I., Morales J.L., Flaveny C.A., DiNatale B.C., Chiaro C., Gowdahalli K., Amin S. y Perdew G.H. (2010). Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity. *Molecular Pharmacology*. **77**: 247–254.

Opitz C. A., Litzenburger U. M., Sahm F., Ott M., Tritschler I., Trümp S., Schumacher T., Jestaedt L., Schrenk D., Weller M., Jugold M., Guillemin G. J., Miller C. L., Lutz C., Radlwimmer B., Lehmann I., von Deimling A., Wick W. y Platten M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. **478**: 197-203.

Øvrevik J., Arlt V.M., Øya E., Nagy E., Møllerup S., Phillips D.H. y Låg M., Holme J.A. (2010). Differential effects of nitro-PAHs and a mono-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **242**: 270–280.

Phillips D H. (1983). Fifty years of benzo[*a*]pyrene. *Nature* 303:468–472.

Picada J.N., Kern A.L., Ramos A.L.L.P. y Saffi J. (2003). O estresse oxidativo e as defensas antioxidantes. En: Silva J., Erdtmann B., Henriques J.A.P. (Eds.) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. pp. 251-264.

Platt K.L. y Grupe S. (2005). Microsomal biotransformation of benzo[*ghi*]perylene, a mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon without a “classic” bay region. *Chem. Res. Toxicol.* **18**:700-710.

Pott P. (2002). The surgical works of Percival Pott, F.R.S., surgeon to St. Bartholomew's Hospital, a new edition, with his last corrections. 1808. *Clin Orthop Relat Res* **309**:4-10.

Rajput, N., & Lakhani, A. (2010). Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban atmosphere of Agra, India. *Atmósfera*, 23, 2, 165-183.

Ramesh A., Walker S.A., Hood D.B., Guillen M.D., Scheneider K., Weyand E.H. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Toxicol* **23**(5):301-333.

Roberts B.J. y Whitelaw M.L. (1999). Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(51): 36351-36356.

Rodríguez Perón J.M., Menéndez López J.R. y Trujillo López Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 30 (1).

Santodonato J. (1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*. **34**(4):835-848.

SCF. (2002). Opinion of the scientific committee on food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final. Bruselas, Bélgica, 1-84.

Seto H., Ohkubo T., Kanoh T., Koike M., Nakamura K. y Kawahara Y. (1993). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the lung. *Environmental Contamination and Toxicology*. **24**: 498-503.

Shang Y., Fan L., Feng J., Lv S., Wu M., Li B., Zang Y.S. (2013). Genotoxic and inflammatory effects of organic extracts from traffic-related particulate matter in human lung epithelial A549 cells: The role of quinines. *Toxicology in Vitro*. 27(2): 992-931.

Shimada T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and drug detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* **21**(4):257-276.

Sims P., Grover P.L., Swaisland A., Pal K., Hewer A. (1974). Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* **252**(5481):326-328.

Slezakova K., Castro D., Delerue-Matos C., Alvim-Ferraz M da C., Morais S. y Pereira M do C. (2013). Impact of vehicular traffic emissions on particulate-bound PAHs: Levels and associated health risks. *Atmospheric Research.* **127**:141-147.

Tasdemir, Y., Esen, F. (2007). Dry deposition fluxes and deposition velocities of PAHs at an urban site in Turkey. *Atmospheric Environment* **41**, 1288- 1301.

Tokiwa H., Nakanishi Y., Sera N., Hara N. y Inuzuka S. (1998). Analysis of environmental carcinogens associated with the incidence of lung cancer. *Toxicology Letters.* **99**:33-41.

Valcheva-Traykova M.L., Traykov T.T. y Bocheva G.S. (2014). Interaction of propylthiouracil with model systems generating superoxide radical. *Journal of Biomedicine Clinical Research.* **7**(2): 93-98.

Villalobos-Pietrini R., Amador-Muñoz O., Valle-Hernández B.L., Gómez-Arroyo A., Waliszewski S. y Jazcilevich A.D. (2011). Organic compounds in airborne particles and their genotoxic effects in Mexico City. En: *Air Quality monitoring, assessment and management.* (Mazzeo N.A., Ed.), Intech open access publisher, pp.345-378, Croatia. ISBN978-953-307-317-0, www.intechopen.com.

Visciano P. y Perugini M. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons toxicity in animals and humans. En: Haines P.A. y Hendrickson M.D. (Eds.) *Polycyclic aromatic hydrocarbons: Pollution, health effects and chemistry.* pp. 52- 66.

WHO/IPCS. (1998). World health organization/ International programme on chemical safety. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental health criteria 202. International programme on chemical safety, world health organization, Ginebra.

Xue W. y Warshawsky D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons an DNA damage: a review. Toxicol Appl Pharmacol **206**(1):73-93.

Yamagiwa K. Ichikawa K. 1915. Experomentelle studie uber die pathogenese der epithelialgeschwulste. Mitt Med FakTokio. **15**:295-344.

Ziad Sami Naufal. (2008). Biomarkers of exposure to complex environmental mixtures. Tesis doctorado. Texas A&M University.