



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL BENZO[*GHI*]PERILENO EN
CÉLULAS DE EPITELIO BRONQUIAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CASTRO GÁLVEZ ZELMY

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1104/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

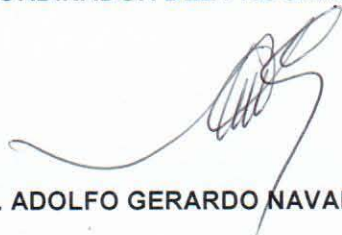
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **CASTRO GÁLVEZ ZELMY** con número de cuenta **98049095** con la tesis titulada **"EFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL BENZO[ghi]PERILENO EN CÉLULAS DE EPITELIO BRONQUIAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Secretario: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 08 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, por su formación académica.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada durante los cuatro años del Doctorado (No. de becario 441122).



Al Tutor principal de éste proyecto, el Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero y a los miembros del Comité Tutor, el Dr. Rafael Camacho Carranza y a la Dra. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes por su compromiso en mi formación durante todo el Doctorado.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi tutor principal, al Dr. Francisco Arenas Huertero por darme la oportunidad de trabajar y crecer profesionalmente, por tu amistad y por las enseñanzas durante estos cuatro años. Gracias por la libertad y confianza que me diste para desarrollar mi proyecto. Gracias por todo lo que pasamos juntos en nuestro día a día.

Al Dr. Abraham Hernández Hernández por todas las aportaciones teóricas y técnicas que hizo para mejorar mi proyecto de investigación y la publicación de éste. Gracias por tu profesionalismo y amistad en los momentos de crisis del Doctorado, aprendí mucho de ti.

A mi comité tutorial Dra. Teresa I. Fortoul Van der Goes y al Dr. Rafael Camacho Carranza por todos sus comentarios y observaciones que me prepararon para desarrollar mi pensamiento crítico y científico.

A mis sinodales por sus oportunas observaciones a mi tesis que mejoraron mi trabajo.

Al Dr. Omar Amador Muñoz, a la Dra. Margarita I. Palacios Arreola, Dr. Ricardo Valle Ríos y a la M. en C. Guadalupe Rivera Torruco por la excelente colaboración en sus respectivos laboratorios que permitieron un análisis más profundo del tema. Gracias por todo el conocimiento que me compartieron.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández por su amistad, calidad humana, sus consejos técnicos y toda su disposición para ayudarme en el desarrollo de mi proyecto.

A la Dra. Mónica Garrido Armas por su gran amistad, por darme apoyo en todo momento, por enseñarme a manejar la frustración en experimentos fallidos y por sus consejos para mejorar mi proyecto. Gracias por siempre alentarme en momentos difíciles y enloquecer juntas como buen equipo Monki. ¡Lo logramos!

A la Dra. Pilar Eguía Aguilar por su guía, apoyo y amistad que me otorgó, por siempre tener una disposición paciente para escuchar. Gracias Pili.

A la Dra. Norma Velázquez Guadarrama por todo su apoyo y disposición siempre que la busqué.

A la Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar por permitirme trabajar en su laboratorio para avanzar en mi proyecto de investigación

A la Química Marina Ramírez por su amistad y ser una persona noble, dispuesta a tener el material y el equipo lo mejor posible para trabajar. Gracias por alentarme a seguir a pesar del estrés.

A la MVZ. Rocío Chávez Trejo por su calidez y apoyo administrativo. Gracias por siempre estar al tanto de nuestros trámites y por escucharnos.

A los Doctores Liliana Moreno Vargas y a Diego Prada García por su sencillez y calidez. Por sus buenos consejos y pláticas que hacían más ligero el Doctorado.

A la Médico Brenda Salamanca Gil por ese gran ser humano que eres. Sacas lo mejor de las personas. Gracias por tu amistad y cariño de ti y tu familia.

A mi maestra y amiga Oli por más de 20 años de experiencias compartidas con mucho cariño. Gracias por tu ejemplo.

A mis hermanas porque crezco con ustedes, porque me impulsan a ser lo mejor y por su gran amor. A través de ustedes yo sigo aprendiendo.

A mis pequeños babies Andy y Coyi que iluminan y llenan mi vida de alegría aun en la distancia. Y a Lucca por su cariño y nobleza.

A todos mis amigos y compañeros que me han regalado un pedacito de su alegría y sabiduría. Gracias Sarai, Gi, Ileana, Vinni, Sofí, Diana Corina, Dulce, Jimenita, Zaira, Mario, Aranxa y Brenda bebés, Amaranta, Ceci-cuyito, Fernanda, Nicole, Pili Navarrete, Bere y Mickey, Francisco, Diego, Paqui baby, Lety, Alfredo, Carlos, Silvia, Marú, Lolita, Julio, Ro, Alberto y Dany.

A mis tíos y primos por su cariño y por enseñarme mis raíces.

A mis cuatro abuelos, gracias porque son el ejemplo de disciplina, trabajo, constancia y honestidad. Los llevo en mi corazón.

A mis padres, por estar siempre a mi lado apoyándome y dándome su amor incondicional. Este trabajo también es un logro suyo porque ustedes formaron lo mejor de mí, gracias. Reconfortan mi corazón siempre con su amor.

Y a Juan Carlos Vázquez Astudillo, mi amigo y pareja, gracias por tu amor, comprensión, por tu creatividad y por ser alguien muy especial en las buenas y en las malas. Gracias por este camino que vamos construyendo con Yin Yang.

DEDICATORIA

Para mis padres Ismael y Zelma con todo mi amor y agradecimiento.

Lo que importa no son las grandes ideas de los otros, sino las pequeñas cosas que se te ocurren a ti, Murakami, 1999.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS Y/O ACRÓNIMOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	
Emisión, dispersión y persistencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en el medio ambiente.	5
Vías de exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos.	9
Potencial genotóxico de los PAHs en función de la estructura química Formación de Aductos.	10
Oxidación de las bases.	13
Fragmentación del DNA.	13
Activación de las vías de reparación del DNA por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos.	
Reparación de aductos por enzimas de reparación por escisión de nucleótidos (NER).	15
Reparación de las bases nitrogenadas por enzimas de reparación de escisión de bases (BER).	18
Reparación de rompimientos de doble cadena por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ).	22
Reparación de desajuste de bases (MMR).	26
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
METODOLOGÍA	
Cultivo de las células NL-20.	28
Esquema de exposición al B[<i>ghi</i>]p preliminar.	28
Ensayo de viabilidad MTT de tiempos de exposición preliminares.	29
Electroforesis unicelular (Single Cell Gel Electrophoresis) de tiempos de exposición preliminares.	29
Inducción de 8-OHdG por el B[<i>ghi</i>]p de tiempos de exposición preliminares.	30

Análisis de la morfología celular.	33
Inmunoquímica de la γ H2AX y del factor inductor de apoptosis (AIF).	33
Extracción de RNA total.	34
RNA y síntesis de cDNA para el análisis de los genes por las placas.	35
Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR-RT) con placas TaqMan.	35
Síntesis de cDNA para el análisis de dirigido de ciertos genes con diseño de oligos.	36
Expresión de los genes de reparación por RT-qPCR con diseño de oligos.	36
Detección de fragmentación del DNA inducido por el B[ghi]p por ensayo de TUNEL.	37
Cuantificación de caspasas activas y de Ki67 como marcador de proliferación.	38
Western blot.	38
Citometría de Flujo.	40
Preparación de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de las células NL-20.	40
Detección y cuantificación del B[ghi]p por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (GC/MS/EI) en fracciones citoplasmáticas y nucleares de células NL-20.	42
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS PRELIMINARES	
El efecto del B[ghi]p en la viabilidad celular es independiente de la vía de AhR.	45
El B[ghi]p induce diversos efectos genotóxicos en las células NL-20.	45
RESULTADOS	
La exposición al B[ghi]p produce cambios morfológicos en las células NL-20.	48
Aumento en la formación de focos de reparación por la exposición al B[ghi]p.	49
B[ghi]p induce cambios en la expresión de los genes involucrados en la reparación del DNA.	50
Incremento de células positivas a apoptosis independiente de caspasas.	54
Incremento de la proliferación por el B[ghi]p.	57
Daño en el DNA que induce incremento de muerte celular o proliferación en un grupo pequeño de células.	59
B[ghi]p se internaliza y se mantiene en el núcleo celular.	60

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE RESULTADOS PRELIMINARES	
Efectos genotóxicos del B[ghi]p en tiempos cortos de exposición son independientes de la vía de desintoxicación de AhR	62
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
LITERATURA CITADA	75
APÉNDICE (ARTÍCULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO)	90

LISTA DE SIGLAS O ACRÓNIMOS

Siglas o acrónimo	Significado
18S	Subunidad del RNA Ribosomal
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilos
AIF	Factor inductor de apoptosis
AP	Lesiones abásicas
ATP	Adenosin trifosfato
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>)
B[gh]p	Benzo[gh]perileno
BER	Reparación de escisión de bases
CSA/CSB	Síndrome Crockayen A/B
CYP450	Enzimas de la familia de citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desóxirribonucleico
DNA-PKcs	Subunidad de la proteína cinasa S2056
DSB	Rompimientos de cadena doble (<i>Double strand breaks</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC/MS/EI	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico
γH2AX	Histona H2AX fosforilada
Global NER	Reparación de escisión de nucleótidos global
GUSB	Beta-gluconidasa
HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa
HR	Reparación de rompimientos de doble cadena por recombinación homóloga
IARC	Agencia internacional para la investigación del cáncer (<i>International Agency for Cancer Research</i>)
Mdm2	Proteína regulador negativo del supresor tumoral p53 " <i>murine doble minute 2</i> "
MMR	Reparación de desajuste de bases
Mps3	Proteína de ensamblaje del huso acromático, es una proteína de la membrana nuclear
MTT	Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MutSa/β	Proteína de reparación de desajuste de bases
NAC	N-acetil-cisteína
NER	Reparación de escisión de nucleótidos
NHEJ	Reparación de rompimientos de doble cadena por recombinación no homóloga
OGG1	DNA glicosilasa 8-oxoguanina
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PCNA	Antígeno de células proliferantes
PM ₁₀	Materia particulada con un diámetro de 10 µm
PM _{2.5}	Materia particulada con un diámetro de 2.5 µm
qPCR-RT	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SSB	Rompimientos de cadena sencilla (<i>Single strand breaks</i>)
SUN	Dominios nucleares compuestos de las proteínas Sad1 y UNC-84
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TEF	Factor equivalente de toxicidad
TP53	Proteína supresora de tumores
TP73	Proteína de la familia p53
WNT	Vía de señalización <i>Wingless integration 1</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum C</i>
XPC/XPE	<i>Xeroderma pigmentosum C/E</i>

RESUMEN

El Benzo[ghi]perileno (B[ghi]p) es el hidrocarburo aromático policíclico más abundante en la atmósfera de la Ciudad de México, el cual es un producto de la combustión incompleta de la gasolina de las emisiones vehiculares. Los estudios toxicológicos han evidenciado que el B[ghi]p puede fragmentar el DNA, oxidar la guanina y producir aductos con el DNA. Sin embargo, no se ha evaluado si dichos daños pueden ser atenuados por algunas de las vías de reparación del DNA. Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó *in vitro* en células de epitelio bronquial NL-20, el efecto citotóxico y genotóxico del B[ghi]p a una concentración 2 μ M durante 3 h y se evaluó la existencia o disminución de estos daños, después de 24 h de con medio de cultivo nuevo. Este hidrocarburo indujo vesículas citoplasmáticas desde las 3 h de exposición. Además, el B[ghi]p fue un compuesto moderadamente citotóxico por inducir muerte celular por apoptosis independiente de caspasas en el 27% de las células. Se comprobó que en presencia del antioxidante N-acetil-cisteína, dicha apoptosis disminuyó significativamente ($p < 0.05$). Asimismo, el B[ghi]p es genotóxico, ya que incrementó en casi el 50% de las células, la formación de focos de la histona H2AX fosforilada y no disminuyó con tiempo de recuperación. A la par, se incrementó la expresión de enzimas de reparación de HR, NHRJ, "Long-Patch BER" en un intervalo de 2 a 9 veces más a las 18 h de recuperación comparados con las células con sólo 3 h de exposición. Cabe señalar que se comprobó que el B[ghi]p induce principalmente daño al DNA, sin embargo, en un 10% de la población celular, el daño al DNA se vinculó a un incremento en la proliferación o a la muerte celular. Este es el primer trabajo que demuestra la internalización y permanencia del B[ghi]p, principalmente en el núcleo de las células desde las 3 h de exposición y su presencia está estrechamente relacionada al daño en el DNA.

ABSTRACT

Benzo[*ghi*]perylene is the most abundant polycyclic aromatic hydrocarbon in the atmosphere of highly polluted cities with high altitudes like Mexico City. We evaluated the *in vitro* cytotoxic and genotoxic effects that Benzo[*ghi*]perylene could induce to the bronchial cell line NL-20 after 3 hours of exposure. Furthermore, exposed cells were washed and maintained for 24 hours without the treatment (recovery time), in order to evaluate a persistent damage to the cells. We found that at 3 hours of exposure, 20 % and 47 % of the cells displayed cytoplasmic vesicles ($p < 0.05$) and γ H2AX foci in the nuclei ($p < 0.05$), respectively. Furthermore, 27% of cells showed translocation of the factor inductor apoptosis into the nuclei ($p < 0.05$) and an increase of proliferating cells was also observed (21%, $p < 0.05$). The cells after recovery time continued displaying morphological changes and γ H2AX foci, despite of the increased expression (> 2 -times fold change) of some DNA repair genes ($p < 0.05$) found before the recovery time. We also found that the cell nuclei contained Benzo[*ghi*]perylene after the exposure and it remains there after the recovery time ($p < 0.01$). Therefore, hereby we report the cytotoxic and genotoxic effects that Benzo[*ghi*]perylene is capable to induce to NL-20 cells.

INTRODUCCIÓN

Las atmósferas de las ciudades con altos índices de contaminación contienen materia particulada con diámetro de 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$), las cuales pueden servir como acarreadores de contaminantes atmosféricos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Se considera que los PAHs representan un riesgo para la salud, principalmente por su asociación con el incremento en la morbilidad y la mortalidad por enfermedades agudas y crónicas cardiopulmonares, así como por cáncer de pulmón (Salcido-Neyoy et al., 2015).

En la Ciudad de México, el Benzo[ghi]perileno (B[ghi]p) es el PAH más abundante de la atmósfera, el cual se genera principalmente por la combustión incompleta de la gasolina de los automóviles (Amador-Munoz et al., 2011). Por lo que la ruta de entrada de este hidrocarburo es principalmente por la vía respiratoria, y especialmente puede acumularse en los pulmones debido a sus características lipofílicas (Ke et al., 2018).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los PAHs producen varios cambios morfológicos como núcleos atípicos, la presencia de vesículas o vacuolas citoplasmáticas, la acumulación de gotas de lípidos-proteínas, alteraciones estructurales en la mitocondria, la dilatación del retículo endoplásmico (RE) y cambios en la estructura y dinámica de los lípidos membranales (Ali et al., 2015; Gdula-Argasinska et al., 2015; Gualtieri et al., 2009; Li et al., 2003a; Lin et al., 2015; Miguel-Pérez et al., 2013; Samara et al., 2015; Subashchandrabose et al., 2014; Zaragoza-Ojeda et al., 2016). Además, se ha demostrado que los PAHs se difunden pasivamente a través de la membrana y una vez que están contenidos en el citoplasma, éstos se metabolizan o se acumulan en organelos con alto contenido de lípidos como el RE, muy cerca del núcleo (de Gelder et al., 2018; Furuno et al., 2012; Gerde et al., 1997; Kang et al., 2010; Murphy et al., 2008; Subashchandrabose et al., 2014).

El reporte actualizado de la IARC (International Agency for Cancer Research) en el 2010, establece que el B[ghi]p no produce cáncer (IARC, 2010), sin embargo, dicha evaluación está fundamentada en los resultados de los estudios con ratones expuestos al hidrocarburo por aplicación cutánea desde hace más de 30 años (Deutsch-Wenzel et al., 1983). Cabe señalar que se registró la formación de sarcomas epidermoides en tan sólo el 11% de las ratas a las que se les aplicó vía intramuscular 4 mg de B[ghi]p, mientras que con 1 mg de B[a]p se formaron tumores en el 94% de las ratas. Sin embargo, los resultados con B[ghi]p no fueron reproducibles (Deutsch-Wenzel et al., 1983).

Se ha comprobado que el B[ghi]p es un compuesto mutagénico, tanto *in vitro* en procariontes, mediante el ensayo con *Salmonella typhimurium* acoplado a un sistema metabólico exógeno adicionando la fracción S9 de rata (Platt y Grupe 2005), como en modelos *in vivo* con el ensayo de mutaciones con roedores transgénicos “Muta™ Mouse TGR” (Long et al., 2016). Además, existen estudios que han evidenciado la citotoxicidad y genotoxicidad del B[ghi]p (Ke et al., 2018), asimismo se ha reportado que puede fragmentar el DNA (Platt et al., 2008), oxidar la guanina (Rodriguez-Romero et al. 2012), formar aductos principalmente con la guanina y la adenina (Hughes y Phillips, 1993; Labib et al. 2016; Long et al. 2016; Pan et al. 2013) e inducir focos de la histona H2AX fosforilada (γ H2AX) (Audebert et al., 2012)..

Una investigación reciente en la que se expuso a ratones al B[ghi]p por vía digestiva a través de su adición en el alimento, resaltó su propiedad principal como agente pro-inflamatorio, además de alterar procesos relacionados principalmente con la endocitosis, el transporte intracelular, el metabolismo de lípidos y aminoácidos, la proteólisis y afectar la vía de WNT (Wingless integration 1) (Labib et al., 2016).

Para iniciar el estudio y comprensión del efecto del B[ghi]p en un modelo *in vitro* de células bronquiales humanas, un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio por

Zaragoza-Ojeda y colaboradores (2016), reveló que las células NL-20 expuestas a tres distintas concentraciones del B[ghi]p (1 μ M, 2 μ M y 4.4 μ M) durante 48 h fue citotóxico, induciendo estrés oxidante en las células, formación de vesículas citoplasmáticas y la activación del receptor AhR. Sin embargo, no se conocen sus efectos citotóxicos y genotóxicos durante una exposición aguda *in vitro* en este sistema.

En el presente trabajo se encontró que el B[ghi]p es citotóxico, genotóxico y que permanece en el núcleo a pesar del incremento en la expresión de enzimas de reparación durante el tiempo de recuperación. El daño al DNA no disminuye en presencia del inhibidor de especies reactivas de oxígeno (ROS) y precursor del glutatión, la N-acetilcisteína (NAC) mientras que si se observó con la apoptosis.

ANTECEDENTES

Emisión, dispersión y persistencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en el ambiente

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos orgánicos de carbono e hidrógeno con al menos dos anillos de benceno fusionados. Estos compuestos se producen durante la manufactura del aluminio y del acero; asimismo, por la combustión incompleta de la quema de biomasa, de la basura, del carbón, de la madera, del aceite y principalmente de combustibles como el diésel y la gasolina. Las motonetas, las aeronaves y la agricultura también contribuyen a la producción de los PAHs. Por lo que las fuentes emisoras de los PAHs se pueden dividir principalmente en: residenciales, de transporte, industriales, provenientes de la agricultura y de fuentes naturales (Abbas et al., 2018; Armstrong et al., 2004).

Normalmente los PAHs se distribuyen y persisten como mezclas complejas en el aire, en cuerpos de agua y en la tierra (Mumtaz et al., 1996). Cabe destacar que la atmósfera es el medio más importante de dispersión de los PAHs (Figura 1), debido a que se emiten a ella una gran cantidad de éstos ya sea por incendios forestales, erupciones volcánicas o por actividades antropogénicas (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

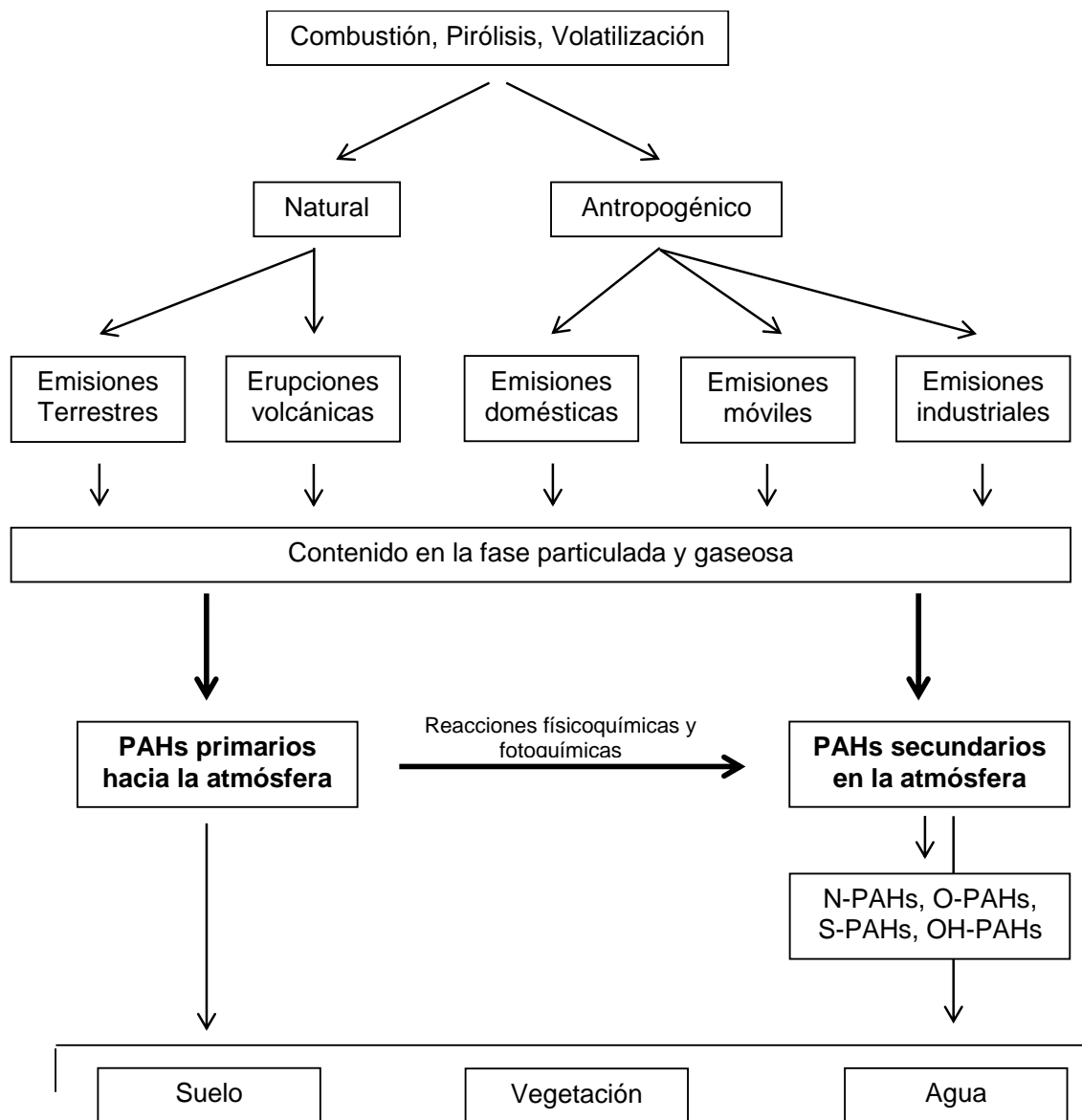



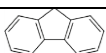
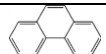
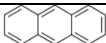
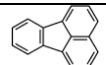
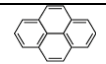
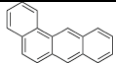


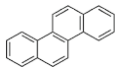
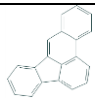
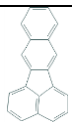
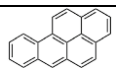
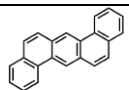

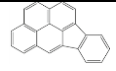
Figura 1. Ciclo de vida de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y sus derivados en la atmósfera: N-PAHs (nitrados), O-PAHs (oxigenados), S-PAHs (heterocíclicos sulfurados) y OH-PAHs (hidroxilados) (Abbas et al., 2018).

Al ser compuestos lipofílicos, se acumulan fácilmente en el ambiente, recorren grandes distancias y se degradan con dificultad. Son poco solubles en agua y cada anillo bencénico que tienen en su estructura disminuye su solubilidad (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). A pesar de los esfuerzos por disminuir la emisión global de los PAHs hacia el ambiente, sólo se han disminuido casi 100,000 toneladas de las 592,000 que se emiten. Y es tal el alcance que tienen que hasta en regiones lejanas como el Ártico se han registrado (Ma et al., 2019).

A partir del estudio realizado en 1995 por la Agencia para el registro de las sustancias tóxicas y de enfermedades (ATSDR), se priorizó el estudio toxicológico sobre 17 PAHs (Tabla 1), debido a que son los de mayor concentración y los de mayor persistencia en las muestras de agua que se analizaron (Mumtaz et al., 1996).

Tabla 1. Propiedades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos principales (PAHs) clasificados por la USEPA (Dat y Chang, 2017).

Nombre PAH	Número de anillos	Peso molecular	Presión de vapor (Pa, 25°C)	Solubilidad en agua (mg/L)	TEF	Estructura
Naftaleno	2	128	11.14	31	0.001	
Acenaftileno	3	154	3.87	16	0.001	
Acenafteno	3	152	3.07	38	0.001	
Fluoreno	3	166	1.66	1.9	0.001	
Fenantreno	3	178	1.6×10^{-1}	1.1	0.001	
Antraceno	3	178	8.6×10^{-4}	0.045	0.01	
Fluoranteno	4	202	8.61×10^{-4}	0.26	0.001	
Pireno	4	202	5×10^{-5}	0.013	0.001	
Benzo[a]antraceno	4	228	5.43×10^{-5}	0.011	0.1	

Criseno	4	228	4×10^{-6}	0.0002	0.01	
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	5	252	5×10^{-7}	0.0015	0.1	
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	5	252	5.2×10^{-8}	0.008	0.1	
Benzo[<i>a</i>]pireno	5	252	6×10^{-8}	0.0038	1	
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno	5	278	1.33×10^{-8}	0.0006	1	
Benzo[<i>ghi</i>]perileno	6	276	1.27×10^{-7}	0.00026	0.01	
Indeno[1,2,3- <i>c,d</i>]pireno	6	276	1.38×10^{-8}	0.0019	0.1	

*TEF Factor equivalente de toxicidad, efecto estimado carcinogénico de mezclas PAH.

Debido a que estos análisis evidenciaron que existía mayor probabilidad de exposición a estos PAHs, aumentaron las investigaciones sobre sus efectos en la salud humana. Dentro de esta lista, el B[*ghi*]p se detectó en todas las muestras.

Se ha observado que los PAHs que tienen de 4 a 6 anillos bencénicos son más resistentes a degradarse en el ambiente, por lo que la exposición a ellos es mayor. Un ejemplo de ello es el B[*ghi*]p, un PAH con peso molecular alto conformado por 6 anillos bencénicos, el cual tarda en degradarse mediante el uso de enzimas de levaduras hasta un periodo de 7 a 42 días (Das, 2017; Hesham et al., 2006).

Debido a que el B[*ghi*]p se produce principalmente por la combustión incompleta de la gasolina, en grandes ciudades con alto tránsito vehicular como la Ciudad de México, es uno de los PAHs más abundante de su atmósfera sobre todo en las fases particuladas PM₁₀ y PM_{2.5} (Amador-Munoz et al., 2011; 2013).

Vías de exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Debido a que los PAHs son contaminantes ubicuos del ambiente, la exposición a ellos principalmente es por ingesta, inhalación y por contacto dérmico. La población en general está expuesta principalmente a los PAHs por ingesta de alimentos contaminados, por la inhalación de aire contaminado, por fumar o respirar el humo que los contiene (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

La ingesta de alimentos contaminados, implica en cantidad, un mayor ingreso de PAHs, seguida por la vía inhalatoria. Por ejemplo, el consumo del B[a]p en alimentos se ha registrado en un intervalo de 2 a 500 ng/día, mientras que por inhalación va de 10 a 50 ng/día (Ramesh et al., 2004). De acuerdo al cálculo que realizan Menzie y colaboradores en 1992 con base en los niveles de PAHs registrados en diversas publicaciones y a la velocidad de respiración promedio de un individuo de 20 m³/día, aproximadamente se consumen 3 µg/día de PAHs por inhalación y en fumadores hasta 15 µg/día (Menzie et al., 1992). Dicha exposición aumenta por vía inhalatoria en las poblaciones laboralmente expuestas (Gao et al., 2018).

Las trabajos que se han hecho en modelos experimentales con roedores, han demostrado que la absorción de los PAHs ocurre rápido y 3 h después de la inhalación, se han metabolizado y están distribuidos hasta el tracto gastrointestinal (Mumtaz et al., 1996). La asociación a partículas es otro factor que influye en la absorción de los PAHs en los pulmones y en su distribución sistémica. Estudios enfocados al B[a]p han demostrado que la exposición a los cristales puros de este PAH, son removidos el 50% del pulmón en 1.5 h y más del 95% fue desechado en 24 h, mientras que cuando el B[a]p está adherido a pequeñas partículas de carbón, apenas el 50% del B[a]p se logra desechar después de 36 h y su excreción total tarda de 4 a 5 días (Mumtaz et al., 1996).

Otra vía importante es por contacto con la piel, en la cual los PAHs pueden difundirse hacia la circulación subcutánea (Ruby et al., 2016). Recientes investigaciones han demostrado que altos niveles de PAHs dañan la epidermis, especialmente a las capas superiores del epitelio y a los fibroblastos dérmicos que la componen. Lo que se ha relacionado con patologías como dermatitis, eczema e incluso desordenes autoinmunes (Qiao et al., 2017).

Además, diversos estudios han demostrado que la exposición prolongada a la PM del ambiente tiene efectos adversos que incluye el daño por estrés oxidante, diabetes, inflamación, infertilidad y está relacionada a una mayor incidencia de enfermedades respiratorias obstructivas crónicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e incluso cáncer pulmonar (Abdel-Shafy y Mansour, 2016; Gao et al., 2018; Luben et al., 2010; Martinelli et al., 2013).

Potencial genotóxico de los PAHs en función de la estructura química

Formación de aductos

La reactividad de los PAHs hacia biomoléculas como el DNA, está estrechamente ligada al número y conformación de los anillos bencénicos que crean una cierta estructura. Por lo que pequeños cambios en la estructura química, implican respuestas toxicológicas distintas (Ewa y Danuta, 2017).

Sin embargo, un evento esencial para convertir a los PAHs en compuestos con sitios nucleofílicos, implica la modificación de su estructura por el metabolismo celular. La participación de enzimas como los citocromos P450 (CYP450) es necesaria para la formación de dichos metabolitos, ya que por sí mismos, no son directamente mutagénicos. Normalmente, los PAHs que tienen regiones con condensaciones angulares de tres anillos bencénicos, regiones bahía, como el B[a]p o de cuatro anillos bencénicos

que generan las regiones golfo, como el Dibenzo[*a,h*]pireno, son PAHs considerados como compuestos pro-carcinogénicos, los cuales al ser modificados enzimáticamente producen metabolitos electrofílicos (diol-epóxidos), que se unen covalentemente a las proteínas y al DNA formando aductos (Kropachev et al., 2013). Además, se sabe, que la distribución de las cargas y la reactividad en ciertas posiciones de los PAHs, están influidas por las distorsiones geométricas que tengan en su estructura. Es decir, mientras que los PAHs con región bahía son planos y se unen preferentemente a la guanina, los de región golfo no lo son y se unen a la adenina (Ewa y Danuta, 2017).

No obstante, los PAHs como el B[*ghi*]p que carece de estas regiones, pero tiene zonas conocidas como regiones K, pueden ser también oxidadas por las CYPs y formar metabolitos reactivos. De acuerdo a recientes estudios, el B[*ghi*]p produce dos metabolitos, el 3,4-epóxido B[*ghi*]p y el 3, 4, 11, 12 biepóxido B[*ghi*]p (Figura 2), ambos capaces de formar aductos con la guanina y la adenina (Pan et al., 2013).

El 3,4-epóxido B[*ghi*]p parece ser un metabolito menos estable, pero es capaz de unirse a la desoxiadenosina en las posiciones del nitrógeno 6 y 7 (Figura 3a y b, respectivamente) y a la desoxiguanosina en la posición del nitrógeno 2, mientras que el 3,4,11,12 biepóxido B[*ghi*]p forma principalmente aductos con la desoxiguanosina (Figura 3c). Cabe mencionar que la velocidad para generar aductos por el B[*ghi*]p es 5 veces menor comparada con la del carcinogénico B[*a*]p.

A pesar de que la generación de aductos no es suficiente para la producción de tumores, tiene una relación estrecha con las primeras etapas de la carcinogénesis (Poirier, 2016).

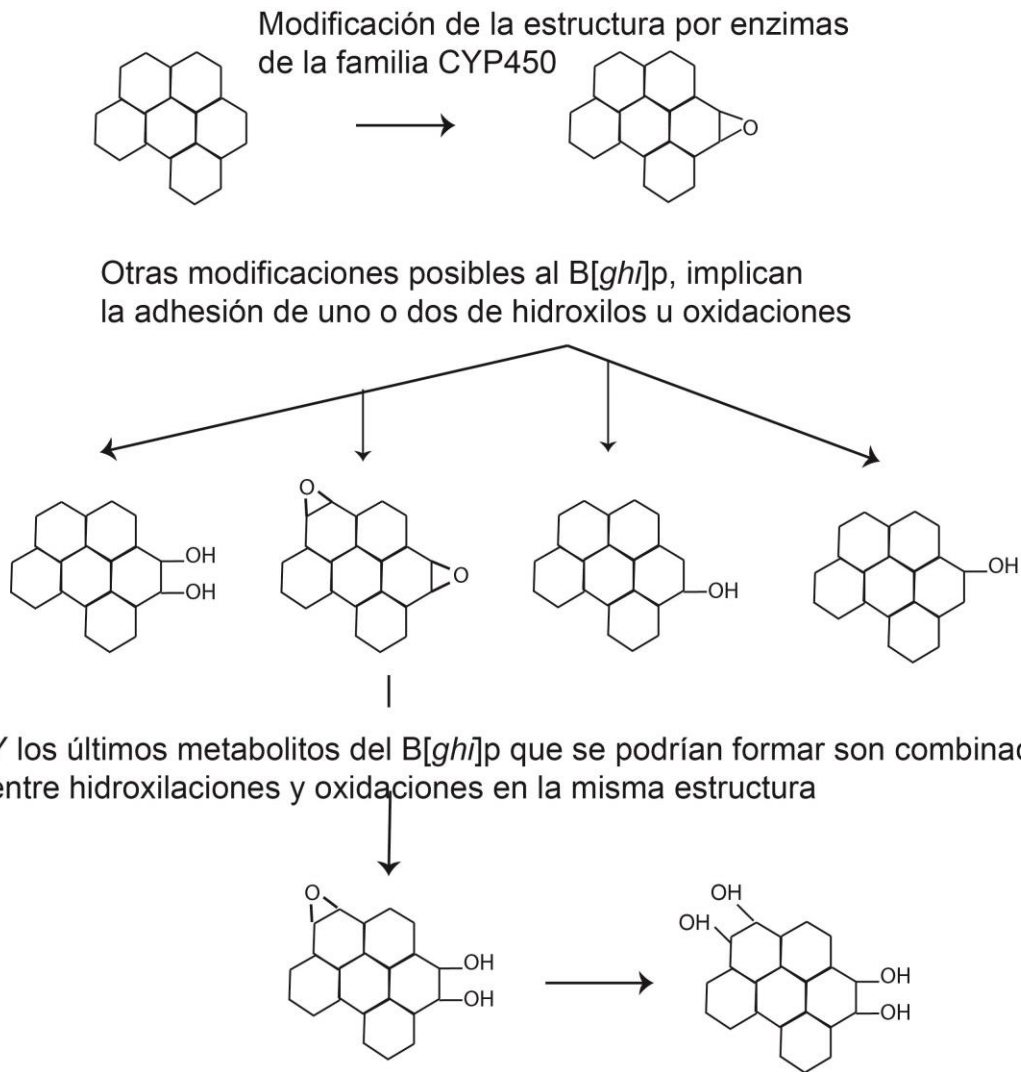


Figura 2. Biotransformación enzimática del B[ghi]p por citocromos P450 y por la epóxido hidrolasa microsomal. Modificado de propuesta por Pan y colaboradores (2013).

También, se ha demostrado que algunos PAHs inhiben las comunicaciones intracelulares, aun cuando no se ha activado el metabolismo celular y no han sufrido ninguna modificación, siendo los carcinogénicos los más potentes en provocar este efecto (Sharovskaya et al., 2006).

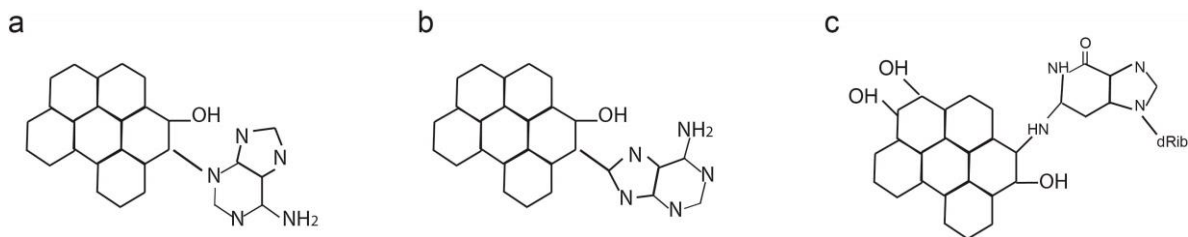


Figura 3. Aduetos probables formados por el B[ghi]p y la adenina a) en la posición del nitrógeno 6; b) en la posición del nitrógeno 7; y con la guanina c) en la posición del nitrógeno 2 propuestos por Pan y colaboradores (2013).

Oxidación de las bases

Como parte del metabolismo de los PAHs por los CYP450 y las aldo-ceto reductasas, se favorece la producción excesiva de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^\cdot). Dichos ROS pueden interactuar principalmente con la guanina y generar estrés oxidante al DNA, como la lesión 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG). Esta lesión al no ser reparada, puede provocar la transversión de G:C a T:C y convertirse en una mutación (Quinn et al., 2008). Asimismo, se ha asociado a los PAHs con el incremento de la peroxidación de los lípidos, la cual puede inhibir o alterar funciones enzimáticas (Abbas et al., 2018).

Fragmentación del DNA

Los rompimientos de cadena sencilla (SSB) y doble (DSB) son daños genotóxicos de los cuales los DSB son los más severos para la integridad del DNA. Los DSB ocurren cuando las dos hebras del DNA se rompen simultáneamente en zonas muy próximas y se desnaturalizan. Dichos rompimientos pueden darse por la presencia de aductos voluminosos “bulky”, por las especies reactivas de oxígeno o por la alquilación en la posición N-7 de la guanina (Tung et al., 2014). Si no se lleva a cabo la reparación de los daños, las células inician procesos de muerte celular, mutagénesis y carcinogénesis.

Diversos trabajos han demostrado el potencial que tienen los PAHs para inducir los DSB de acuerdo a la estructura que poseen. La activación de las enzimas del metabolismo como CYP450, hidrolasas epóxidas, aldo-ceto reductasas, oxidasas NADPH, entre otras, incrementa la producción de ROS y la formación de metabolitos reactivos como las quinonas que inducen más DSB (Gurbani et al., 2013; Uribe-Hernandez et al., 2019).

Después de la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos, el incremento de ROS como el oxígeno singulete o el superóxido pueden generar lesiones abásicas (AP) y éstas a su vez, provocar indirectamente DSB. Al exponer fibroblastos de pulmón de criceto chino V79 a distintos hidrocarburos, entre ellos el B[ghi]p, se evidenció que puede fragmentar al DNA y es similar el resultado en presencia de metabolismo exógeno. Sin embargo, el B[ghi]p indujo menos fragmentación que el B[a]p (Platt et al., 2008).

En cambio, en el estudio de Rodríguez-Romero y colaboradores, (2012), los linfocitos periféricos humanos fueron más sensibles al daño por el B[ghi]p y el incremento de éste fue drástico con activación metabólica. No obstante, para alcanzar el 100% del daño que genera el B[a]p en este modelo, se tuvo que agregar tres veces más del B[ghi]p (Rodríguez-Romero et al., 2012).

Cabe señalar que, actualmente se están utilizando otros marcadores de genotoxicidad como la fosforilación de las histonas H2AX (Ser139) y la H3 (Ser10), ya que permiten detectar el daño global al DNA generado por aductos, lesiones oxidatantes y DSB (Audebert et al., 2012; Wang et al., 2017). Existen evidencias *in vitro* en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular HEPG2, adenocarcinoma de pulmón A549, células de colon LS-174T y en adenocarcinoma renal ACHN, que han demostrado que los PAHs pueden incrementar dichas fosforilaciones (Audebert et al., 2012; Khoury et al., 2015; Mattsson et al., 2008).

Activación de las vías de reparación del DNA por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos

Reparación de aductos por enzimas de reparación por escisión de nucleótidos (NER)

Las enzimas de reparación por escisión de nucleótidos (NER) pertenecen a un mecanismo versátil, en el que se reconocen y se remueven entre 24 y 32 nucleótidos que contienen el aducto conocido como “*bulky*”. Cuando los aductos distorsionan la hélice del DNA, estas lesiones son fáciles de detectar y reparar para las NER. Sin embargo, cuando el aducto no interrumpe las interacciones de Watson-Crick, es decir queda dentro de las dos cadenas del DNA sin distorsionarlo, son más difíciles de detectar y por lo tanto de reparar (Kropachev et al., 2013).

Para mantener la integridad del genoma, la reparación de aductos se lleva a cabo por dos vías principales de NER, la reparación de escisión de nucleótidos global (Global NER) y la reparación acoplada a la transcripción (TCR). La primera involucra la participación de 30 proteínas incluyendo las proteínas XPE y XPC (*Xeroderma pigmentosum*). El reconocimiento del daño se lleva a cabo por un complejo conocido como XPC/hHR23B, el cual se une a las bases dañadas, distorsiona el DNA e impide el emparejamiento de las bases. Posteriormente, las demás proteínas de la NER remueven aproximadamente de 30-35 bases donde están los daños; por último se sintetiza y se liga un nuevo fragmento de DNA (Sugasawa, 2011). A través de la reparación NER global, después de un rastreo genómico y reconocimiento del daño por el complejo heterodímero XPC, se eliminan modificaciones tanto de la hebra que no se transcribe como de regiones no codificantes (Henkler et al., 2012).

Mientras que en la TCR, los daños sólo son reconocidos en la hebra que se transcribe por la RNA polimerasa II, por lo que sólo funciona en regiones específicas del genoma. La TCR requiere también de las proteínas XP exceptuando a la XPC. En esta vía es

necesaria la activación de las proteínas CSA y CSB (Síndrome Cockayne). En el paso de la elongación, la RNA polimerasa detecta al aducto y provoca que el complejo de la transcripción quede bloqueado en este sitio. Entonces, las proteínas CSA, CSB y XPA remueven el aducto y reparan la unidad de transcripción del gen (Hsu et al., 2005). Dependiendo del aducto (Figura 4), la reparación se lleva a cabo por NER, TCR o ambos sistemas, como se comprobó con los distintos aductos formados por el B[a]p, (Nadkarni et al., 2016).

Debido a que la eficiencia de reparación está determinada en gran parte por la zona en la que se une covalentemente el PAH a las bases nitrogenadas, se ha comprobado que los aductos formados por ejemplo entre la región bahía del B[a]p y el nitrógeno seis de la adenina (B[a]p-N⁶-dA) son reparados en su totalidad, mientras que los aductos inducidos con la misma base pero con la región golfo del Benzo[c]fenantreno (B[c]ph) son reparados con menor eficiencia (Buterin et al., 2000). Además se ha demostrado que los PAHs con región golfo generalmente constituyen aductos con N⁶-dA, los cuales generan transversiones de adenina a timina. Para que se fijen estas mutaciones es necesario que la maquinaria de reparación no las detecte y que las células continúen dividiéndose aún con el daño (Henkler et al., 2012).

Se ha comprobado que cambios sutiles en la estereoquímica de los aductos también repercute en la reparación de éstos, como se ha comprobado con los aductos producidos entre Dibenzo[a,h]pireno y el N⁶-dA y el Dibenzo[a,h]pireno con el N²-dG. Mientras el formado con la adenina se repara, el de la guanina persiste (Kropachev et al., 2013). Esta permanencia se ha vinculado a un mayor potencial carcinogénico (Buterin et al., 2000).

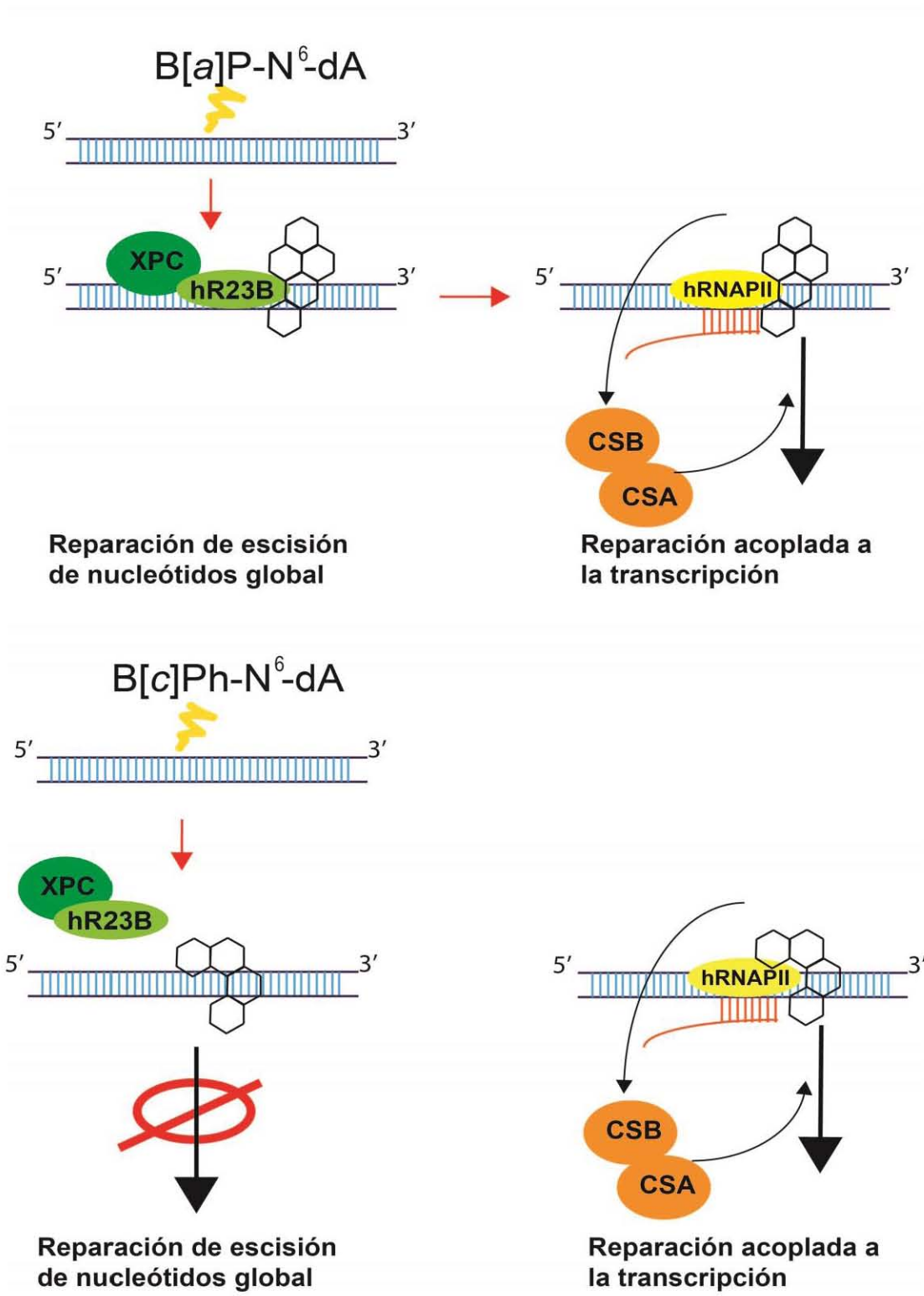


Figura 4. Reparación de aductos formados por el Benzo[a]pireno (B[a]P) y el Benzo[c]fenantreno (B[c]Ph) con el nitrógeno seis de la adenina (N⁶-dA) por escisión de nucleótidos global y por reparación acoplada a la transcripción. Figura modificada de Nadkarni et al., 2016.

Se ha reportado que el potencial del B[ghi]p para generar metabolitos y aductos es tres veces más lento comparado con el B[a]p (Pan et al. 2013; Platt et al., 2008). Existen trabajos con modelos animales expuestos a B[ghi]p en los que se ha comprobado la formación de aductos por este PAH y su persistencia hasta 12 semanas después del tratamiento (Hughes y Phillips, 1993; Labib et al. 2016).

Los aductos inducidos por los PAHs pueden crear mutaciones en proto-oncogenes, especialmente en miembros de la familia *Ras* (N-, H-, K-*Ras*) en el codón 12, asimismo en el gen supresor de tumores *p53*, en el codon 249G a T (Henkler et al., 2012).

Los aductos son modificaciones covalentes que provocan inestabilidad en las bases y como consecuencia sitios abásicos (AP), ya sea por el proceso de remoción de las bases en la reparación o porque los aductos son lábiles. Por ello, las enzimas de reparación de escisión de bases (BER) y las proteínas de desajuste de bases “Mismatch repair” (MMR) pueden activarse ante dichos daños (Braithwaite et al., 1998).

Reparación de las bases nitrogenadas por enzimas de reparación de escisión de bases (BER)

Se ha estimado que el estrés oxidante promueve 10,000 alteraciones por célula al día, lo que representa el mayor daño endógeno para el DNA. El estrés oxidante puede generar diversas alteraciones en el DNA, tales como daño en las bases, en el residuo de azúcar, sitios abásicos, rompimientos de cadena sencilla o doble, problemas en las horquillas de replicación, generar estrés en la replicación, obstrucción mecánica de la progresión de las RNA polimerasas y agrupaciones de lesiones del DNA, entre otros (Yan, et al., 2014).

Cuando ocurren pequeños daños en las bases como la oxidación, la metilación, la despurinización (rompimiento entre el azúcar y la base) y la desaminación (pérdida del

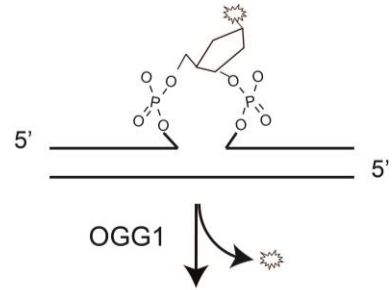
grupo NH₂), las glicosilasas las reconocen, las remueven y el sitio apurínico debe procesarse posteriormente por una endonucleasa AP (Desler et al., 2009).

Una vez que la base se ha removido, las DNA polimerasas como la delta (δ), beta (β), lambda (λ) o gama (γ) insertan la base correcta. Este tipo de oxidación parece no bloquear la replicación del DNA, por lo que es una de las modificaciones que se repara relativamente rápido, aunque puede generar un proceso inflamatorio. No obstante, si no se reparan, pueden generar inestabilidad genómica y disfunción de la mitocondria (Iwai et al., 2000; Svilar et al., 2011). La reparación de escisión de bases se puede llevar a cabo por glicosilasas bifuncionales (Figura 5) o monofuncionales (Figura 6).

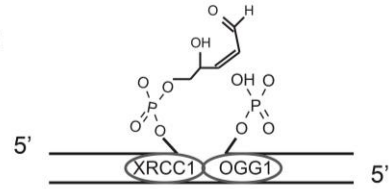
Se sabe que los PAHs propician la producción excesiva de ROS y como consecuencia, la oxidación de las bases. Estas lesiones son reparadas eficientemente por las enzimas de escisión de bases principalmente por la OGG1. Además, se ha encontrado que XPC y XPA también participan en la reparación en una vía independiente de la NER (Braithwaite et al., 1998; Desler et al., 2009; Risom et al., 2003; Tsurudome et al., 1999).

La evaluación de las oxidaciones u otras lesiones de las bases, deben considerarse más allá de un daño puntual, ya que en el proceso de la reparación de éstas, el DNA es más susceptible a otros efectos como los rompimientos de cadena sencilla (Figura 7). Los SSB al no ser reparados eficientemente por las BER, se bloquea la transcripción del DNA, se generan rompimientos de doble cadena y se provoca incluso la apoptosis (Roos y Kaina, 2013).

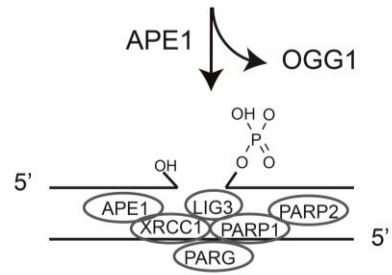
Oxidación de una base



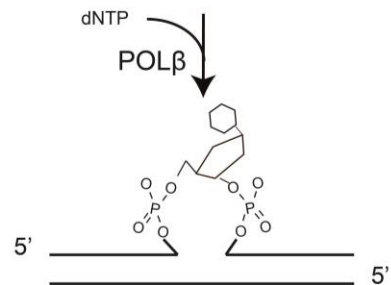
Reconocimiento del daño y escisión



Reparación del hueco en el DNA



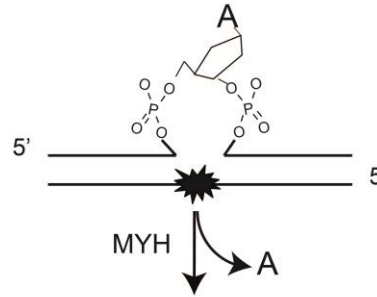
Síntesis del DNA y ligación



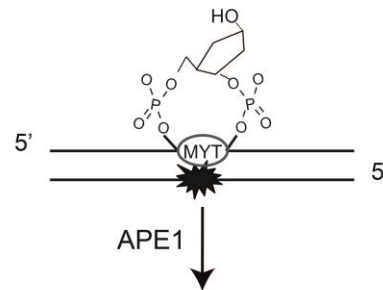
Hebra reparada de DNA

Figura 5. Vía de reparación por escisión de bases (vía β -eliminación) por glicosilasas bifuncionales. Reparación de una base oxidada. Figura modificada de Svilar y colaboradores (2011).

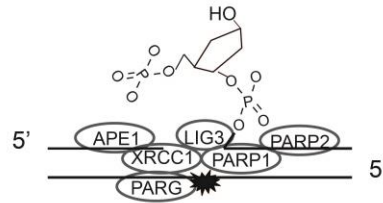
Oxidación en una base de la cadena complementaria



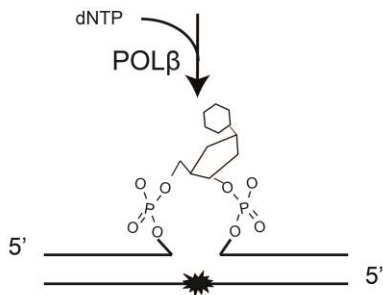
Daño detectado y escisión



Reparación del hueco en el DNA



Síntesis del DNA y ligación



Hebra reparada de DNA

Figura 6. Vía de reparación por escisión de bases por glicosilasas monofuncionales. Reparación de la adenosina cuando existe en la hebra complementaria una base oxidada. Figura modificada de Svilar y colaboradores (2011).

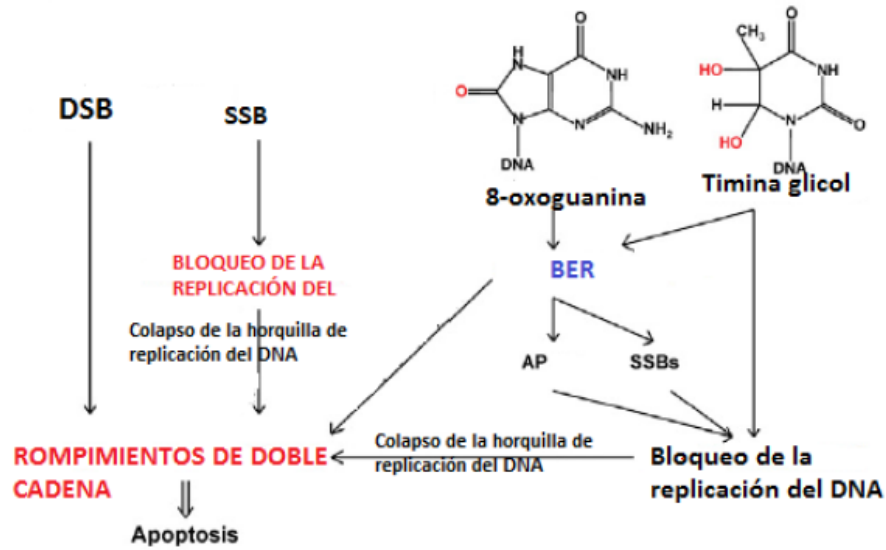


Figura 7. Posibles efectos en la reparación por escisión de bases oxidadas como la 8-oxo-7,8-dihidro-guanina (8-oxodG) y la 5,6-dihidroxi-5,6-dihidro-timina (Timina glicol). Figura modificada de Roos y Kaina (2013).

Reparación de rompimientos de doble cadena por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ)

Los DSB promueven re-arreglos genómicos como la compactación de la cromatina en ciertas zonas y el movimiento del DNA por el núcleo para su reparación mediante dos vías, la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ). La HR es dependiente de las fases S y G2 del ciclo celular y requiere la hebra homóloga para reparar (Figura 8), mientras que la NHEJ puede ocurrir en cualquier fase, aunque predomina en las células en G0/G1 y es más rápida porque sólo liga directamente los extremos, pero genera más errores en los fragmentos reparados (Figura 9) (Marnef y Legube, 2017).

La fosforilación de la histona H2AX en Ser139 por la cinasa ATM, es uno de los primeros eventos que ocurren alrededor del sitio del rompimiento del DNA. Cubren de 1-2 Mb para formar los focos de reparación como estrategia para mantener la integridad del genoma y

promover la incorporación eficiente de los factores de reparación a la estructura de la cromatina abierta (Mattsson et al. 2009).

En la reparación NHEJ, el heterodimero Ku70/Ku80 tiene alta afinidad al DNA, por lo que se une a los extremos de éste. Posteriormente, este complejo incorpora la subunidad catalítica de la proteína cinasa DNA-PKcs (DNA Damage Kinases phospho S2056), lo que promueve la fosforilación de otras proteínas como XRCC4. Esta última estabiliza la ligasa IV para la unión de las hebras (Mladenov y Iliakis, 2011).

Parece que cuando los DSB no pueden repararse, son dirigidos hacia los poros nucleares en los dominios SUN de la proteína Mps3, en la periferia de la membrana nuclear. Mantener los DSB en la periferia permite coordinar las señales entre el núcleo y el citoplasma, para activar procesos de respuesta ante el daño como la apoptosis (Marnef y Legube, 2017).

El momento y la región donde ocurren los DSB, son otros aspectos que determinarán si se activa la reparación por RH o por NHEJ. Sin embargo, se ha observado que los DSB en secuencias altamente repetidas como la heterocromatina, se reparan por HR independiente del ciclo celular, mientras que la reparación de los DSB de la eucromatina, está restringida a zonas transcripcionalmente activas enriquecidas con la trimetilación de la lisina 36 de la histona 3, la H3K36 (van Sluis y McStay, 2015).

Existen varios trabajos en los que se ha evidenciado que la exposición a PAHs genera incremento de DSB y con ello, el aumento de fosforilación de la H2AX y las enzimas de reparación de ambas vías, predominando la vía por NHEJ. Sin embargo, la reparación por NHEJ como se ha dicho, puede propiciar más errores y contribuir a la toxicidad de los PAHs (Audebert et al., 2012; Rossner et al., 2014; Toyooka et al., 2004; Tung et al., 2014; Yan et al., 2011).

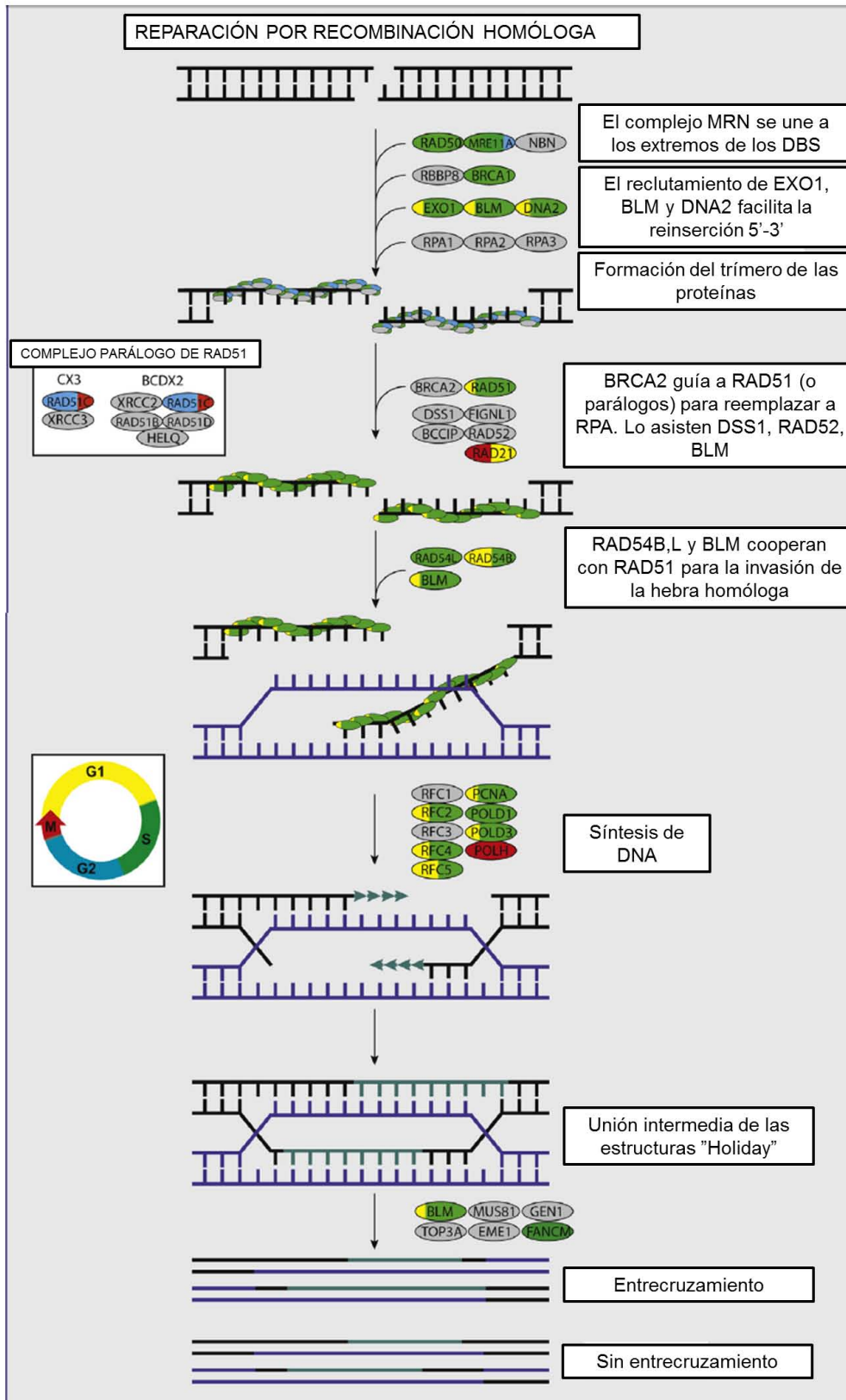


Figura 8. Genes regulados por el ciclo celular en la vía de reparación por Recombinación Homóloga (HR). Modificado de Mjelle y colaboradores (2015).

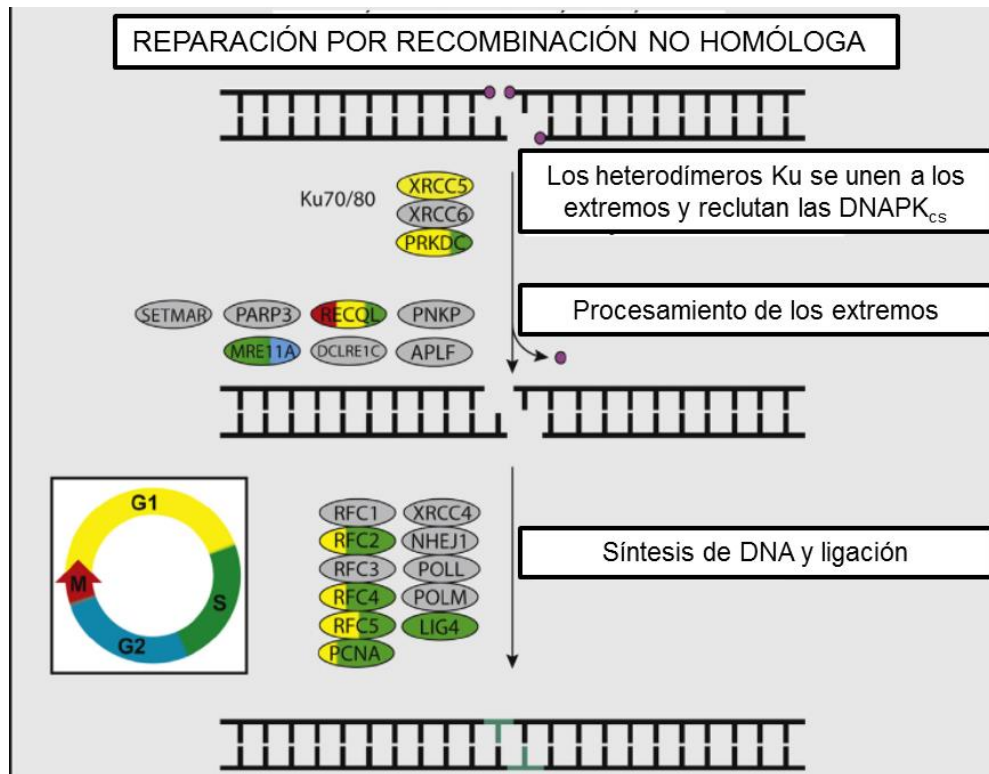


Figura 9. Genes regulados por el ciclo celular en la vía de reparación por Recombinación No Homóloga (HR). Modificado de Mjelle y colaboradores (2015).

Asimismo, como se ha mencionado, la estructura del PAH determina su poder genotóxico. Se ha comprobado que los metabolitos diol epóxidos de los PAHs con región golfo provocaron la formación de focos de reparación más persistentes que los epóxidos de los PAHs con región bahía. Parece que la severidad del daño que provocan los PAH con región golfo mantiene por más tiempo y en mayor número los focos de reparación, lo que mantiene por más tiempo la estabilización de p53, mayores niveles de la γ H2AX y de Mdm2 en las células de carcinoma de epitelio bronquial A549 (Mattsson et al., 2008). Estudiar la formación de estos focos de reparación y el tiempo de persistencia de éstos en las células expuestas al B[ghi]p, podría indicar la severidad de los DSB generados por este PAH.

Reparación de desajuste de bases (MMR)

En menor medida, los aductos pueden ser removidos por las enzimas de reparación de desajuste de bases (MMR). Ante un daño al DNA, el heterodímero dimérico MutS α (cuando el desajuste de bases es de una base o de 1-2 lazos "loops" de nucleótidos) o MutS β (para *loops* más grandes) reclutan MutL α hacia el DNA. A su vez, el complejo MutS/MutL α sufre un cambio conformacional inducido por ATP y promueve que migre hacia la hebra rezagada o que MutL α haga un hueco. Posteriormente, se recluta a PCNA y a la exonucleasa 1 para remover el aducto. Por último las polimerasas delta1 o 3 sintetizan un nuevo segmento que es ligado por ligasa 1 (Fig 10). Sin embargo, cuando un aducto es detectado por las proteínas de MMR, estas permanecen unidas al aducto con lo que se afecta la actividad de reparación de otras proteínas y desencadena la señalización hacia apoptosis dependiente de TP53 y TP73 (Henkler et al., 2012).

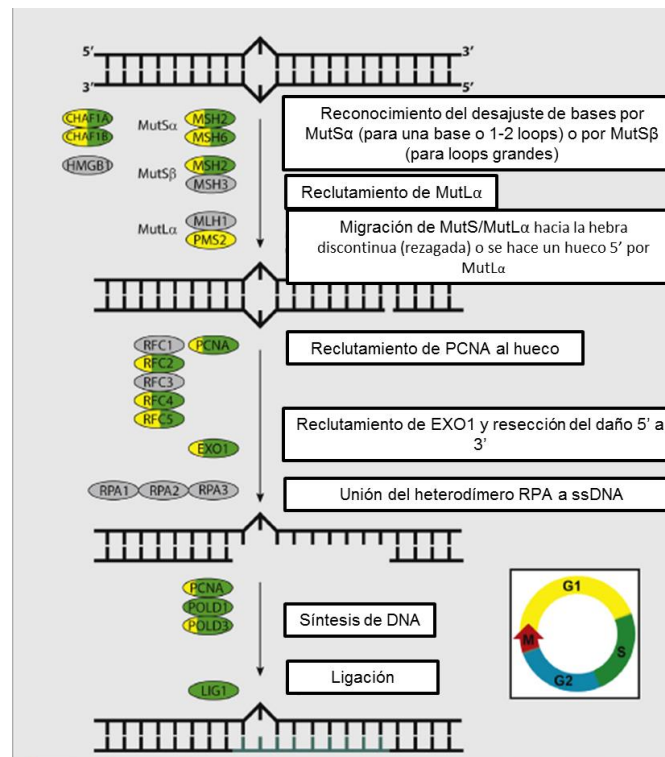


Figura 10. Genes regulados por el ciclo celular en la vía de reparación por desajuste de bases (MMR). Tomado de Mjelle et al., 2015.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el B[ghi]p genera daños a la molécula de DNA y cambios en la morfología celular, sin embargo, se desconoce si existe una reparación de éstos. El B[ghi]p es el hidrocarburo aromático policíclico más abundante en la atmosfera de la CDMX por lo tanto, es importante evaluar si se reparan los daños producidos por la exposición de éste en las células bronquiales.

HIPÓTESIS

El daño generado al DNA de células bronquiales será reparado por alguna de las vías de reparación celular, por lo que la expresión de los genes involucrados en éstas será diferencial.

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del B[ghi]p en las células de epitelio bronquial y su posible reversibilidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el tiempo de exposición del B[ghi]p que induce citotoxicidad y daño en el DNA en las células NL-20.
- Evaluar los cambios morfológicos y su posible reversibilidad en las células de epitelio bronquial humano NL-20 por exposición al B[ghi]p.
- Analizar la expresión de genes que participan en las vías de reparación del DNA por escisión de nucleótidos o bases, reparación por recombinación homóloga y no homóloga y desajuste de bases del DNA por la exposición al B[ghi]p en células NL-20.
- Evaluar la proporción del B[ghi]p que se internaliza en las células y su posible permanencia después de 24 h de su exposición.

METODOLOGÍA

Cultivo de las células NL-20

La línea celular NL-20 se obtuvo de la ATCC (CRL-2503). Son células epiteliales de bronquio humano, inmortalizadas a partir de bronquios normales (no tumorales). Estas células se sembraron en medio de cultivo HAM-F12 suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% 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. Ya que son células adherentes éstas se despegan de la superficie de cultivo incubando con una solución de tripsina 0.05% y verseno 0.01%, durante 10 minutos a 37°C, una vez que se despegaron, se centrifugaron a 1300 rpm (125 x g) por 8 minutos. Se contaron en un hemocitómetro para realizar los siguientes ensayos de exposición al B[ghi]p.

Esquema de exposición al B[ghi]p preliminar

Para determinar el tiempo de exposición definitivo con el cual se analizaría el efecto del B[ghi]p para el desarrollo del tema principal del Doctorado, al principio, se trabajó con dos tiempos de exposición de 6 h y 24 h (resultados y discusión presentados como preliminares). En estos tiempos se evaluó: la viabilidad, la fragmentación del DNA, la inducción de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) y la apoptosis. Además, como se conoce que los PAHs pueden inducir daño a las células mediante la interacción con el receptor AhR, se decidió hacer los ensayos en presencia del inhibidor de éste, el compuesto CH223191.

Las células NL-20 fueron expuestas dentro del esquema experimental: testigo (0.1 % DMSO); 2 µM de B[ghi]p; y finalmente en presencia de 2 µM B[ghi]p más 10 µM de

CH223191. Las células fueron expuestas por 6 h y por 24 h. Todos los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes.

Ensayo de viabilidad MTT de tiempos de exposición preliminares

Se sembraron 1.5×10^4 células por pozo 24 h previas al experimento en placas de 96 pozos. Se expusieron por triplicado a las distintas condiciones experimentales antes mencionadas y 3 h antes de que terminará el tiempo de exposición, se agregó a cada pozo 20 μL de MTT a una concentración de 5 mg/mL (en PBS). Una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio con mucho cuidado para agregar a cada pozo 100 μL de isopropanol ácido durante 5 min en oscuridad. Se cuantificó la cantidad de color en un lector de placas de ELISA 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. El porcentaje de MTT reducido se calculó con base a la absorbancia obtenida del testigo-vehículo sin exposición que se consideró como 100% de viabilidad.

Electroforesis unicelular (Single Cell Gel Electrophoresis) de tiempos de exposición preliminares

Una vez expuestas las células en los dos tiempos, las células se despegaron con tripsina 0.025% en la incubadora a 37 °C por 10 min. Para concentrar el botón celular, se centrifugó el despegado a 1400 rpm (145 x g) por 5 min. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 100 μL de medio de cultivo HAM-F12 complementado, de los cuales se tomaron 50 μL y se mezclaron con 90 μL de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (0.5 g en 100 mL de PBS) a 38 °C. Previamente, se prepararon los geles de agarosa al 1 % en PBS sobre portaobjetos para vaciar la segunda capa de agarosa con el botón celular y dejar gelificar a 4 °C por 7 min. Para obtener los núcleos, dichos geles se

dejaron por 24 h en amortiguador de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, Tritón 1% X-100 y DMSO 10 %, pH 10) a 4 °C.

En la oscuridad, se colocaron los geles en una cámara de electroforesis horizontal con un amortiguador alcalino a 4°C (300 mMNaOH, 1 mM EDTA pH 13) durante 20 min sin corriente para permitir que el DNA se desenrolle y por otros 20 min a 25 V para que producir la migración de los fragmentos de DNA hacia el ánodo. Se neutralizaron los geles con 3 lavados de amortiguador neutralizante (0.4 M Tris, pH 7.5) por 5 min cada uno. Y se fijaron los geles con etanol absoluto a 4 °C por 10 min. Se tiñeron con 50 µL de Gel Red (10%), para su análisis en el microscopio de fluorescencia. Los parámetros que se tomaron en cuenta para medir el daño en 100 núcleos por tratamiento fueron: núcleos con cometa y con protuberancias estilo "budds". Se expresaron como porcentaje de cometas y de núcleos atípicos.

Inducción de 8-OHdG por el B[ghi]p de tiempos de exposición preliminares

La detección de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) se realizó en 1×10^6 de células y se sometieron al esquema de exposición descrito anteriormente. Al término de los tiempos de exposición al B[ghi]p, las células se despegaron y el botón celular se centrifugó a 1400 rpm (145 x g) durante 5 min y se diluyó en 1 mL de PBS a 4 °C. Para compactar el botón, se volvieron a centrifugar a 8000 rpm (10,000 x g) durante 10 s y se dejaron 1 min en nitrógeno líquido para conservarlos a -80 °C.

La detección de 8-OHdG se realizó por inmunoensayo de ELISA con el kit HT 8-oxo-dG ELISA (TREVIGEN, cat 4380-192-K). Se realizaron las diluciones recomendadas por el protocolo del kit para la curva estándar a 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM, 3.13 nM, 1.56 nM y 0.78 nM de 8-OHdG. De cada muestra se hicieron las diluciones correspondientes para tener en un volumen final de 150 µL, la concentración de 5 µg/mL de DNA. Posteriormente, a cada muestra se le agregaron 0.6 µL de DNasa I y se

incubaron por 1 h a 37 °C. Después se agregaron 0.6 µL de fosfatasa alcalina y se incubaron de nuevo durante 1 h a 37 °C.

Se siguió el protocolo descrito del “kit”, colocando primero 25 µL de las diluciones estándar de 8-OHdG por triplicado y para los pozos blancos se agregaron 25 µL de la solución diluyente del “kit”. A continuación, se agregaron 50 µL de cada muestra por triplicado. A todas las muestras excepto al blanco, se les agregaron 25 µL de la solución de anticuerpo monoclonal anti 8-OHdG, se cubrió la placa con mica adherente y se incubó a 25 °C por 1 h. Después, se removió la mica y se lavaron cuatro veces los pozos con 300 µL de PBST (PBS 1X + 0.1% Tween 20) a 4 °C. En seguida, se agregaron 50 µL de la solución diluida de IgG-HRP y se incubó la placa a 25 °C por 1 h. Nuevamente se realizaron 4 lavados con PBST a 4 °C y se removió todo el líquido.

Por último, se agregó el sustrato colorimétrico “TACS-Sapphire” en oscuridad durante 15 min a 25 °C y se paró la reacción con 50 µL de HCl 0.2M para inmediatamente leer la placa en un espectrofotómetro Labsystem Multiscan Ascent a 450 nm. El cálculo de la cantidad de aductos en concentraciones de nM se obtuvo en la página de Excel Worksheet provista por TREVIGEN (www.trevigen.com/docs/1309882151.4380_096_k_8ohdg_calculation_worksheet.xls). Es importante mencionar que la curva patrón de 8-OHdG para cuantificar la presencia de esta base oxidada debido al B[ghi]p, requirió una dilución más de la que recomienda el manual del kit (de acuerdo a las oxidaciones producidas por hidrocarburos más potentes como el B[a]p), por lo que el B[ghi]p es un inductor débil de 8-OHdG .

Posteriormente, después de analizar los resultados de los esquemas experimentales antes descrito, sobre todo del ensayo de TUNEL en el que se evidenció que con tan sólo 6 h de exposición al B[ghi]p, se registraba un alto porcentaje de daño (74% de células con fragmentación) comprometiendo también la viabilidad de las células, se decidió elegir un

tiempo más corto de exposición (3h de exposición) para el desarrollo del tema principal del Doctorado. Por lo tanto, las células NL-20 fueron expuestas de acuerdo al siguiente esquema experimental descrito en la tabla 2.

Tabla 2. Esquema experimental

Grupo experimental	Tratamiento
Testigo-3h	Células NL-20 en medio HAM-F12 con DMSO al 0.0056% (vehículo) por 3 h.
B[ghi]p-3h	Células NL-20 en medio HAM-F12 expuestas a una concentración final de 2 μ M de B[ghi]p con 0.0056% de DMSO por 3 h.
Testigo-24h-R	Células NL-20 en medio HAM-F12 expuestas a 0.0056% de DMSO por 3 h. Posteriormente, se les retiró el tratamiento, se lavaron con solución salina y se incubaron 24 h con medio de cultivo (tiempo de recuperación).
B[ghi]p-24h-R	Células NL-20 en medio HAM-F12 expuestas a 2 μ M de B[ghi]p por 3 h. Posteriormente, se les retiró el tratamiento, se lavaron con solución salina y se incubaron 24 h con medio de cultivo (tiempo de recuperación).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. Con el fin de verificar si los efectos citotóxicos y genotóxicos del B[ghi]p se deben a estrés oxidante, las células fueron expuestas 16 h

antes al precursor de glutatión, la N-acetil-cisteína (NAC) a 10 mM y se continuó el mismo esquema experimental descrito anteriormente (se identifican con el sufijo +NAC).

Análisis de la morfología celular

Se sembraron 60,000 células sobre cubreobjetos estériles 24 h antes del experimento. Posteriormente, se expusieron al esquema anterior y al término se fijaron con metanol absoluto -20°C por 5 min. Se dejaron secar y se tiñeron con 500 µL de colorante Giemsa [1:9] durante 10 min. Se lavaron para retirar el exceso de colorante y se dejaron secar para montarlas con resina sobre portaobjetos. Las células se observaron con un microscopio de campo claro Leica DMI8 a 100x y se tomaron fotografías por tratamiento para revelar los cambios morfológicos en núcleo y en el citoplasma. En un campo al azar, se cuantificó la frecuencia de células vesiculadas en 100 células.

Inmunocitoquímica de la γ H2AX y del factor inductor de apoptosis (AIF)

Las células se sembraron 24 h previas a la exposición en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina [1:10] en cajas Petri de 35 mm. Una vez finalizado el tiempo de exposición, las células se lavaron con 1 mL de PBS y se fijaron con metanol absoluto a -20°C durante 5 min. Se retiró el fijador y se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min c/u.

Se utilizó 1 mL de PBS-Triton 0.2% por muestra durante 30 min para permeabilizar las células. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 1 mL de PBS y un bloqueo de autofluorescencia con 1 mL de glicina a 50 mM. A continuación, se retiró la glicina y se agregaron 100 µL de PBS-BSA al 0.1% con suero de cabra al 10% por 1 h. Para quitar el exceso, se lavaron dos veces con 1 mL de PBS y se agregaron 35 µL de anticuerpo primario y se incubaron 30 min a temperatura ambiente y 24 h a 4°C en una cámara húmeda. Los anticuerpos primarios usados son γ H2AX [1:200] (Millipore # 05-636 anti-mouse) como de AIF [5:100] (R&D systems # AF 1457 anti-rabbit)

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con 1 mL PBS-tween 0.05% de 10 min c/u. Se agregaron 40 μ L de los anticuerpos secundarios [1:200] Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher # A-11032 anti-mouse) y [1:200] FITC (Santa Cruz Biotechnology # G1713-anti-rabbit) durante 90 min. Posteriormente, se quitó el exceso de anticuerpo con 3 lavados de PBS-Tween 0.05% durante 10 min c/u y 1 lavado con PBS por 10 min.

Las muestras se contrastaron con 100 μ L DAPI [10 μ g/mL] por muestra durante 5 min. Por último se montaron permanentemente con resina y se mantuvieron en oscuridad a 4°C para su posterior análisis en el microscopio de fluorescencia.

Extracción de RNA total

Las células expuestas al esquema descrito anteriormente se lisaron agregando 400 μ L de Trizol (GIBCO, USA) por caja Petri, se recolectaron y mantuvieron en -70°C hasta coleccionar las muestras de tres triplicados biológicos. Para continuar con el procedimiento de extracción, se incubó el lisado celular durante 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 80 μ L de cloroformo frío, se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar durante 10 min. Se centrifugaron a 12,000 rpm (15,934 x g) por 15 min a 4°C, y se recuperó únicamente la fase acuosa que contiene el RNA. Ésta se transfirió a un tubo con 200 μ L de isopropanol frío más 2 μ L de glucógeno y se incubó toda la noche a -20°C para precipitar la mayor cantidad de RNA total. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm (15,934 x g) por 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y el botón se lavó tres veces con 400 μ l de etanol al 70%, agitando suavemente y centrifugando a 10,000 rpm (11,066 x g) por 5 min a 4°C. Finalmente se decantó el alcohol, se dejó secar en baño seco y se resuspendió en 25 μ L de agua libre de nucleasas. Se trató con DNasa I (1U por 1 μ g de RNA) durante 30 min, se inactivó la enzima con EDTA a 70°C durante 10 min y se cuantificó la concentración y pureza del RNA en un NanoDrop. Todas las muestras tuvieron una relación 260/280 superior a 1.8.

RNA y síntesis de cDNA para el análisis de los genes por las placas

Para tener una cantidad óptima de RNA por tratamiento, se sembraron 60,000 células en cajas Petri de 35 mm por triplicado por condición. Una vez transcurridas las 3 h de exposición, se extrajo el RNA total de las células mediante la técnica de Trizol anteriormente descrita y se cuantificó la cantidad de RNA con un NanoDrop. En las células con tiempo de recuperación, se extrajo el RNA de la misma forma pero después de las 24 h que permanecieron las células con medio de cultivo. De acuerdo a la cantidad de cDNA recomendado para las placas de baja densidad entre los valores de 5 a 50 ng de cDNA por reacción, se utilizaron 400 ng de RNA para la síntesis de cDNA en 20 μ L de reacción con el kit First Strand cDNA Synthesis de ThermoScientific®. En un termociclador de punto final con las siguientes condiciones: 37 °C por 60 minutos, 70 °C por 10 minutos y 4 °C por un minuto.

Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR-RT) con placas TaqMan

Para evaluar la expresión diferencial de los genes relacionados a las vías de reparación del DNA, se utilizaron placas de baja densidad “TaqMan® Array Fast plates Human DNA Repair Mechanism” (Thermofisher # 4414128). Dichas placas de base sólida contienen insertados por pozo, secuencias específicas llamadas sondas que identifican un gen determinado. Basándose en la capacidad de hibridación del DNA, las secuencias complementarias se detectarán con mayor intensidad. En cada placa se evaluará la expresión de 92 genes relacionados a las vías de reparación de bases (BER), a las de escisión de nucleótidos (NER), a las de reparación de desajustes (MMR) y 4 genes control (18S, GAPDH, GUSB y HPRT1).

Cada placa se centrifugo a 1000 rpm por 1 min sin quitar el papel adhesivo para asegurar que las sondas se concentren en el fondo del pozo. Se agregaron por pozo 2 μ L de cDNA,

3 μ L de agua libre de nucleasas y 5 μ L de la mezcla “TaqMan Fast Universal PCR Master mix (2X)” (Thermofisher # 4352042). Posteriormente, se selló la placa con mica adherente y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm por 1 min. La PCR se llevó a cabo en el termociclador de tiempo real QuantStudio con el perfil térmico de: 20 segundos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C, como es recomendado por el protocolo de las placas.

De acuerdo a los resultados promedios de dos experimentos independientes, se determinaron los genes que se analizaron a detalle.

Síntesis de cDNA para el análisis dirigido de ciertos genes con diseño de oligos

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 200 ng de RNA total utilizando el “kit First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific) en un termociclador de punto final con las siguientes condiciones: 37°C por 60 min, 70°C por 10 min y 22°C por 1 min.

Expresión de los genes de reparación por RT-qPCR con diseño de oligos

La cuantificación en tiempo real se realizó utilizando SYBR green como fluorocromo principal y ROX como colorante pasivo de referencia, incluidos en el “kit Maxima SYBR green qPCR Master mix” (Thermo Scientific). Se utilizaron los oligos específicos para cada gen (Tabla 3) y las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent) utilizando el siguiente programa: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s más 30 s a 57°C como temperatura de alineamiento y 30 s a 72°C de extensión, para finalizar con un ciclo de 95°C por 1 min, 57°C por 1 min y 95°C por 30 s. Los niveles de expresión se analizaron usando el modelo matemático de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Se utilizó como gen endógeno el gen 18s.

TABLA 3. Secuencias Forward (F) y Reverse (R) de los genes *18s*, *BRCA2*, *GADD45B*, *POLB*, *POLD1*, *POLG*, *POLR2C*, *XRCC1*, *XRCC6* para el RT-qPCR.

	Secuencias Oligos para RT-qPCR	
<i>18s</i>	F	ATT TTG CGA GTA CTC AAC ACC AAC AT
	R	TTT CCT CAA CAC CAC ATG AGC ATA TCT T
<i>BRCA2</i>	F	ATT TTT AAG ACA CGC TGC AAC AAA GC
	R	CAG GTT CAG AAT TAT AGG GTG GAG C
<i>GADD45B</i>	F	AAC GAC ATC AAC ATC GTG CG
	R	GTG TGA GGG TTC GTG ACC AG
<i>POLB</i>	F	TAA AGA GTG GAG CTG AAG CTA AGA AAT TG
	R	CTT TTC CAG TTT ACG TAA TTT TCC AGT TGC
<i>POLD1</i>	F	CCC TCA TCT TCC AAC AGT TGG AGA T
	R	CAG ACA GAG AAC CCC TCA TCG G
<i>POLG</i>	F	TGG ATT ACT TAG AAG TGG AGG CTG AGG
	R	TTG TAA GGT CCA TTG CCA TGG TGA TAG
<i>POLR2C</i>	F	ATT GAC TGG GTT CAG ATT GAT GCC A
	R	CAG CTT GTC CAC AAT GTC ATC ACT
<i>XRCC1</i>	F	CGG CGG AAA CTC ATC CGA TA
	R	CCA TCA GGG CCT CCT CAA AG
<i>XRCC6</i>	F	CAT GGG TTT CAA GCC GTT GG
	R	TGA GCA GAG CAC TGA ACA GG

Detección de fragmentación del DNA inducido por el B[*ghi*]p por ensayo de TUNEL

Para realizar este ensayo se utilizó el “kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System” (Promega). Se expusieron 45 000 células al B(*ghi*)p a 3 h y con tiempo de recuperación. Al término, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con 1 mL de solución salina para despegarlas con tripsina durante 10 min. Para concentrar las células, se centrifugaron a 1,300 rpm (125 x g) durante 5min. Se decantó la solución y se les

agregaron 100 μ L de solución salina para un lavado con centrifugación a 1,300 rpm (125 x g) durante 5 min. Nuevamente se decantó la solución y las células concentradas se resuspendieron en 100 μ L de solución salina. En portaobjetos previamente preparados y cargados con silano, se realizaron frotis por tratamiento y se dejaron secar a 37°C. Estas muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 25 min, para posteriormente revelar la presencia de la fragmentación del DNA siguiendo las instrucciones del “kit”.

Las laminillas de tres experimentos independientes se evaluaron en un microscopio de campo claro Leica DMI8 y se cuantificaron el número de núcleos en 100 células por tratamiento y se expresan como porcentaje de núcleos con fragmentación de DNA.

Cuantificación de caspasas activas y de Ki67 como marcador de proliferación

Se sembraron 15,000 células por tratamiento (por duplicado) en placas de 96 pozos durante 24 h antes del tratamiento. Una vez terminado el tiempo de exposición al B[*ghi*]p durante 3 h y con recuperación de 24 h, las células se despegaron con tripsina y se centrifugaron a 1,300 rpm (125 x g) por 5 min. Para realizar la cuantificación de caspasas y de proliferación en el equipo MUSE (Muse® Cell Analyzer, Merck), se realizaron conteos de células totales por tratamiento para evaluar los parámetros en 10,000 células por cada condición. Se siguieron las indicaciones del protocolo del “Muse™ MultiCaspase Kit” (Millipore # MCH100109) y del “Muse Ki67 Proliferation Kit” (MCH100114).

Western Blot

Se sembraron 500,000 células 24 h antes de la exposición y se siguió el diseño experimental anteriormente descrito (Tabla 2). Para extraer la fracción de proteínas citoplasmáticas se agregaron 100 μ L de amortiguador de lisis 4°C (320mM Sacarosa, 10 mM HEPES, 1mM PMSF, 1X solución inhibidora de proteasas) al botón celular con

pipeteo constante por 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 3400 rpm (1279 x g) por 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenaron los extractos citoplasmáticos en caso de necesitarlos. El botón remanente se suspendió con 100 µL del amortiguador RIPA a 4°C (25mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% Triton, 0.5% Na-Deoxicolato, 0.5% SDS, 1Mm PMSF, 1X solución inhibidora de proteasas) por 4 min y se centrifugó a 13,000 rpm (18,701 x g) por 10 min a 4°C. El sobrenadante (fracción nuclear) se transfirió a otro tubo para utilizarla posteriormente. Todas las muestras se cuantificaron mediante el ensayo colorimétrico de Bradford y se almacenaron con amortiguador Laemmli a una concentración final 1X.

Las muestras se desnaturalizaron previamente por 10 min a 90 °C a temperatura ambiente antes de su separación en una electroforesis SDS-PAGE (20 min a 40 V y 30 min a 200 V). Se cargaron 8 µg de proteínas de la fracción nuclear y la transferencia de las proteínas se hizo en una cámara húmeda fría (25 mM Tris, 190 mM glicina) por 2 h a 40 V. La unión de los anticuerpos no específicos en la membrana de PVDF se bloqueó con 5% de leche (BioRad) en TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 pH=7.6) por 30 min a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti AIF (R&D systems) a una concentración 1:200 por 1 h. Se realizaron 3 lavados con TBS-T y se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG H&L-HRP (Abcam) a una dilución 1:1000 por 1 h. Se realizaron 3 lavados con TBS-T y se detectó la señal quimioluminescente de las bandas con el reactivo “ECL Prime Western Blotting Detection” y se analizaron en el equipo “Fusion FX7 chemoluminescence imaging system”. Después de desnudar la membrana, se utilizó como proteína de control de carga la histona H4 (Abcam) a una concentración 1:1000. La densitometría de las bandas se realizó en el programa Fiji ImageJ software.

Citometría de flujo

Se sembraron 500,000 células y se expusieron al diseño experimental descrito en la tabla 2. Una vez terminado el tiempo de exposición, las células se despegaron y se concentró el botón celular mediante una centrifugación a 1500 rpm (504 x g) por 8 min. Se tomaron 390,000 células por tratamiento y se lavaron con 2 mL de amortiguador de FACS (1X PBS, 5% de suero fetal bovino) a 1500 rpm (504 x g) por 5 min. Se decantaron y se les agregaron 100 µL de FACS a los muestras testigo (sin tinción y control de secundarios), mientras que a las muestras para la tinción se les agregaron 100 µL de la solución “Annexin V Binding Buffer” a las muestras y 5 µL del “APC AnnexinV Apoptosis” por 15 min. Para retirar el exceso de tinción, se hizo un lavado con 2 mL de amortiguador de FACS. Posteriormente, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% a 4°C por 20 min y se pretrataron con 1 mL de la solución para permeabilizar “Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (1X)” y con 2 mL de amortiguador de FACS a 1500 rpm (504 x g) por 5 min. Se decantaron las muestras y se permeabilizaron por 5 min con el anterior amortiguador. El anticuerpo anti γ H2AX (Millipore) a una concentración 1:200 se incubó toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 se agregó a 1:500 por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se agregaron 2 µL de la tinción Ki67 Alexa Fluor 647 por 30 min. El análisis de los datos se realizó en el citómetro FACScalibur con el programa FlowJo software (TreeStar).

Preparación de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de las células NL-20

Se sembraron 500,000 células por tratamiento en cajas Petri de 100 mm, 24 h antes del tratamiento. Una vez terminado el tiempo de exposición al B[ghi]p durante 3 h, se retiró el medio con pipeta y se realizó un lavado con 5 mL de solución salina para eliminar residuos del tratamiento. Las células de 3 h de exposición se despegaron con solución

salina y tripsina mientras que a las células de recuperación, después del lavado, se les agregó medio de cultivo y se mantuvieron 24 h en la incubadora a 37°C con humedad relativa y 5% de CO₂.

Las células se concentraron por centrifugación a 1400 rpm (217 x g) durante 8 min. El sobrenadante se decantó y se les agregaron 500 µL de amortiguador de lisis frío (320 mM de sacarosa, 10 mM de Hepes pH 7.4, 0.5% de Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1X coctel inhibidor de proteínas ThermoSCIENTIFIC # cat 78438 y 162.5 µL de agua) durante 10 min con pipeteo constante para obtener la fase citoplasmática. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 3400 rpm (1,279 x g) por 10 min a 4°C. El sobrenadante (fase citoplasmática) se transfirió a otro tubo y se mantuvo en hielo para su posterior cuantificación y análisis.

La fracción celular residual se suspendió en el amortiguador de lisis nuclear frío (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCL 50 mM EDTA, 1% Tritón, 0.5% Na-deoxicolato, 0.1% SDS, 0.5% Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1X coctel inhibidor de proteínas ThermoSCIENTIFIC Cat #78438 y 330 µL de agua) durante 4 min y se centrifugaron a 13,000 rpm (18,701 x g) durante 10 min.

Como parte del control de la extracción de ambas fracciones, se cuantificó la cantidad de proteína de cada una con 150 µL de fracción citoplasmática y nuclear (Tabla 4), de acuerdo a lo recomendado del "kit" para microensayos con el método de Bradford (Bio Rad Cat #500-025). De las muestras de dos experimentos independientes en frascos ámbar, se tomaron 95 µL de cada una y se doparon con 5 µL de una solución stock de metanol con el deuterado de B[ghi]p-d₁₂ [2 ng/µL]. Todas se mantuvieron a -20°C para su posterior análisis. Para el análisis de los extractos por GC/MS/EI, se tomaron 5 µL de muestra dopada y se colocaron en una sonda para su termodesorción en el equipo

Agilent, con una columna J&W 122-3862DB-35ms con dimensiones 60 m x 250 μm x 0.25 μm .

Tabla 4. Cuantificación de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de las fracciones citoplasmática y nuclear de células expuestas al vehículo (DMSO) y a 2 μM de B[ghi]p.

TRATAMIENTO	CITOPLASMA	NUCLEAR
	[$\mu\text{g/mL}$]	
DMSO-3h	7.15	1.27
DMSO-3h	3.77	1.28
DMSO-24h-R	19.13	1.37
DMSO-24h-R	19.27	1.35
B[ghi]p-3h	13.77	1.26
B[ghi]p-3h	15.18	1.28
B[ghi]p-24h-R	18.70	1.29
B[ghi]p-24h-R	21.24	1.37

Detección y cuantificación del B[ghi]p por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (GC/MS/EI) en fracciones citoplasmáticas y nucleares de células NL-20

Para cuantificar la cantidad de B[ghi]p internalizado por las células, se utilizaron los extractos citoplasmáticos y nucleares. Para separar el B[ghi]p de los extractos, se inyectaron 5 μL de cada extracto (volumen óptimo para el análisis) al GC/MS/EI en modo “splitless” a 300 $^{\circ}\text{C}$ en una columna capilar (122-3862) de 60 m J&W ultra inerte DB-35ms (250 μm x 0.25 μm de grosor).

Cada análisis cromatográfico en el GC/MS/EI se realizó con muestras dopadas con el B[ghi]p-d12 en una sonda por termodesorción en un cromatógrafo de masas modelo 7890A de Agilent Technologies. El programa de la temperatura del horno se estableció a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, seguido de incrementos de temperatura a una velocidad constante de 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los 200 $^{\circ}\text{C}$ y luego incrementos de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los 2335 $^{\circ}\text{C}$. Al llegar a dicha temperatura, la corrida se mantuvo por 16 min. El tiempo total de

corrida fue de 26.95 min. Se utilizó helio de alta pureza como gas acarreador a un flujo constante de 1.2 mL/min. El espectrómetro de masas operó con impacto electrónico y los análisis se hicieron en modo SIM, seleccionando el ion deseado a monitorear (276 para B[ghi]p y 288 para estándar interno B[ghi]p-d12).

Para calcular la concentración de B[ghi]p en los distintos extractos de los experimentos independientes, previamente se estableció una curva de concentración del PAH en un intervalo de la curva se definió con las siguientes concentraciones: 10 pg/5µL, 50 pg/5µL, 100 pg/5µL y 200 pg/5µL, cada una con 500 pg/5µL del estándar interno el B[ghi]p deuterado (B[ghi]p-d12).

Análisis estadístico

Las diferencias en la presencia de "budds", el número de núcleos con fragmentación del DNA por TUNEL y la cantidad de cometas inducidos, se evaluaron mediante una prueba de t de Student. La cantidad de 8-oxodG y la prueba de viabilidad se analizaron con la prueba de ANOVA. Para verificar las diferencias entre las medias de los grupos experimentales de los datos del porcentaje de las células con vesículas, la inducción de los focos de γ H2AX y la translocación nuclear de AIF se utilizó la prueba de t de Student. Para evaluar los cambios en la expresión de los genes fueron analizados por la prueba U de Mann-Whitney. Para el análisis de los resultados de la detección y cuantificación del B[ghi]p de las fases citoplasmática y nuclear se evaluaron por comparaciones múltiples mediante ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey's. Los resultados que se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS PRELIMINARES

El efecto del B[ghi]p en la viabilidad celular es independiente de la vía de AhR

La viabilidad de las células expuestas al B[ghi]p disminuyó significativamente ($p < 0.001$) a 76% y 66% para las 6 y 24 h, respectivamente (Figura 11). Los efectos de reducción de la viabilidad por la exposición al B[ghi]p no se ven rescatados por la incorporación del antagonista de AhR (Figura 11).

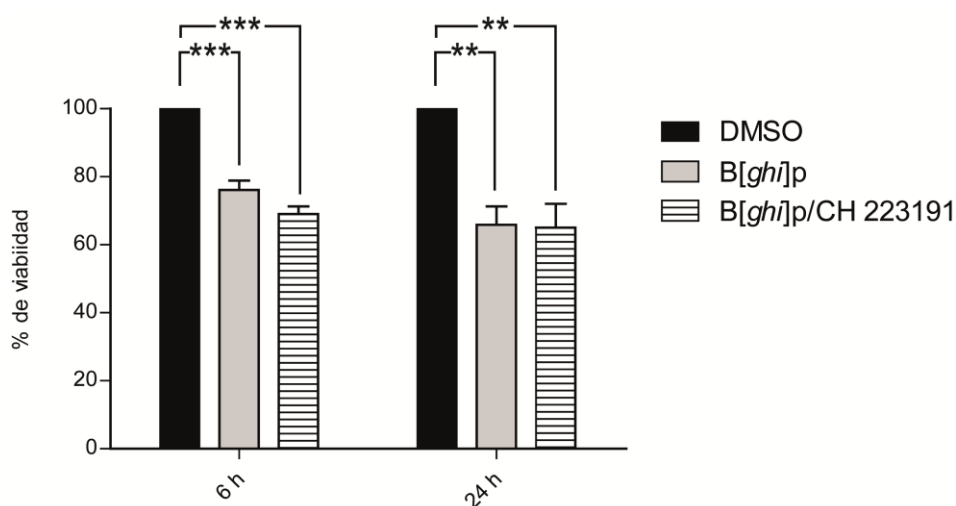


Figura 11. Disminución de la viabilidad de las células NL-20 expuestas a 6 horas y 24 horas a: vehículo (0.1% DMSO), 2 μ M de B[ghi]p y 2 μ M de B[ghi]p más 10 μ M del antagonista a AhR CH223191.

El B[ghi]p induce diversos efectos genotóxicos en las células NL-20

Con el fin de evaluar los efectos genotóxicos que el B[ghi]p pudiera causar a los núcleos de las células bronquiales, se evaluaron: la fragmentación del DNA por ensayo COMETA, la presencia de núcleos atípicos con protuberancias como yemas o buds (NB), la apoptosis y la inducción de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina.

Se encontró baja frecuencia de formación de cometas (núcleos con DNA fragmentado) en ambos tiempos de exposición (Figura 12a). De manera contraria, se observó un incremento significativo del 19% y 30% de NB ($p < 0.05$) en células expuestas al B[ghi]p

por 6 h y 24 h, respectivamente (Figura 12b). Este efecto no disminuyó en presencia del antagonista del receptor AhR.

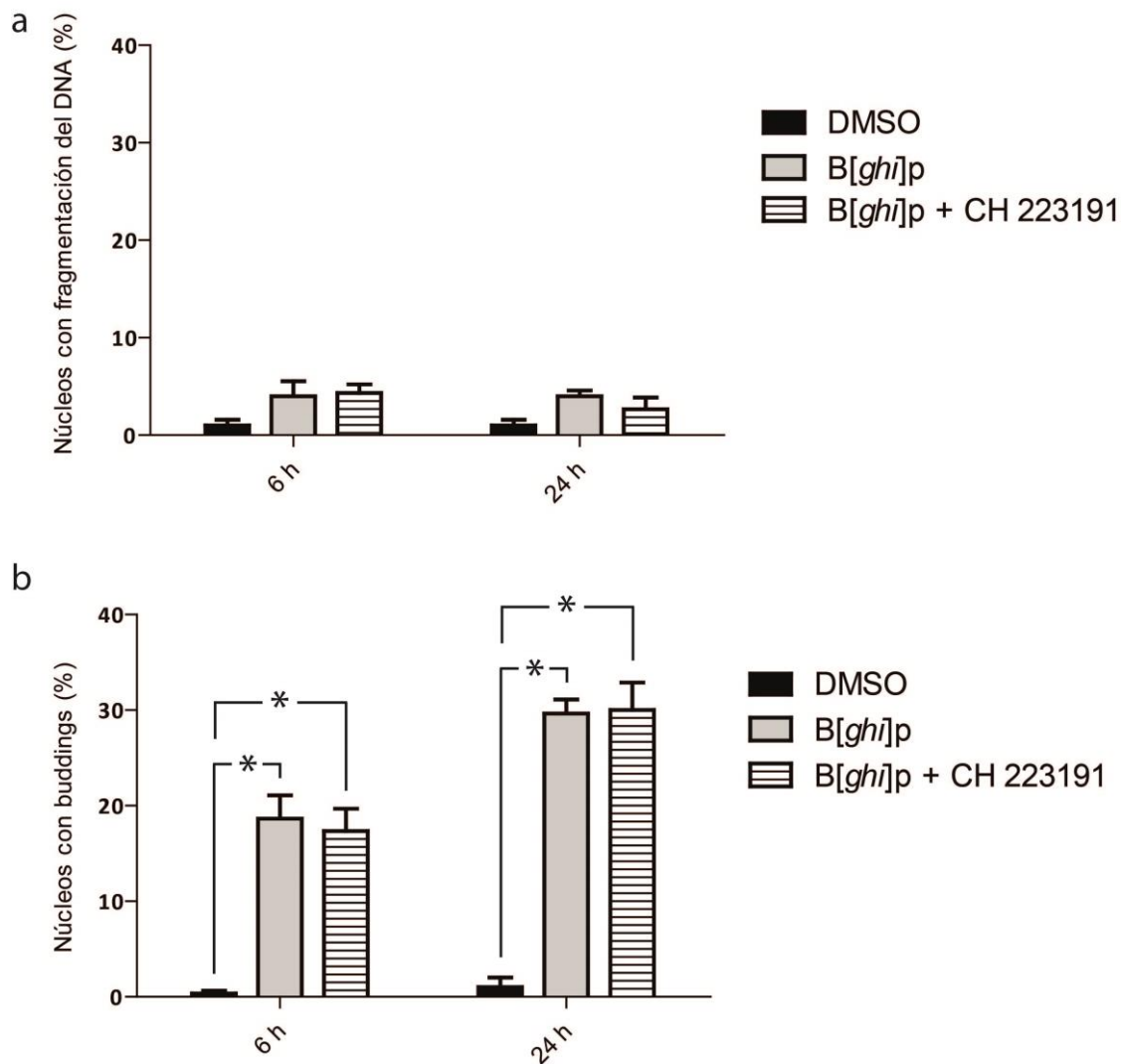


Figura 12. Porcentaje de núcleos con fragmentación del DNA (a) y budds (b) en células NL-20 expuestas por a 6 horas y 24horas a: vehículo (0.1% DMSO), 2 μ M de B[ghi]p y 2 μ M de B[ghi]p más 10 μ M del antagonista a AhR CH223191.

Debido a que desde las 6 h se observó una disminución de la viabilidad con en el ensayo de MTT, se corroboró con el ensayo de TUNEL si a partir de este tiempo se encontraba fragmentado el DNA (Figura 13). El 76% de las células fue positiva a TUNEL y no

disminuyó aún con el antagonista al receptor AhR. Este resultado fue fundamental para la decisión sobre el tiempo de exposición del tema central del proyecto de Doctorado.

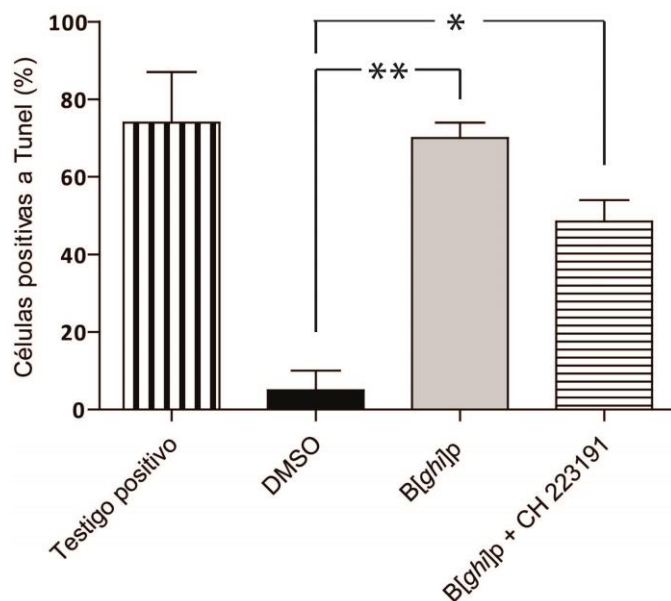


Figura 13. Fragmentación del DNA evidenciada con tinción de TUNEL por efecto de la exposición al B[ghi]p por 6 h. Tratamientos: Testigo positivo células tratadas con 10 U/mL de DNasa, vehículo (0.1% DMSO), 2 μ M de B[ghi]p y 2 μ M de B[ghi]p más 10 μ M del antagonista a AhR CH223191.

Debido a que el efecto genotóxico se comprobó que es independiente de la vía AhR, la cuantificación de la oxidación de la guanina (8-oxo-dG) sólo se evaluó en las células expuestas a 2 μ M de B[ghi]p durante 6 h y 24 h. A pesar de detectar un incremento de la 8-oxo-dG en las células expuestas al B[ghi]p por 6 h, este daño no fue estadísticamente significativo. En las células con 24 h de exposición, representaron niveles similares al testigo (Figura 14).

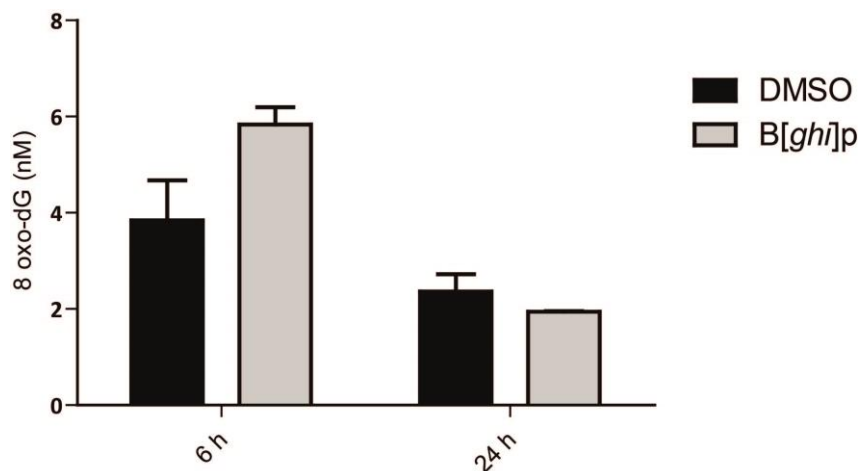


Figura 14. Oxidación de la guanina en células NL-20 expuestas por 6 h y 24 h a: a: vehículo (0.1% DMSO) y 2 μ M de B[ghi]p.

A partir de los resultados preliminares anteriormente descritos, se diseñó el modelo y las estrategias experimentales definitivas que condujeron a la realización del artículo requisito publicado en la revista *Toxicology in vitro* (apéndice). Los siguientes resultados abordan principalmente el tema del daño al DNA, la posible reparación de este y el análisis sobre la internalización y permanencia del B[ghi]p en las células.

RESULTADOS

La exposición al B[ghi]p produce cambios morfológicos en las células NL-20

Entre los cambios morfológicos más notables que se observaron desde las 3 h de exposición, en el citoplasma se registró un aumento de vesículas. El 20% y el 30% de las células expuestas a B[ghi]p-3h (Figura 15b) y B[ghi]p-24h-R (Figura 15d), respectivamente, presentaron un incremento significativo de vesículas citoplasmáticas ($p < 0.05$). Contrario a lo observado en los vehículos, con el 10% y 15%, respectivamente (Figura 15a, c).

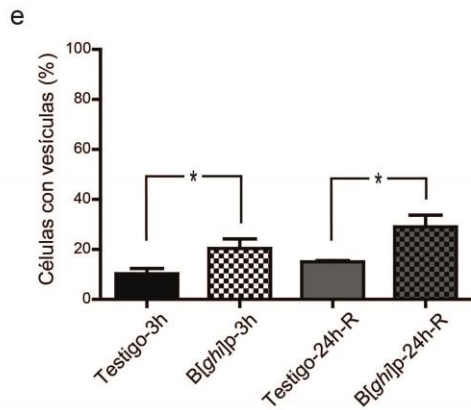
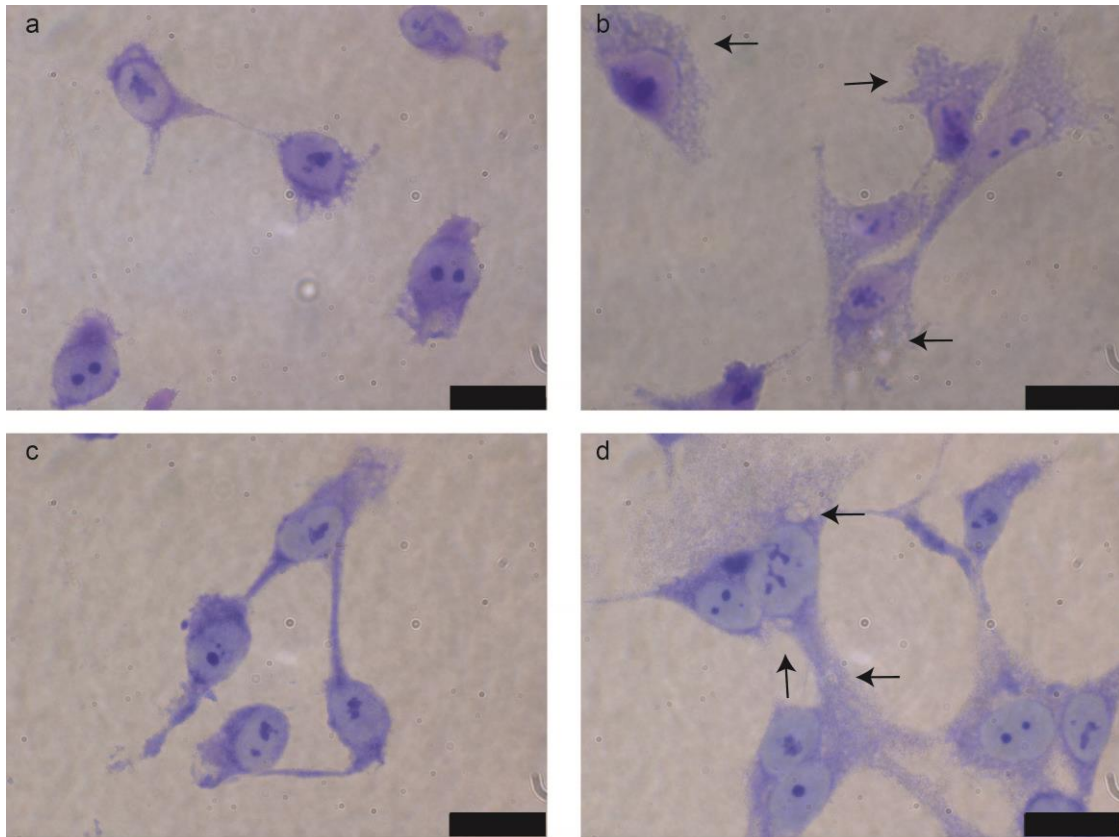


Figura 15. Células NL-20 vesiculadas por efecto del B[ghi]p. Tratamientos: a) Testigo-3h, b) B[ghi]p-3h, c) Testigo-24h, d) B[ghi]p-24h-R, e) Porcentaje de las células \pm error estándar. Tinción con Giemsa [1:10]. Vesículas citoplasmáticas marcadas con flechas. La barra negra equivale a 20 μ m. Prueba de t de *Student $p < 0.05$.

Aumento en la formación de focos de reparación por la exposición al B[ghi]p

Debido a que desde las 3 h de exposición, se observaron cambios morfológicos, se evaluó si el B[ghi]p era capaz de dañar el DNA en dicho periodo. La exposición al B[ghi]p

indujo la presencia de la histona γ H2AX después de 3 h en el 46% de los núcleos de las células con exposición (Figura 16j). Este porcentaje de la señal de la histona fosforilada se mantuvo en el 47% (Figura 16l). Mientras que el porcentaje de las células Testigo-3h y Testigo-24h-R, fueron entre el 20% (Figura 16i) y el 27% (Figura 16k), respectivamente.

Es importante mencionar que el patrón de tinción de la histona se observó a manera de focos bien delimitados. Además, a pesar de la presencia del antioxidante NAC, la persistencia de los focos de la γ H2AX se continuó observando tanto en las células con 3 h de exposición como en las células con 24 h de recuperación (Figuras 16v, x). Estos resultados demuestran que el daño al DNA generado por el B[ghi]p en las células de epitelio bronquial se debe a un mecanismo distinto al incremento de ROS.

B[ghi]p induce cambios en la expresión de los genes involucrados en la reparación del DNA

Debido al daño al DNA evidenciado por inmunocitoquímica para la histona γ H2AX tanto en las células expuestas a las 3 h como en las células recuperadas 24 h, el siguiente paso fue evaluar si los genes de reparación del DNA modulan su expresión como respuesta al daño inducido por el B[ghi]p. Para ello, en primera instancia se realizó una búsqueda de posibles genes que presentaran cambios en su expresión por la exposición al B[ghi]p, los cuales participan en las principales vías de reparación de escisión de bases (BER), escisión de nucleótidos (NER), reparación por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHJR), desajuste de bases (MMR). Todos estos genes se revelaron utilizando una placa de arreglos de baja densidad para evaluar daño al DNA y reparación (Taqman DNA Repair Mechanism, Fast; Applied Biosystems # 4418773). De los resultados de los arreglos, se observó que los genes *BRCA2*, *POLB*, *POLD1*, *POLG* y *POLR2C* incrementaron su expresión al menos 2 veces. Y los genes *XRCC1*, *XRCC5*, *GADD45B* la disminuyeron dos veces (Figura 17).

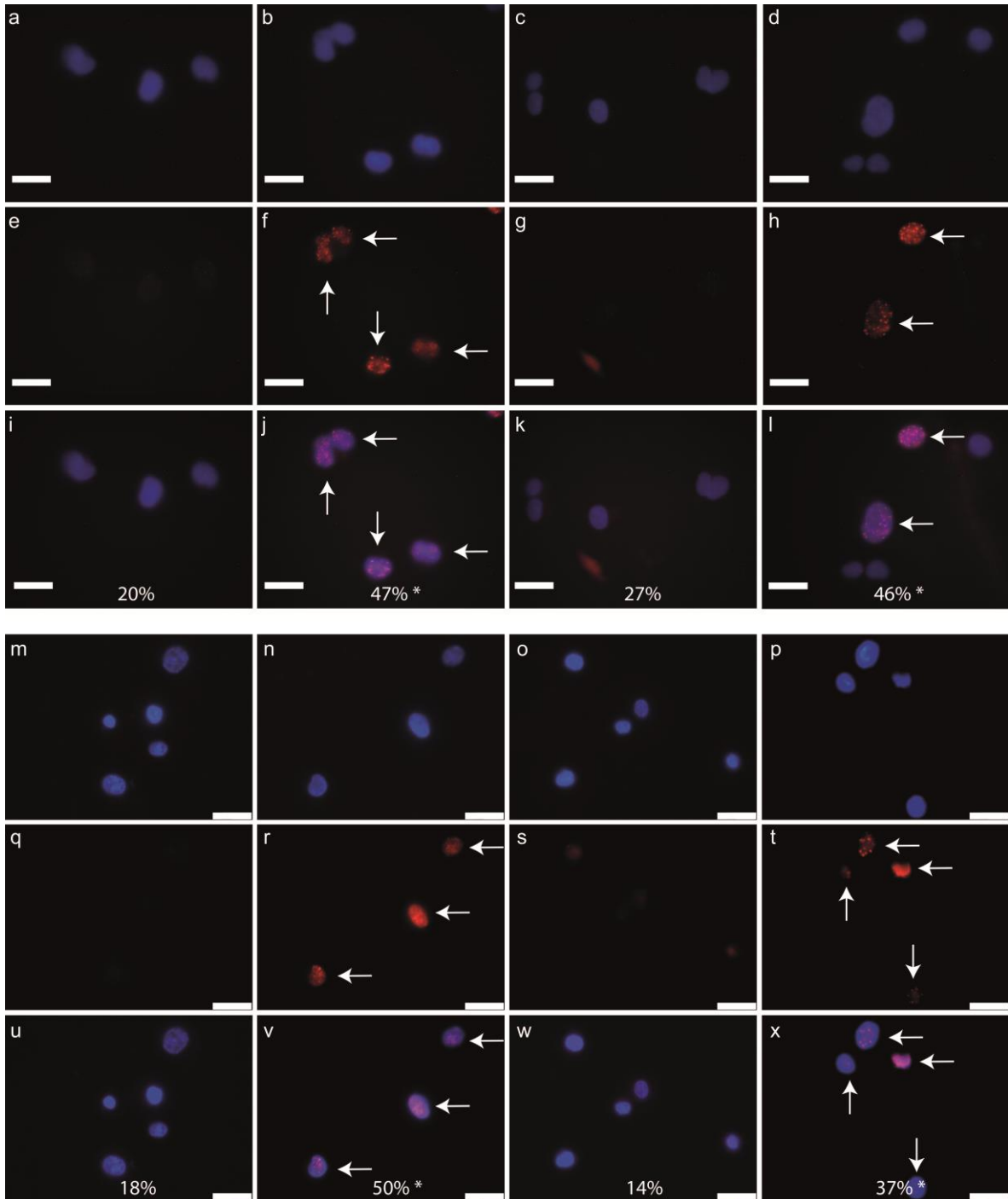


Figura 16. Inducción de la histona fosforilada H2AX (γ H2AX) en células NL-20 expuestas a los tratamientos: a, e, i) Testigo-3h con DAPI (a), γ H2AX en rojo (e) e integración (i). b, f, j) B[ghi]p-3h con DAPI (b), γ H2AX en rojo (f) e integración (j). c, g, k) Testigo-24h-R con DAPI (c), γ H2AX en rojo (g) e integración (k). d, h, l) B[ghi]p-24h-R con DAPI (d), γ H2AX en rojo (h) e integración (l). Las células NL-20 fueron pre-tratadas con 10 mM de NAC y a los tratamientos: m, q, u) Testigo-3h+NAC con DAPI (m), γ H2AX en rojo (q) e integración (u). n, r, v) B[ghi]p-3h+NAC con DAPI (n), γ H2AX en rojo (r) e integración (v). o, s, w) Testigo-24h-R con DAPI (o), γ H2AX en rojo (s) e integración (w). p, t, x) B[ghi]p-24h-R+NAC con DAPI (p), γ H2AX en rojo (t) e integración (x). Las flechas muestran los núcleos con focos de γ H2AX. La barra blanca equivale a 20 μ m. Prueba de t de Student * $p < 0.05$.

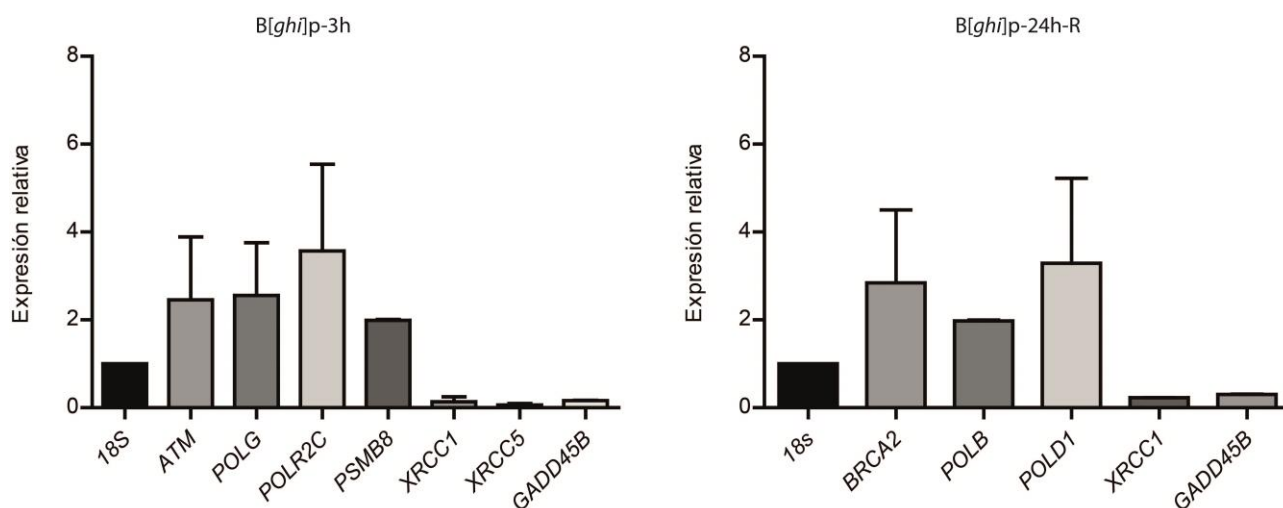


Figura 17. Efecto del B[ghi]p en la expresión relativa de los genes de reparación del DNA en células NL-20. Cuantificación de la expresión en los tratamientos B[ghi]p-3h y B[ghi]p-24h-R mediante doble del CT ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) contra Testigo-3h y Testigo-24h-R, respectivamente. Gen constitutivo 18s. Cada barra muestra el promedio con \pm error estándar de dos experimentos independientes.

Con base en estos resultados, se decidió realizar un análisis de la expresión de dichos genes por RT-qPCR, en células expuestas a 3 h al B[ghi]p y en un lapso temporal de distintos tiempos de recuperación: 6 h, 12 h, 18 h y 24 h. Los resultados de tres experimentos independientes mostraron que la expresión relativa de los genes: *BRCA2*, *POLB*, *POLD1*, *POLG*, *POLR2C* y *XRCC6* incrementaron después de 18 h de recuperación (Figura 18). Sin embargo, a las 24 h de recuperación, la expresión de estos genes fue similar a la observada en las células testigo. En relación a la expresión de los genes *GADD45B* y *XRCC1*, no hubo incremento > 1.5 en ninguno de los tiempos evaluados. Para calcular la expresión relativa de los genes, se realizó el $2^{-\Delta\Delta C_t}$ con células expuestas a su correspondiente vehículo (DMSO).

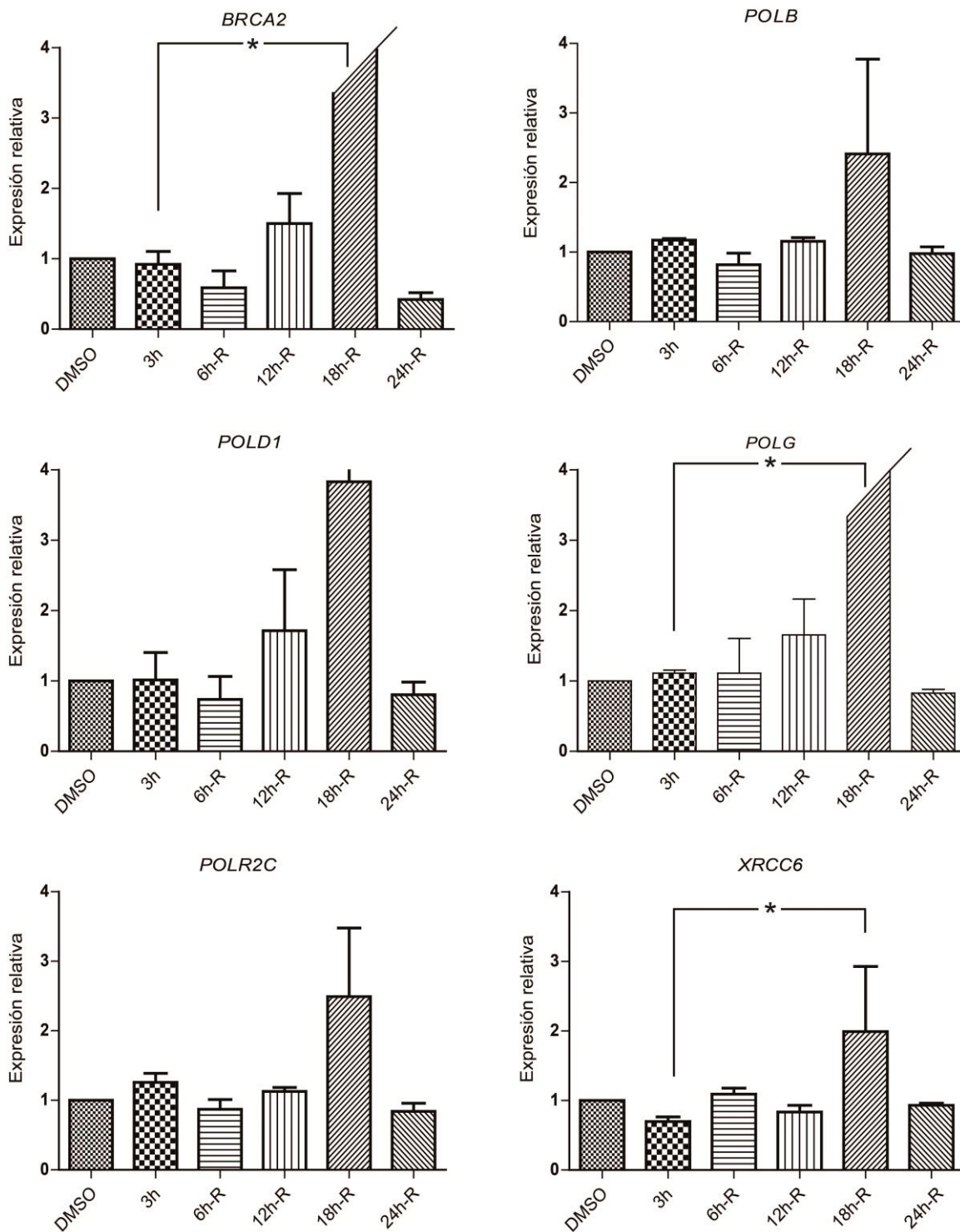


Figura 18. Efecto del B[ghi]p en la expresión relativa de los genes de reparación del DNA en células NL-20 expuestas por 3 h a B[ghi]p [2 μ M] y células con distintos tiempos de recuperación: 6 h, 12 h, 18 h y 24 h. Cada barra muestra el promedio con \pm error estándar de tres experimentos independientes. Prueba de Mann-Whitney * $p < 0.05$.

Incremento de células positivas a apoptosis independiente de caspasas

Debido a la presencia y persistencia de los focos de la γ H2AX a pesar del incremento en la expresión de los genes de reparación, se evaluó si existía fragmentación del DNA vinculada a la muerte celular. El B[*gh*]p induce la fragmentación del DNA en el 40% de las células después de 3 h de exposición (Figura 19d) y disminuye significativamente ($p < 0.05$) con el tiempo de recuperación (Figura 19f, g).

Con base en estos resultados, el siguiente paso fue evaluar si la fragmentación del DNA estaba asociada a la activación de la apoptosis, por lo que se analizó la actividad general de caspasas activas (Figura 20), y la vía independiente de éstas mediante la translocación nuclear del factor inductor de apoptosis (AIF) (Figura 21).

Los resultados tanto de las células expuestas a 3 h (Figura 20b) como las recuperadas (Figura 20d) no presentaron un incremento en los niveles de caspasas activas totales comparadas con sus testigos (Figura 20a, c).

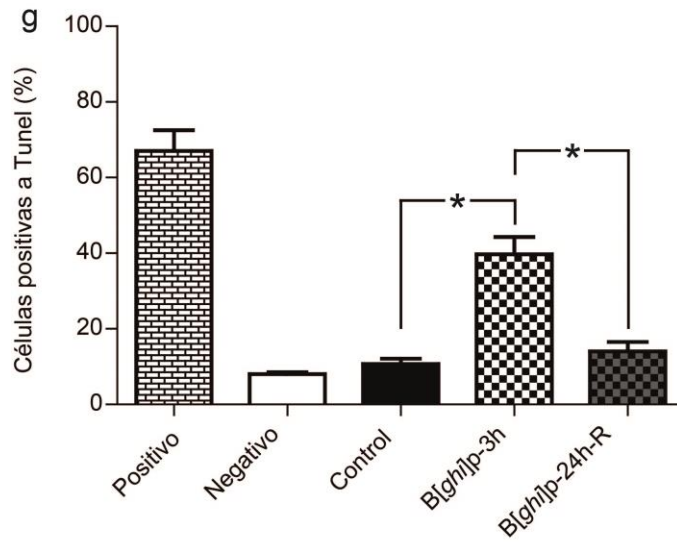
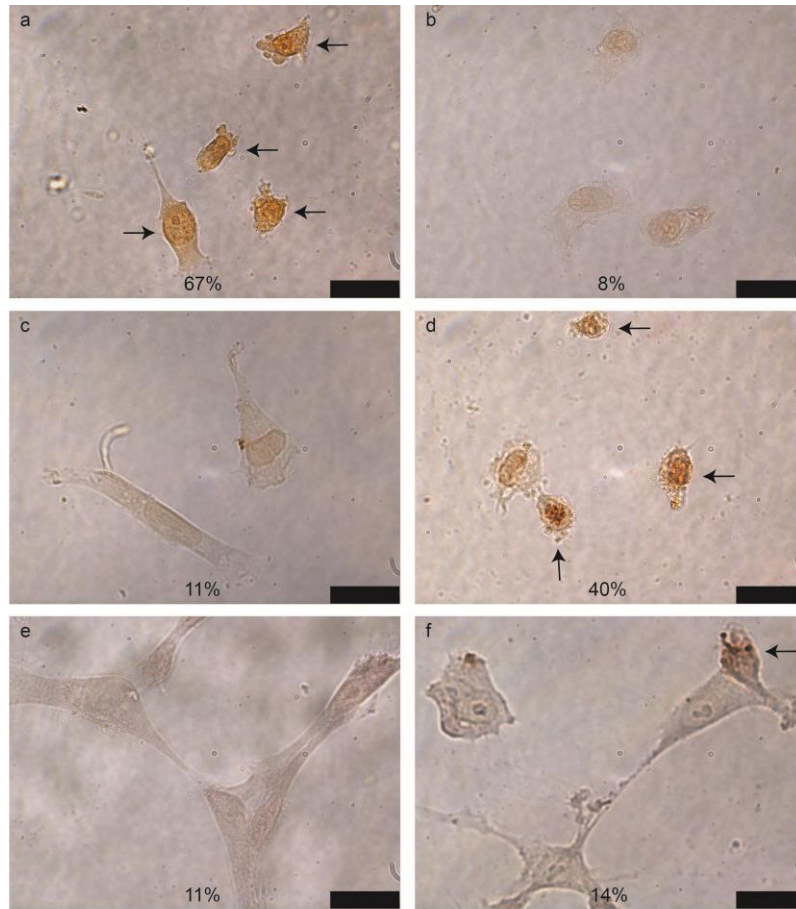


Figura 19. Fragmentación del DNA evidenciada con tinción de TUNel por efecto del B[ghi]p. Tratamientos: a) Testigo positivo tratado con DNasa (10 U/mL), b) Testigo negativo (células sólo con medio), c) Testigo-3h, d) B[ghi]p-3h, e) Testigo-24h-R y f) B[ghi]p-24h-R. g) Cada barra muestra el promedio con \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las flechas señalan las células positivas a la tinción. Prueba de t de Student * $p < 0.05$.

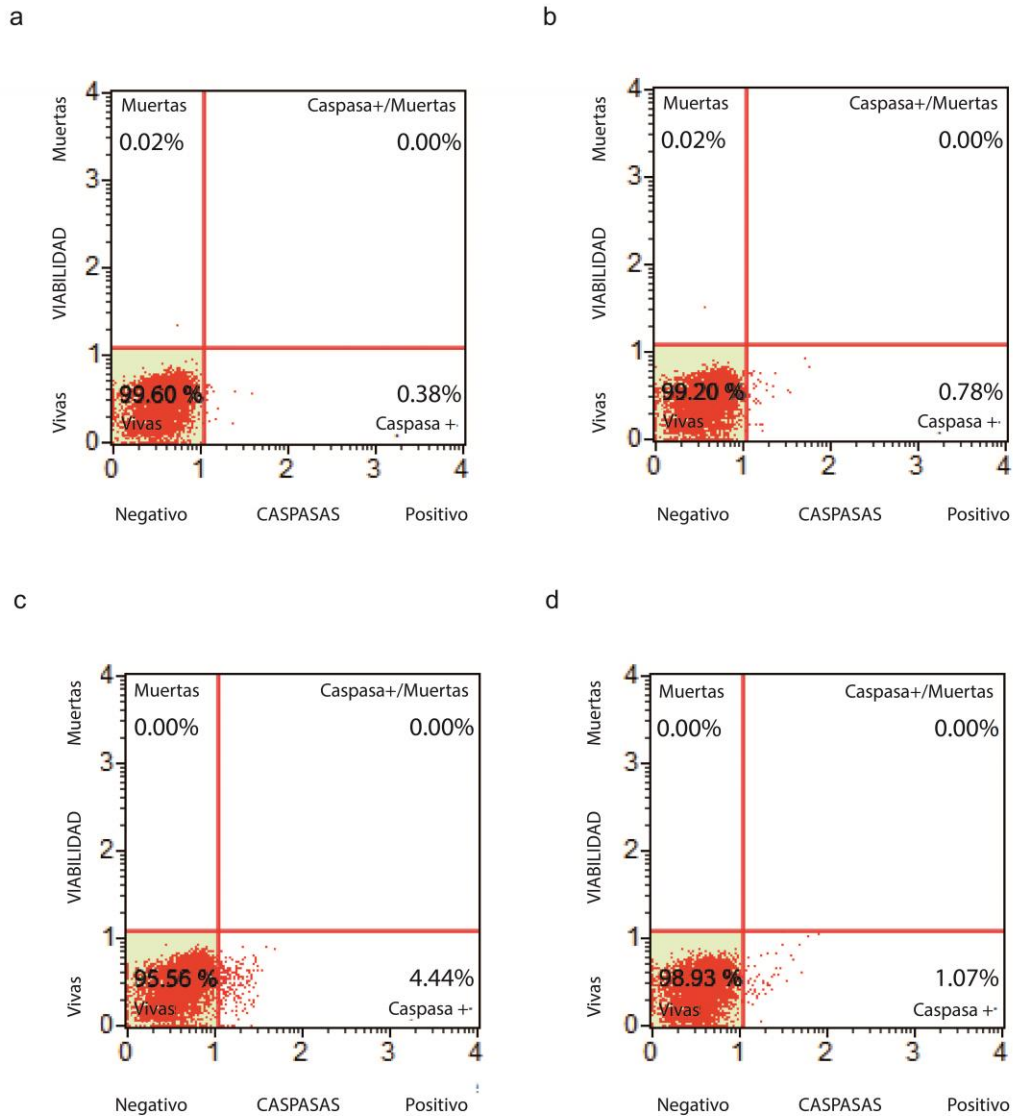


Figura 20. Activación de caspasas totales por efecto del B[ghi]p en las células NL-20. Tratamientos: a) Testigo-3h, b) B[ghi]p-3h, c) Testigo-24h-R y d) B[ghi]p-24h-R Se muestran los plots representativos de tres experimentos independientes con el porcentaje de caspasas activas.

Los resultados mostraron que la translocación de AIF al núcleo se incrementó en un 27% de las células después de 3 h de exposición al B[ghi]p (Figura 21j), comparado con un 12% de translocación en las células testigo (Figura 21i) ($p < 0.05$). Dicho efecto disminuyó a las 24 h de recuperación (Figura 21q). En presencia de NAC (10 mM), la translocación de AIF (Figura 21l) se redujo a valores similares al vehículo (Figura 21k) y fue

estadísticamente significativo comparado con las células con 3 h de exposición ($p < 0.05$). Estos resultados evidenciaron que el B[ghi]p indujo apoptosis independiente de caspasas mediante el aumento de especies reactivas. Estos resultados concordaron con los niveles de proteína de AIF de los extractos nucleares analizados por Western Blott. Como se había demostrado en la inmunocitoquímica, sólo las células expuestas por 3 h presentaron incremento en la expresión de la proteína AIF y decreció cuando las ROS fueron inhibidas con NAC (Fig. 21s-t).

Incremento de la proliferación por el B[ghi]p

Debido a que al aumento de ROS por exposición a PAHs puede incrementar la proliferación (Burdick et al., 2003), se evaluó el nivel de Ki67 en las células expuestas a B[ghi]p. Sólo en las células expuestas a B[ghi]p-3h se registró un incremento significativo del 21% comparado con el testigo (Figura 22; $p < 0.05$) y en presencia del NAC se abatieron significativamente los niveles de Ki67 (Figura 22; $p < 0.05$) Mientras que las células con 24 h de recuperación sólo mostraron un 10% más comparado con su testigo sin ser estadísticamente significativo (Figura 22).

Los resultados obtenidos sustentan que el B[ghi]p es citotóxico (muerte celular mediada por AIF y la proliferación) principalmente por un incremento en ROS y un efecto genotóxico (daño al DNA evidenciado por la presencia de focos de γ H2AX) posiblemente por mecanismos directos del B[ghi]p a la molécula del DNA.

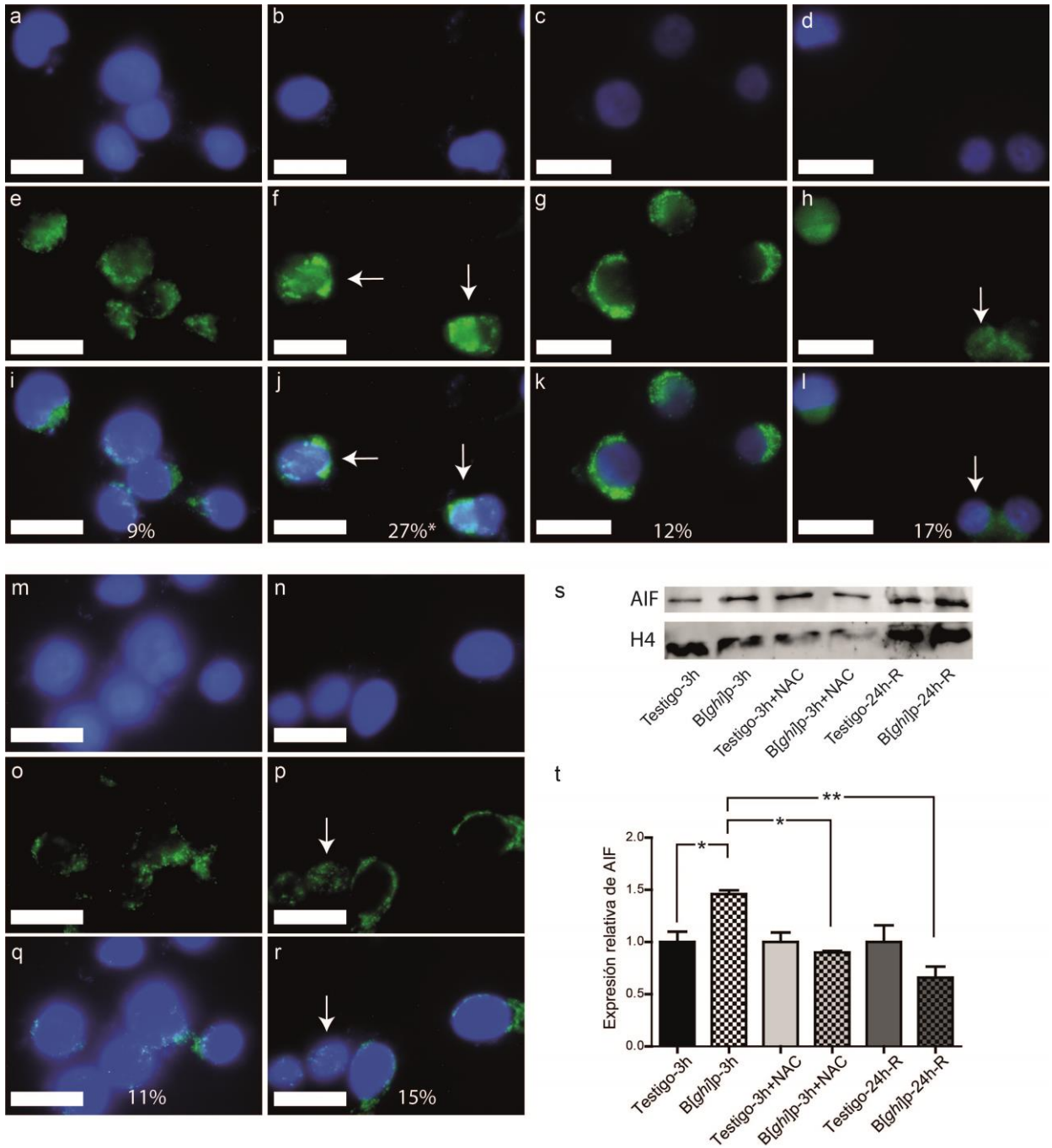


Figura 21. Inmunodetección y nivel de la expresión de la proteína AIF de los grupos experimentales: a, e, i) Testigo-3h con DAPI (a), AIF en verde (e) e integración (i). b, f, j) B[gh]p-3h con DAPI (b), AIF en verde (f) e integración (j). Las células NL-20 fueron pretratadas con 10 mM de NAC y fueron expuestas a los grupos experimentales: c, g, k) Testigo-3h-R+NAC con DAPI (c), AIF en verde (g) e integración (k). d, h, l). B[gh]p-3h-R+NAC con DAPI (d), AIF en verde (h) e integración (l). Y los grupos con tiempo de recuperación: m, o, q) Testigo-24h-R con DAPI (m), AIF en verde (o) e integración (q). n, p, r) B[gh]p-24h-R con DAPI (n), AIF en verde (p) e integración (r). Las flechas señalan los núcleos con AIF. La barra blanca es equivalente a 20 μ m. Prueba de t de Student * p <0.05 y ** p <0.01. s) Western blot de la cantidad de AIF en los extractos nucleares de los distintos grupos experimentales y como proteína de control de carga, la histona H4. t) Cuantificación de las bandas de tres experimentos independientes. La expresión de cada grupo experimental se normalizó AIF/H4 y se comparó la expresión contra su respectivo grupo testigo.

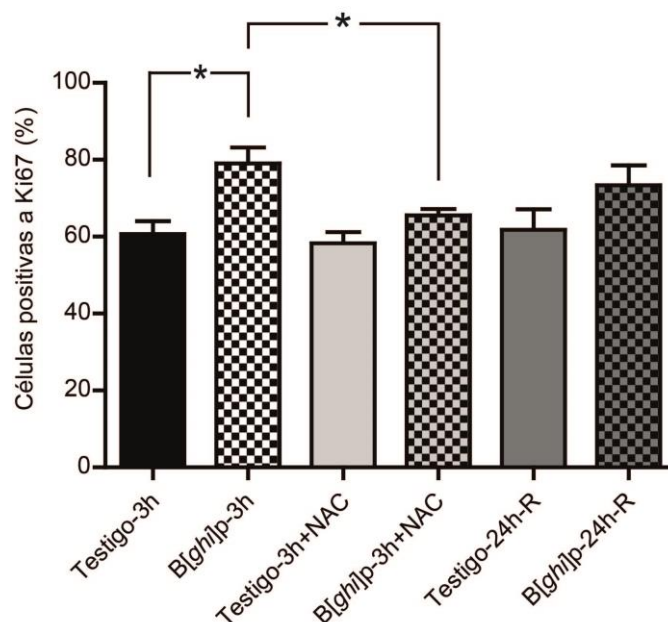


Figura 22. Incremento de la proliferación por efecto del B[ghi]p en células NL-20. Las columnas muestran el porcentaje promedio con error estándar de células positivas a Ki67 en los distintos grupos experimentales de tres experimentos independientes. Prueba de t de Student * $p < 0.05$.

Daño en el DNA que induce incremento de muerte celular o proliferación en un grupo pequeño de células

Debido a que se observó una respuesta celular versátil en presencia del B[ghi]p, se evaluaron al mismo tiempo daño al DNA, muerte y proliferación. Los análisis de citometría de flujo mostraron que el B[ghi]p causa principalmente daño al DNA. Del 76% de las células con marca positiva a la fosforilación de la H2AX, el 4 y 6% mostraron además, marca positiva para Anexina V o Ki67, respectivamente (Figura 23a, b). Como era de esperarse, las células positivas hacia Anexina V y Ki67 no se superponen (Figura 23c). Estos datos reflejan que el fenotipo predominante por la exposición a este PAH es el daño al DNA, además, existen dos poblaciones con daño al DNA que señalarán hacia muerte o hacia proliferación.

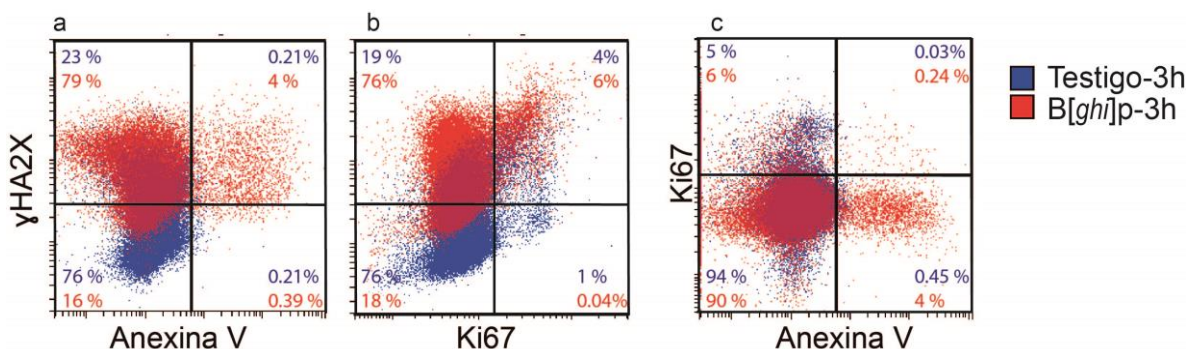


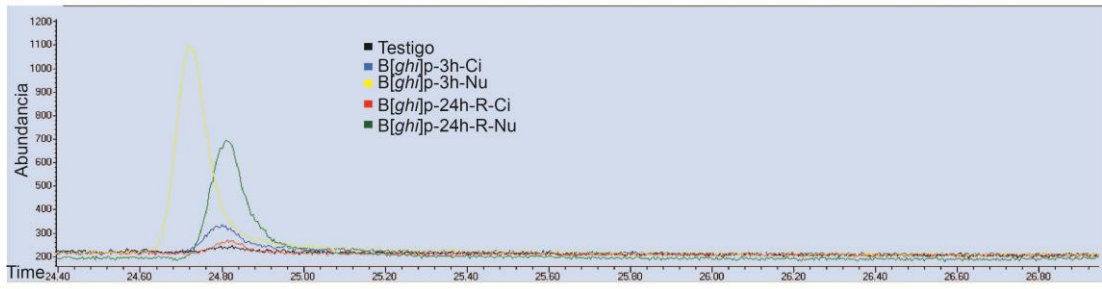
Figura 23. Análisis de daño al DNA, apoptosis y proliferación por citometría de flujo. Los marcadores para γ H2AX, Anexina V y Ki67 se analizaron simultáneamente para evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos en las células NL-20 por efecto del B[ghi]p. a) Perfil representativo de la señal de Anexina V contra γ H2AX. b) Perfil representativo de los marcadores de Ki67 contra γ H2AX. c) Perfil representativo de los marcadores para Anexina V contra Ki67. Grupos experimentales: Testigo-3h en azul y B[ghi]p-3h en rojo. Se muestran los porcentajes por cuadrantes de dichos grupos experimentales.

B[ghi]p se internaliza y se mantiene en el núcleo celular

Los resultados de dos experimentos independientes de CG-MS en los extractos de fracciones citoplasmáticas y nucleares de células expuestas a 3 h al B[ghi]p y en las de 24 h de recuperación, demostraron que el B[ghi]p se internaliza en las células y este permanece principalmente en el núcleo incluso 24 h después de su recuperación (Figura 24). Se detectaron 9.88 pg/5 μ L de B[ghi]p en la fase citoplasmática, mientras que en el núcleo se cuantificaron 117.8 pg/5 μ L B[ghi]p. Es decir, la proporción de distribución del B[ghi]p dentro de la célula fue 11 veces más en el núcleo que en citoplasma ($p < 0.001$).

En cuanto a las células que se recuperaron con medio de cultivo nuevo por 24 h posteriores a las 3 h de exposición, se detectó sólo B[ghi]p en la fase nuclear (53.89 pg/5 μ L) (Figura 24). Como testigo, en los extractos de los vehículos sólo se detectó el estándar interno, el B[ghi]p-d12 que se adicionó en todas las muestras.

a



b

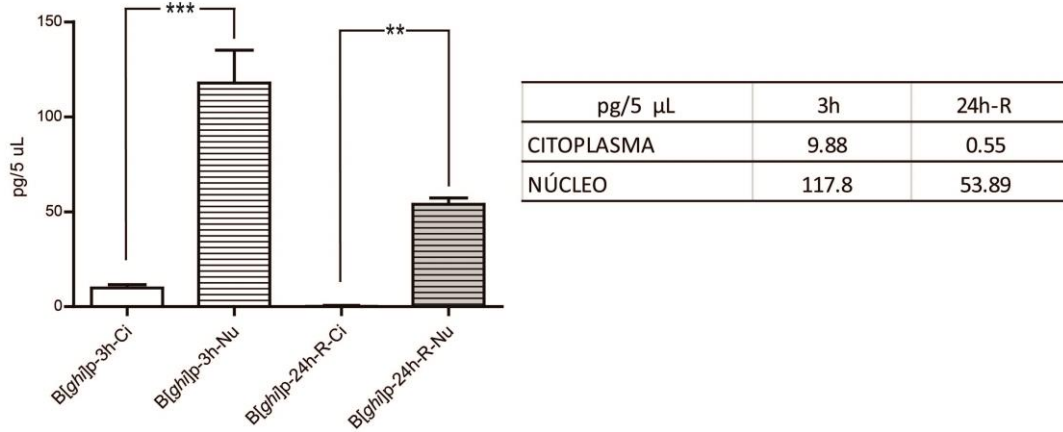


Figura 24. Cromatograma representativo de la detección del B[ghi]p en los extractos citoplasmáticos (Ci) y nucleares (Nu) de los grupos experimentales, Testigo-3h, B[ghi]p-3h y B[ghi]p-24h-R; a) Cromatograma representativo de los extractos citoplasmático y nuclear con el ion m/z 276; b) Concentración del B[ghi]p (pg/5 μ L) en los extractos citoplasmáticos y nucleares. Prueba de ANOVA Post hoc Tukey ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE RESULTADOS PRELIMINARES

Efectos genotóxicos del B[ghi]p en tiempos cortos de exposición son independientes de la vía de desintoxicación de AhR

La vía de desintoxicación de xenobióticos como los PAHs más estudiada y conocida es la vía de AhR. Sin embargo, no se sabe si daños celulares y la activación de la vía de AhR se pueden iniciar desde tiempos cortos de exposición del B[ghi]p. Para responder esto último, en este trabajo se evaluaron los daños genotóxicos y su relación con la vía de AhR a 6 y 24 h de exposición a B[ghi]p.

A pesar de la presencia del antagonista de la vía de AhR, esto no fue suficiente para evitar la disminución de la viabilidad. Una respuesta similar a lo reportado en células alveolares A549 expuestas a 2 μ M durante 14 h al B[ghi]p, en el que reportaron el 68% de viabilidad (Genies et al., 2016).

Los resultados indican que el B[ghi]p es citotóxico y posiblemente la integridad de la mitocondria de las células expuestas está comprometida, disminuyendo la cantidad de células metabólicamente activas y aumentando el estrés celular. La materia particulada (PM) y las emisiones de combustibles a la que se encuentran asociados los PAHs, se ha observado que interfieren en el funcionamiento de la mitocondria, tanto en el transporte de electrones como en la permeabilidad transitoria de la apertura del poro mitocondrial (Xia et al., 2007).

En el presente trabajo se demuestra que la genotoxicidad del B[ghi]p es independiente de la vía de AhR. Esto es congruente con otros trabajos, en donde se ha generado daño al DNA con el metabolito del B[a]p, el Benzo(a)pireno-trans-7,8-dihidrodiol-9-10-epoxido (BPDE) independientemente del proceso metabólico de la vía AhR (Hockley et al., 2007).

Cabe destacar que en otras líneas celulares como la de hepatoma H4IIE, se demostró también que el B[ghi]p es un inductor débil a AhR comparado con el agonista por excelencia TCDD, requiriéndose una concentración de 10 μ M de B[ghi]p para alcanzar el mismo efecto que se induce con tan solo 100 pM de TCDD con 6 h de exposición.

Los procesos de mutagénesis o genotoxicidad y la potencia para activar a AhR son propiedades de los PAHs que pueden ocurrir de forma independiente (Machala et al., 2001). Esto se ha demostrado con el Benzo[k]fluoranteno el cual fue un inductor potente de AhR, pero fue un genotóxico débil al producir niveles bajos de aductos en el DNA de células de epitelio alveolar de adenocarcinoma A549 (Líbalová et al., 2014).

Además, los resultados mostraron un bajo número de cometas, hecho que permite sugerir una cantidad pequeña de rompimientos de la molécula de DNA por el B[ghi]p. Este resultado sugiere que el potencial genotóxico de este PAH no es mediante la fragmentación del DNA, ya que en células de fibroblasto de pulmón de criceto V79, aún con 50 μ M se detectó baja frecuencia de cometas y poca fragmentación del DNA y no hubo cambio con activación metabólica (Platt et al., 2008).

La frecuencia de cometas inducido por la exposición al B[ghi]p es bajo aún en concentraciones diez veces más alta que la del presente trabajo (2 μ M), como se observó en linfocitos periféricos humanos, donde la exposición a este hidrocarburo produjo alrededor del 9% de cometas y con activación metabólica S9 aumentó cerca del 28% (Rodríguez-Romero et al., 2012). Sin embargo, al analizar los núcleos después de la electroforesis unicelular de las células expuestas, se observó un porcentaje importante de núcleos atípicos, con yemas (NB) tanto a las 6 h como a las 24 h de exposición. Estas anomalías del núcleo, podrían ser regiones de DNA amplificado que las células remueven durante la fase S del ciclo celular como se ha observado en células en interfase (Fenech, 2002).

Casi todos estos NB se piensa son originados de fragmentos acéntricos teloméricos o intersticiales, posiblemente representando DNA atrapado en la membrana nuclear que ha estado en él después de la división nuclear, o exceso de DNA que es excluido del núcleo y están conectados estrechamente al núcleo a través de un tallo de material nucleoplásmico. Estos eventos se han asociado con inestabilidad cromosómica (Fenech et al., 2011; Lindberg et al., 2007). Dutra y colaboradores (2010), demostraron al marcar todos los cromosomas con sondas fluorescentes y evaluar el efecto genotóxico de la zidovudine en células de mesénquima de médula ósea, que menos del 50% de los NB contiene señales positivas para uno o dos cromosomas, sin embargo, más del 50% no tienen ninguna señal de marcaje, incluso algunos tienen la presencia de centrómero (Dutra et al., 2010). Esto sugiere que los NB pueden contener fragmentos de cualquier cromosoma y además no representan solamente zonas de amplificación.

Por otra parte, los NB son biomarcadores sensibles a exposición de diversos compuestos (Nersesyan, 2005). Un ejemplo de ello son las mezclas de PAH a las que se exponen los trabajadores de hornos del carbón, en los que se incrementan 3.5 veces más los NB, que en el personal testigo. Este podría ser un biomarcador de daño cromosómico y su frecuencia podría relacionarse con el tiempo de exposición (Duan et al., 2009).

En las células NL-20 expuestas al B[ghi]p el hecho de que su aparición comience desde tiempos cortos de exposición, independiente de la vía de desintoxicación mediada por AhR, sugiere que los NB pueden funcionar como marcadores temprano de exposición al B[ghi]p.

El B[ghi]p es un PAH que no tiene regiones bahía ni golfo, como los PAHs más tóxicos, posiblemente por ello se registró un incremento discreto de la oxidación de la guanina, principalmente de la 7,8-dihidroxi-8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG). La formación de esta base oxidada es importante porque junto a otras oxidaciones de bases, si no son

reparadas, producen mutaciones durante la replicación como las transversiones (Marnett y Plastaras, 2001). Al ser daños de detección rápida, a las 24 h exposición ya se observaron niveles similares al control, como lo reportado en pulmones de ratón expuestos a humo de cigarro, donde el número máximo de 8-oxo-dG se alcanzó a las 6 h de exposición y la cantidad de estas bases oxidadas disminuyó posterior a las 20 h de recuperación, por lo que el mecanismo tipo BER actúa de manera eficiente en la reparación de estas lesiones (Thaiparambil et al., 2007).

En este trabajo se demostró que la exposición a B[*gh*]p funciona como un agente genotóxico cuyo efecto no depende de la vía de desintoxicación de AhR. El B[*gh*]p es capaz de inducir daños morfológicos a las células, disminución de viabilidad, formación de NB e induce oxidación de la guanina en la forma 8-oxo-dG.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se encontró que el B[ghi]p produce daños citotóxicos y genotóxicos en las células bronquiales humanas NL-20. Los efectos citotóxicos como la muerte celular mediada por AIF y el incremento de la proliferación, se observaron únicamente a las 3 h de exposición y son bloqueados por la inhibición de ROS. La presencia del B[ghi]p en el citoplasma puede relacionarse directamente con dichos daños. Por otro lado, los efectos genotóxicos como la formación de focos de γ H2AX producidos por el B[ghi]p independientemente de ROS después de 3 h podría estar vinculado a un daño directo con la molécula del DNA. La internalización del B[ghi]p al núcleo y su persistencia en él, son factores relacionados al daño al DNA.

Es notable que los efectos citotóxicos y la presencia del PAH en el citoplasma no duran más de 24 h después de que se desechó del medio, excepto con la formación de vesículas. Sin embargo, los focos de γ H2AX aún persisten, lo que sugiere que la presencia de B[ghi]p en el núcleo mantiene el daño genotóxico (Figura 25).

Debido a que los PAHs son compuestos altamente lipofílicos, se ha comprobado que su difusión sucede de forma pasiva en cuestión de minutos, a través de las membranas celulares hacia el citoplasma, donde pueden ser metabolizados o almacenados en organelos con una gran cantidad de lípidos, principalmente en vesículas lipídicas y en el retículo endoplasmático (de Gelder et al., 2018; Furuno et al., 2012; Gerde et al., 1997; Kang et al., 2010; Murphy et al., 2008; Subashchandrabose et al., 2014; Wild et al., 2005).

En el presente trabajo, se corroboró que a pesar de exponer las células a 2 μ M de B[ghi]p durante un tiempo corto de 3 h, las vesículas citoplasmáticas ya están presentes en algunas células, sin embargo, su presencia fue más evidente en las células recuperadas 24 h.

En otros trabajos, se ha documentado que ocurren alteraciones en la estructura y en la composición de las membranas celulares por efecto de la exposición a los PAHs (Dendele et al., 2014; Gdula-Argasinska et al., 2015; Rowan-Carroll et al., 2013). Asimismo, se comprobó que la citotoxicidad del B[a]p es producida por los cambios en la dinámica membranal y por el aumento de ROS, lo cual fue abatido añadiendo colesterol como un estabilizador de la membrana (Gorria et al., 2006). Posiblemente, el B[ghi]p podría alterar la membrana celular al atravesarla y/o generar cambios en la dinámica vesicular. La naturaleza de estas vesículas se continúa estudiando en nuestro laboratorio.

El B[ghi]p indujo cambios en el núcleo de las células de epitelio bronquial. Los núcleos atípicos y las células multinucleadas se han reportado en células expuestas a la muestra orgánica de PM_{2.5}, con gran contenido de B[ghi]p (Miguel-Pérez et al., 2013). La exposición crónica a una mezcla de PAH como Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, indeno [1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y Benzo[ghi]perileno en células epiteliales de pulmón provoca también núcleos atípicos, daño en el DNA e inestabilidad genómica (Bai et al., 2017).

El daño al DNA por exposición al B[ghi]p, principalmente se ha asociado con un aumento en la producción de ROS que provocan oxidaciones en las bases como la de la guanina (8-OHdG) (Rodríguez-Romero et al., 2012). Sin embargo, en el presente trabajo, la señal de la γ H2AX no disminuyó en presencia del antioxidante NAC, por lo que los efectos genotóxicos no son atribuibles a un aumento en la producción de ROS.

La presencia de focos de la histona γ H2AX indica que se están produciendo rompimientos de doble cadena del DNA (DSB), lo cual no disminuyó con el tiempo de recuperación. La fosforilación de la histona H2AX promueve una estructura abierta de la cromatina para

facilitar su reparación mediante los elementos de respuesta al daño al DNA (DDR). Cuando los DSB se han reparado, los focos de γ H2AX desaparecen (Bonner et al., 2008).

Se ha observado que cuando ocurre un fallo en el arresto celular y pérdida de los DDR, se pueden promover altos niveles de inestabilidad genómica (Paull et al., 2000). Debido a que la reparación de los DSB por NHEJ no depende tanto de una fase del ciclo celular como la HRE (Mjelle et al., 2015; Rossner et al., 2014), se esperaría que las células expuestas a B[ghi]p presentaran un incremento de genes como *XRCC1*, *XRCC5* y *XRCC6* desde las 3 h que se registra daño en el DNA. Sin embargo, no se observó la expresión de estos genes.

Además, los focos de γ H2AX no disminuyeron en las células recuperadas. Estos resultados representan la posibilidad de que el daño en el DNA no ha sido reparado. Además, deficiencias en la reparación, por ejemplo de las BER, pueden producir SSB intermediarios los cuales dan origen a nuevos DSB y propiciar la inestabilidad genómica (Bonner et al., 2008). No obstante, existen trabajos que sugieren la persistencia de focos después de haberse ligado los DSB (Mirzayans et al., 2006). Otra posibilidad es que la actividad transcripcional se detenga y pueda inducir la aparición de focos de γ H2AX cerca de los rompimientos de cadenas de DNA (Solovjeva et al., 2007). Y dado que el B[ghi]p siguen en el núcleo, existe la posibilidad de que éste genere constantemente DSB o esté formando aductos. Sobre su potencial para inducir dichos aductos ha sido comprobado tanto *in vitro* (Pan et al., 2013) como en un modelo animal (Labib et al., 2016). En este último trabajo, sorprendentemente se registró que B[ghi]p fue el segundo PAH más potente para formarlos.

Se ha comprobado que el B[ghi]p a una concentración de 10 μ M puede inducir focos de γ H2AX de B[ghi]p en células intestinales LS 174t y de colón Caco 2. Sin embargo, es menos genotóxico que el B[a]p (Audebert et al., 2012). Se sabe que la estructura de los

PAHs es un factor importante para su potencial mutagénico y carcinogénico (Mattsson et al., 2008). A pesar de que la H2AX se fosforila principalmente por la aparición de los DSB, también puede fosforilarse por otro tipo de daño como es la formación de aductos, como se ha reportado en células A549, posterior a las 3 h de exposición a los diol-epóxidos de B[a]p y al D[a,l]p, (Mattsson et al., 2009). Es importante resaltar que en dicho estudio se descartó la señal de la γ H2AX con DSB, por tener resultados negativos de fragmentación mediante electroforesis unicelular o “Ensayo Cometa”.

De acuerdo con los resultados obtenidos, a las 18 h de recuperación se registró incremento de la expresión de los genes que participan en la reparación como *BRCA2* (9 veces más) y *POLD1* (4 veces más), los cuales se expresan principalmente en la fase S del ciclo celular para reparar los DSB por HR (Zaboikin et al., 2017). No obstante, las células recuperadas 24 h aún presentaron la marca de la γ H2AX, indicando como se ha mencionado que la presencia del B[ghi]p en el núcleo sigue dañando el DNA. La inducción de la expresión de estos genes de HR, también podría revelar un segundo efecto vinculado a un aumento de células en la fase S como se describió en el trabajo de Chramostová y colaboradores (2004) en células hepáticas WB-F344 con 10 μ M de B[ghi]p (Chramostova et al., 2004).

El hecho de que aún persista tanto el B[ghi]p como la señal de la γ H2AX en el núcleo después del tiempo de recuperación, sugiere que existen aductos sin reparar, o rompimientos generados durante una reparación errónea o simplemente representen inestabilidad genómica como se observó con el B[a]p (Tung et al., 2014).

Es un hecho que las células NL-20 detectan el daño provocado por el B[ghi]p, lo cual lleva a un incremento en la fosforilación de la H2AX y con ello, al incremento de expresión de genes de reparación de *BRCA2*, *POLD1*, *XRCC6*, los cuales se relacionan entre otras funciones, con el mantenimiento de los telómeros (Dilley et al., 2016; Robles-Espinoza et

al., 2015; Zimmer et al., 2016). Zonas como los telómeros, son sitios más susceptibles al daño por PAH, ya que la reparación de éstos o de los sitios cercanos a ellos no es eficiente, lo que puede incrementar la inestabilidad genómica (Franceschin et al., 2012; Fumagalli et al., 2012).

Recientemente, en el trabajo de Ke y colaboradores (2018), se clasificó al B[ghi]p entre los PAHs con efecto citotóxico moderado, al incrementar del 20% al 30% la muerte celular en las células de carcinoma de epitelio alveolar (Ke et al., 2018). En el presente trabajo, el 27% de las células fueron positivas a la translocación nuclear de AIF, proceso implicado en la apoptosis independiente de caspasas y porcentaje similar a lo reportado por Genies y colaboradores (2006) en células de epitelio alveolar A549 expuestas a 2 μ M de B[ghi]p (Genies et al., 2016).

En presencia de NAC, la translocación de AIF de la mitocondria al núcleo disminuyó significativamente. Es decir, la presencia del antioxidante detiene el efecto apoptótico del B[ghi]p. Una respuesta similar a lo que ocurrió en este sistema, se ha comprobado con las células hepáticas de rata F258 expuestas al B[a]p más NAC (Huc et al., 2007).

Se ha demostrado en células de epitelio bronquial humano BEAS-2, A459 y 16HBE14o que los PAHs asociados a partículas, penetran en la mitocondria y provocan la pérdida de la permeabilidad y la muerte celular (Bansal et al., 2014; de Gelder et al., 2018; Gualtieri et al., 2009; Li et al., 2003; Petecchia et al., 2009; van der Toorn et al., 2009).

Aunque en las células con 24 h de recuperación continúa evidenciándose el daño al DNA, éste ya no produce un incremento en la apoptosis como ocurrió en el 27% de las células a 3 h, lo que puede indicar que estas células a pesar del daño ya no activan señales para apoptosis. Cabe destacar que la fragmentación de DNA evaluada con el ensayo de Tunel, fue positiva en el 40% de las células a las 3 h. La fragmentación del DNA que se visualiza

mediante esta técnica, no sólo marca los DSB asociados con apoptosis, sino también SSB con extremos 3'-OH, los cuales no necesariamente dirigirán hacia apoptosis (Kano et al., 1999). Estos SSB podrían ser reparados por enzimas como *POLB* y *POLD* que tuvieron una expresión incrementada a las 18 h. En el periodo de recuperación, parte de las células con daño (alrededor del 27%) sufrirán apoptosis y otro grupo de células (46%) mantendrán la marca de la γ H2AX sin comprometer la viabilidad de éstas..

Cuando ocurre algún estrés en las células, las señales de supervivencia consisten en una combinación entre incrementar la proliferación o el bloqueo de la apoptosis, promoviendo alteraciones en el ciclo celular. Puede ocurrir que las células escapen del arresto celular aún con daño en el DNA y se favorezca la proliferación como ocurre en las células tumorales (Serrano y D'Amours, 2014; Venkatesh et al., 2015). Se comprobó que las células expuestas al B[ghi]p proliferan y son el 82% positivas al marcador Ki67 después de 3 h de tratamiento y el 75% en las células recuperadas.

Cabe destacar que se pudo identificar en un pequeño grupo de células con la histona H2AX fosforilada que activarán su muerte celular o presentarán incremento en su proliferación. Se sabe que, ante el estrés celular, el daño permanente y la muerte que inducen agentes externos, se activan respuestas de reacción temprana mediante la modulación de genes para controlar la proliferación, transformación y apoptosis de las células expuestas a dichos xenobióticos (Devary et al., 1991; Li et al., 2015; Salcido-Neyoy et al., 2015).

Tal pareciera que el daño que genera el B[ghi]p evidenciado por la fosforilación de la H2AX y su presencia en el núcleo, no es suficiente para que las células arresten el ciclo celular y se lleve a cabo una reparación rápida y eficiente del DNA. Existe un modelo, en el que se propone que aún con el daño al DNA, las células escapan de dicho arresto y la reparación se lleva a cabo por otras vías que no dependan de éste. En cambio, en dicho

proceso se favorece la reparación hasta la fase de G2/M (Rodríguez et al., 2012, 2015). Esto podría explicar porque aún con el daño en el DNA, las células presentan el incremento de la expresión de las enzimas de reparación hasta las 18 h de recuperación. Además, en el modelo también encuentran que las células se dividen aún sin la reparación eficiente del DNA, lo que incrementa la viabilidad, pero también la inestabilidad genómica. La posibilidad de que el B[ghi]p sea un inductor de inestabilidad genómica, puede estar vinculada a su presencia y persistencia en el núcleo 24 h después de su exposición (Figura 25).

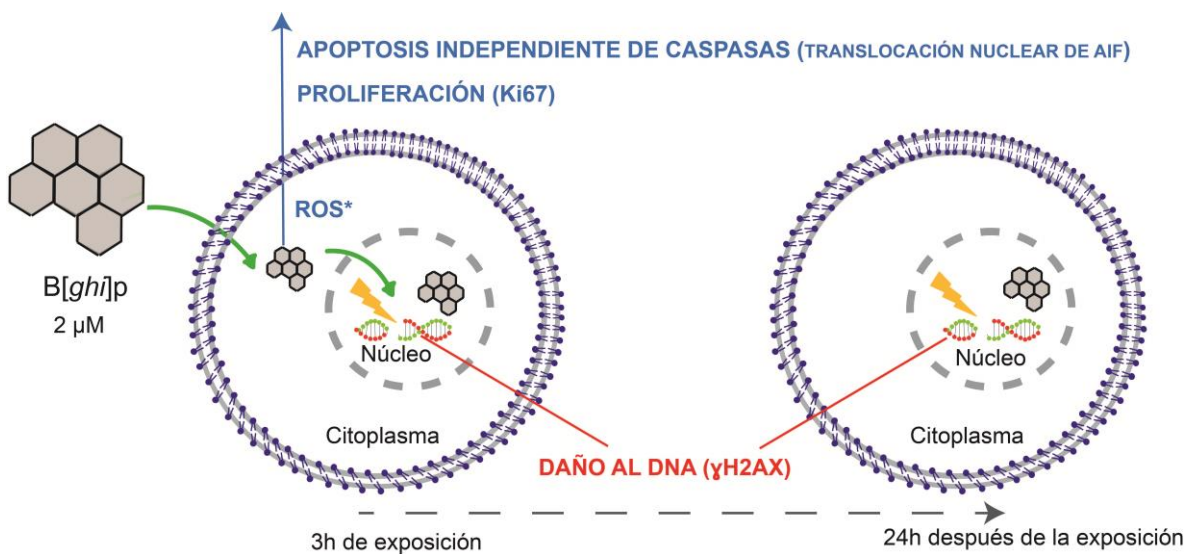


Figura 25. Modelo del efecto citotóxico y genotóxico del B[ghi]p inducidos en células bronquiales NL-20.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró que el B[ghi]p produce daños cito y genotóxicos a las células de epitelio bronquial NL-20 que fueron expuestas a dicho compuesto. Cambios en la morfología celular, la muerte celular mediada por AIF y el incremento en la proliferación se registraron desde las 3 h de exposición y se bloquearon por la inhibición de ROS. Por lo tanto, la presencia del B[ghi]p en el citoplasma puede contribuir a producir dichos daños citotóxicos. Por el contrario, la presencia de este PAH en el núcleo puede directamente ser responsable de los daños genotóxicos sobre la molécula del DNA. Además, después del tiempo de recuperación, las células mantienen el B[ghi]p solamente en el núcleo, en el cual persiste el daño, lo cual refuerza la idea de que el daño es directamente provocado por el PAH.

PERSPECTIVAS

- Es importante realizar la ultraestructura de las células expuestas a 3 h y en las células con distintos tiempos de recuperación para poder determinar el origen y las implicaciones biológicas de las vesículas citoplasmáticas. Por ser un compuesto altamente lipofílico, posiblemente podría afectar organelos como el Retículo Endoplasmático.
- Debido a que se demostró que el B[ghi]p puede generar daño en el DNA y permanecer en el núcleo de las células, es importante analizar ambos hechos con tiempos de recuperación mayores a 24 h. Además, sería importante determinar si el B[ghi]p está formando aductos con el ADN y/o con ciertas proteínas o se encuentra en una zona específica del núcleo como los telómeros y pueda causar inestabilidad genómica.
- Otro aspecto importante a estudiar son las consecuencias entre el incremento de la proliferación de las células aún con daño al DNA sin reparar y el envejecimiento de las células.
- Por último, es importante considerar que debido a la variabilidad en la respuesta celular hacia el B[ghi]p, sería fundamental para próximos estudios que las células se sincronicen el ciclo celular previamente a la exposición y se realicen análisis del transcriptoma de células únicas “*Single-cell RNA sequencing*”.

LITERATURA CITADA

- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity, *Environmental Chemistry Letters*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0>
- Abdel-Shafy, H.I. y Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Ali, R., Trump, S., Lehmann, I., Hanke, T., 2015. Live cell imaging of the intracellular compartmentalization of the contaminant benzo[a]pyrene. *J. Biophotonics* 8, 361–371. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300170>
- Amador-Munoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Miranda, J., Vera-Avila, L.E., 2011. Organic compounds of PM2.5 in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Sci. Total Environ.* 409, 1453–1465. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.026>
- 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., Murillo-Tovar, M.A., 2013. Opposing seasonal trends for polycyclic aromatic hydrocarbons and PM10: Health risk and sources in southwest Mexico City. *Atmos. Res.* 122, 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.10.003>
- Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., Fletcher, T., 2004. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 112, 970–978. <https://doi.org/10.1289/ehp.6895>
- Audebert, M., Zeman, F., Beaudoin, R., Pery, A., Cravedi, J.-P., 2012. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.022>
- Bai, H., Wu, M., Zhang, H., Tang, G., 2017. Chronic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure causes DNA damage and genomic instability in lung epithelial cells. *Oncotarget* 8, 79034–

79045. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20891>

Bansal, S., Leu, A.N., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Chowdhury, A.R., Anandatheerthavarada, H.K., Avadhani, N.G., 2014. Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* 289, 9936–9951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525659>

Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y., 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 957–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2523>

Braithwaite, E., Wu, X., Wang, Z., 1998. Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: Involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* 19, 1239–1246. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.7.1239>

Burdick, A.D., Davis, J.W. 2nd, Liu, K.J., Hudson, L.G., Shi, H., Monske, M.L., Burchiel, S.W., 2003. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63, 7825–7833.

Buterin, T., Hess, M.T., Luneva, N., Geacintov, N.E., Amin, S., Kroth, H., Seidel, A., Naegeli, H., 2000. Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer Res.* 60, 1849–1856.

Chramostova, K., Vondracek, J., Sindlerova, L., Vojtesek, B., Kozubik, A., Machala, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.12.008>

Das, S. k. M.& N., 2017. Biodegradation of perylene and benzo[ghi]perylene (5-6 rings) using yeast consortium: Kinetic study, enzyme analysis and degradation pathway. *J. Environ. Biol.* 39, 5–15. <https://doi.org/http://doi.org/10.22438/jeb/39/1/MRN-540>

Dat, N.D. y Chang, M.B., 2017. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies. *Sci. Total Environ.* 609, 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.204>

- de Gelder, S., Sundh, H., Pelgrim, T.N.M., Rasinger, J.D., van Daal, L., Flik, G., Berntssen, M.H.G., Klaren, P.H.M., 2018. Transepithelial transfer of phenanthrene, but not of benzo[a]pyrene, is inhibited by fatty acids in the proximal intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 204, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.006>
- Dendele, B., Tekpli, X., Hardonniere, K., Holme, J.A., Debure, L., Catheline, D., Arlt, V.M., Nagy, E., Phillips, D.H., Ovrebo, S., Mollerup, S., Poet, M., Chevanne, M., Rioux, V., Dimanche-Boitrel, M.-T., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., 2014. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chem. Biol. Interact.* 207, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.002>
- Desler, C., Johannessen, C., Rasmussen, L.J., 2009. Repair of DNA damage induced by anthanthrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) without bay or fjord regions. *Chem. Biol. Interact.* 177, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.056>
- Deutsch-Wenzel, R.P., Brune, H., Grimmer, G., Dettbarn, G., Misfeld, J., 1983. Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 539–44. <https://doi.org/10.1093/jnci/71.3.539>
- Devary, Y., Gottlieb, R.A., Lau, L.F., Karin, M., 1991. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2804–2811.
- Dilley, R.L., Verma, P., Cho, N.W., Winters, H.D., Wondisford, A.R., Greenberg, R.A., 2016. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* 539, 54–58. <https://doi.org/10.1038/nature20099>
- Duan, H., Leng, S., Pan, Z., Dai, Y., Niu, Y., Huang, C., Bin, P., Wang, Y., Liu, Q., Chen, W., Zheng, Y., 2009. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 677, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.06.002>
- Dutra, A., Pak, E., Wincovitch, S., John, K., Poirier, M.C., Olivero, O.A., 2010. Nuclear bud formation: A novel manifestation of zidovudine genotoxicity. *Cytogenet. Genome Res.* 128,

- 105–110. <https://doi.org/10.1159/000298794>
- Ewa, B. y Danuta, M.Š., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.* 58, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
- Fenech, M., 2002. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 181–182, 411–416. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00480-8)
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Franceschin, M., Rizzo, A., Casagrande, V., Salvati, E., Alvino, A., Altieri, A., Ciammaichella, A., Iachettini, S., Leonetti, C., Ortaggi, G., Porru, M., Bianco, A., Biroccio, A., 2012. Aromatic core extension in the series of N-cyclic bay-substituted perylene G-quadruplex ligands: increased telomere damage, antitumor activity, and strong selectivity for neoplastic over healthy cells. *ChemMedChem* 7, 2144–2154. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200348>
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., Herbig, U., Longhese, M.P., d'Adda di Fagagna, F., 2012. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* 14, 355–365. <https://doi.org/10.1038/ncb2466>
- Furuno, S., Foss, S., Wild, E., Jones, K.C., Semple, K.T., Harms, H., Wick, L.Y., 2012. Mycelia Promote Active Transport and Spatial Dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5463–5470. <https://doi.org/10.1021/es300810b>
- Gao, P., Hou, L., Denslow, N.D., Xiang, P., Ma, L.Q., 2018. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons : Metabolomics perspective. *Environ. Int.* 119, 466–477. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.017>
- Gdula-Argasinska, J., Czepiel, J., Toton-Zuranska, J., Jurczyszyn, A., Perucki, W., Wolkow, P., 2015. Docosahexaenoic acid regulates gene expression in HUVEC cells treated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* 236, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.05.002>

- Genies, C., Jullien, A., Lefebvre, E., Revol, M., Maitre, A., Douki, T., 2016. Inhibition of the formation of benzo[a]pyrene adducts to DNA in A549 lung cells exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Vitr.* 35, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.05.006>
- Gerde, P., Muggenburg, B.A., Thornton-Manning, J.R., Lewis, J.L., Pyon, K.H., Dahl, A.R., 1997. Benzo[a]pyrene at an environmentally relevant dose is slowly absorbed by, and extensively metabolized in, tracheal epithelium. *Carcinogenesis* 18, 1825–1832.
- Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., 2006. Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in F258 cells: protection by exogenous cholesterol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090, 108–112. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.011>
- Gualtieri, M., Mantecca, P., Corvaja, V., Longhin, E., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Camatini, M., 2009. Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). *Toxicol. Lett.* 188, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.003>
- Gurbani, D., Bharti, S.K., Kumar, A., Pandey, A.K., Ana, G.R.E.E., Verma, A., Khan, A.H., Patel, D.K., Mudiam, M.K.R., Jain, S.K., Roy, R., Dhawan, A., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 553–565. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.04.001>
- Henkler, F., Stolpmann, K., Luch, A., 2012. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *Exp. Suppl.* 101, 107–131. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_5
- Hesham A, Khan S, Liu X, Zhang Y, Wang Z, Y.M., 2006. Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Wiley Interisci.* 23, 879–887. <https://doi.org/10.1002/yea.1401>
- Hockley, S.L., Arit, V.M., Brewer, D., te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., Phillips, D.H., 2007. AHR- and DNA-Damage-Mediated Gene Expression Responses Induced by Benzo(a)pyrene

- in Human Cell Lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810. <https://doi.org/10.1021/tx700252n>
- Hsu, G.W., Huang, X., Luneva, N.P., Geacintov, N.E., Beese, L.S., 2005. Structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a benzo[a]pyrene adduct that blocks replication. *J. Biol. Chem.* 280, 3764–3770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411276200>
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J.A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D., 2007. c-Jun NH2-terminal kinase-related Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67, 1696–1705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2327>
- Hughes, N.C., Phillips, D.H., 1993. 32P-postlabelling analysis of the covalent binding of benzo[ghi]perylene to DNA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* 14, 127–133.
- IARC, 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *Iarc Monogr. Eval. Carcinog. Risks To Humans* 92, 1–868. <https://doi.org/10.1002/14356007.a04>
- Iwai, K., Adachi, S., Takahashi, M., Moller, L., Udagawa, T., Mizuno, S., Sugawara, I., 2000. Early oxidative DNA damages and late development of lung cancer in diesel exhaust-exposed rats. *Environ. Res.* 84, 255–264. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4072>
- Kang, F., Chen, D., Gao, Y., Zhang, Y., 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biol.* 10, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-210>
- Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., Fujiwara, H., 1999. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 99, 2757–2764.
- Ke, S., Liu, Q., Yao, Y., Zhang, X., Sui, G., 2018. An in vitro cytotoxicities comparison of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human pulmonary alveolar epithelial cells HPAEpiC. *Toxicol. Lett.* 290, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.03.005>
- Khoury, L., Zalko, D., Audebert, M., 2015. Complementarity of phosphorylated histones H2AX and

- H3 quantification in different cell lines for genotoxicity screening. *Arch. Toxicol.*
<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1599-1>
- Kropachev, K., Kolbanovskiy, M., Liu, Z., Cai, Y., Zhang, L., Schwaid, A.G., Kolbanovskiy, A., Ding, S., Amin, S., Broyde, S., Geacintov, N.E., 2013. Adenine-DNA adducts derived from the highly tumorigenic dibenzo[a,l]pyrene are resistant to nucleotide excision repair while guanine adducts are not. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 783–793. <https://doi.org/10.1021/tx400080k>
- Labib, S., Williams, A., Guo, C.H., Leingartner, K., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Yauk, C.L., White, P.A., Halappanavar, S., 2016. Comparative transcriptomic analyses to scrutinize the assumption that genotoxic PAHs exert effects via a common mode of action. *Arch. Toxicol.* 90, 2461–2480. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1595-5>
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111, 455–460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>
- Li, R., Kou, X., Geng, H., Xie, J., Yang, Z., Zhang, Y., Cai, Z., Dong, C., 2015. Effect of ambient PM(2.5) on lung mitochondrial damage and fusion/fission gene expression in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 408–418. <https://doi.org/10.1021/tx5003723>
- Líbalová, H., Krčková, S., Uhlířová, K., Milcová, A., Schmuczerová, J., Ciganek, M., Kléma, J., Machala, M., Šrám, R.J., Topinka, J., 2014. Genotoxicity but not the AhR-mediated activity of PAHs is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. *Toxicol. Lett.* 225, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.028>
- Lin, C.-Y., Huang, F.-P., Ling, Y.S., Liang, H.-J., Lee, S.-H., Hu, M.-Y., Tsao, P.-N., 2015. Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics to characterize the biochemical effects of naphthalene on various organs of tolerant mice. *PLoS One* 10, e0120429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120429>
- Lindberg, H.K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G.C.M., Norppa, H., Fenech, M., 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 617, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.002>
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Long, A.S., Lemieux, C.L., Arlt, V.M., White, P.A., 2016. Tissue-specific in vivo genetic toxicity of nine polycyclic aromatic hydrocarbons assessed using the MutaTMMouse transgenic rodent assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 290, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.010>
- Luben, T.J., Stanek, L.W., Buckley, B.J., Sacks, J.D., Johns, D.O., Ross, M., Brown, J.S., 2010. Particulate Matter–Induced Health Effects: Who Is Susceptible? *Environ. Health Perspect.* 119, 446–454. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002255>
- Ma, J., Zhao, Y., Wu, Z., Tych, W., Mindham, D., Sverko, E., Barresi, E., Dryfhout-clark, H., Fellin, P., Hung, H., 2019. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Not Declining in Arctic Air Despite Global Emission Reduction , II. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05353>
- Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganek, M., Neča, J., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 497, 49–62. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00240-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00240-6)
- Marnef, A. y Legube, G., 2017. Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Curr. Opin. Cell Biol.* 46, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.003>
- Marnett, L.J., Plastaras, J.P., 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 17, 214–221. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02239-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02239-9)
- Martinelli, N., Olivieri, O., Girelli, D., 2013. Air particulate matter and cardiovascular disease: A narrative review. *Eur. J. Intern. Med.* 24, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.04.001>
- Mattsson, Å., Malmlöf, M., Seidel, A., Stenius, U., Jernström, B., 2008. H2AX, MDM2 and P53 phosphorylation are difernetly affected by Bay- and Fjord-region diol epoxides derived from carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl. Aromat. Compd.* 28, 392–401. <https://doi.org/10.1080/10406630802374937>
- Mattsson, A., Jernstrom, B., Cotgreave, I.A., Bajak, E., 2009. H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene diol epoxides. *Chem. Biol. Interact.* 177, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.015>
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the

- environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278–1284. <https://doi.org/10.1021/es00031a002>
- Miguel-Pérez, G., Maya, G., Flores-Márquez, A.R., Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Eguía-Aguilar, P., Pérezpeña-Díazconti, M., Arenas-Huertero, F., 2013. Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón . *Boletín médico del Hosp. Infant. México* .
- Mirzayans, R., Severin, D., Murray, D., 2006. Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66, 1498–1505. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.08.064>
- Mjelle, R., Hegre, S.A., Aas, P.A., Slupphaug, G., Drablos, F., Saetrom, P., Krokan, H.E., 2015. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *DNA Repair (Amst)*. 30, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.03.007>
- Mladenov, E. y Iliakis, G., 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005>
- Mumtaz, M.M., George, J.D., Gold, K.W., Cibulas, W., DeRosa, C.T., 1996. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol. Ind. Health* 12, 742–971. <https://doi.org/10.1177/074823379601200601>
- Murphy, G.J., Rouse, R.L., Polk, W.W., Henk, W.G., Barker, S.A., Boudreaux, M.J., Floyd, Z.E., Penn, A.L., 2008. Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in respiratory cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 532–540. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0204OC>
- Nadkarni, A., Burns, J.A., Gandolfi, A., Chowdhury, M.A., Cartularo, L., Berens, C., Geacintov, N.E., Scicchitano, D.A., 2016. Nucleotide excision repair and transcription-coupled DNA repair abrogate the impact of DNA damage on transcription. *J. Biol. Chem.* 291, 848–861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685271>
- Nersesyan, A.K., 2005. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 588, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.06.010>

- Pan, S., Li, D., Zhao, L., Schenkman, J.B., Rusling, J.F., 2013. Genotoxicity-related chemistry of human metabolites of benzo[ghi]perylene (B[ghi]P) investigated using electro-optical arrays and DNA/microsome biocolloid reactors with LC-MS/MS. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1229–1239. <https://doi.org/10.1021/tx400147c>
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895.
- Petecchia, L., Sabatini, F., Varesio, L., Camoirano, A., Usai, C., Pezzolo, A., Rossi, G.A., 2009. Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Chest* 135, 1502–1512. <https://doi.org/10.1378/chest.08-1780>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- 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. <https://doi.org/10.1021/tx049698a>
- Platt, K.L., Aderhold, S., Kulpe, K., Fickler, M., 2008. Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions. *Mutat. Res.* 650, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.09.011>
- Platt, K.L., Grupe, S., Fickler, M., 2008. The 3,4-oxide is responsible for the DNA binding of benzo[ghi]perylene, a polycyclic aromatic hydrocarbon without a “classic” bay-region. *Chem. Biol. Interact.* 176, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.07.010>
- Poirier, M.C., 2016. Linking DNA adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis. *Environ. Mol. Mutagen* 57, 499–507. <https://doi.org/10.1002/em.22030>
- Qiao, Y., Li, Q., Du, H.Y., Wang, Q.W., Huang, Y., Liu, W., 2017. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.160>
- Quinn, A.M., Harvey, R.G., Penning, T.M., 2008. Oxidation of PAH trans-dihydrodiols by human

- aldo-keto reductase AKR1B10. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 2207–2215.
<https://doi.org/10.1021/tx8002005>
- Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillen, M.D., Schneider, K., Weyand, E.H., 2004. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Toxicol.* 23, 301–333. <https://doi.org/10.1080/10915810490517063>
- Risom, L., Dybdahl, M., Bornholdt, J., Vogel, U., Wallin, H., Møller, P., Loft, S., 2003. Oxidative DNA damage and defense gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis* 24, 1847–1852.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgg144>
- Robles-Espinoza, C.D., Velasco-Herrera, M. del C., Hayward, N.K., Adams, D.J., 2015. Telomere-regulating genes and the telomere interactome in familial cancers. *Mol. Cancer Res.* 13, 211–222. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0305>
- Rodríguez, A., Sosa, D., Torres, L., Molina, B., Frías, S., Mendoza, L., 2012. A Boolean network model of the FA / BRCA pathway 28, 858–866. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts036>
- Rodríguez, A., Torres, L., Juárez, U., Sosa, D., Azpeitia, E., Teresa, B.G., Cortés, E., Ortiz, R., Salazar, A.M., Ostrosky-wegman, P., Mendoza, L., Frías, S., 2015. Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theor. Biol. Med. Model.* 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0011-4>
- Rodríguez-Romero M.I., Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R., Martínez-Valenzuela C.J., Calderón-Ezquerro M. del C., García-Martínez R.A., Cubillos F., Calderón-Segura M. E., 2012. Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol. Mech. Methods* 22, 170–183. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.623330>
- Roos, W.P. y Kaina, B., 2013. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237–248.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>
- Rossner, P.J., Rossnerova, A., Beskid, O., Tabashidze, N., Libalova, H., Uhlirova, K., Topinka, J.,

- Sram, R.J., 2014. Nonhomologous DNA end joining and chromosome aberrations in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. *Mutat. Res.* 763–764, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.03.006>
- Rowan-Carroll, A., Halappanavar, S., Williams, A., Somers, C.M., Yauk, C.L., 2013. Mice exposed in situ to urban air pollution exhibit pulmonary alterations in gene expression in the lipid droplet synthesis pathways. *Environ. Mol. Mutagen.* 54, 240–249. <https://doi.org/10.1002/em.21768>
- Ruby, M. V., Lowney, Y.W., Bunge, A.L., Roberts, S.M., Gomez-Eyles, J.L., Ghosh, U., Kissel, J.C., Tomlinson, P., Menzie, C., 2016. Oral Bioavailability, Bioaccessibility, and Dermal Absorption of PAHs from Soil - State of the Science. *Environ. Sci. Technol.* 50, 2151–2164. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04110>
- Salcido-Neyoy, M.E., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsebatt, M.E., Melendez-Zajgla, J., Morales-Barcenas, R., Petrosyan, P., Molina-Servin, E.D., Vega, E., Manzano-Leon, N., Garcia-Cuellar, C.M., 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM₁₀) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Pollut.* 203, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.051>
- Samara, C., Kouras, A., Kaidoglou, K., Emmanouil-Nikoloussi, E.-N., Simou, C., Bousnaki, M., Kelessis, A., 2015. Ultrastructural alterations in the mouse lung caused by real-life ambient PM₁₀ at urban traffic sites. *Sci. Total Environ.* 532, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.139>
- Serrano, D., D'Amours, D., 2014. When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo kinases in cellular adaptation to DNA damage. *Syst. Synth. Biol.* 8, 195–203. <https://doi.org/10.1007/s11693-014-9151-9>
- Sharovskaya, J., Kobliakova, I., Solomatina, N., Kobliakov, V., 2006. Effect of some carcinogenic and non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junction intercellular communication in hepatoma cell cultures. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.11.006>
- Solovjeva, L. V, Svetlova, M.P., Chagin, V.O., Tomilin, N. V, 2007. Inhibition of transcription at radiation-induced nuclear foci of phosphorylated histone H2AX in mammalian cells.

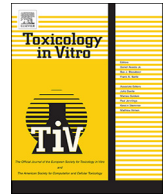
- Chromosome Res. 15, 787–797. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1162-x>
- Subashchandrabose, S.R., Krishnan, K., Gratton, E., Megharaj, M., Naidu, R., 2014. Potential of fluorescence imaging techniques to monitor mutagenic PAH uptake by microalga. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9152–9160. <https://doi.org/10.1021/es500387v>
- Sugasawa, K., 2011. Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. *Biochem.* 76, 16–23. <https://doi.org/10.1134/s0006297911010044>
- Svilar, D., Goellner, E.M., Almeida, K.H., Sobol, R.W., 2011. Base excision repair and lesion-dependent subpathways. *Antioxidants Redox Signal.* 14, 2491–2507.
- Thaiparambil, J.T., Vadhanam, M. V., Srinivasan, C., Gairola, C.G., Gupta, R.C., 2007. Time-dependent formation of 8-oxo-deoxyguanosine in the lungs of mice exposed to cigarette smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1737–1740. <https://doi.org/10.1021/tx700289g>
- Toyooka, T., Ibuki, Y., Koike, M., Ohashi, N., Takahashi, S., Goto, R., 2004. Coexposure to benzo[a]pyrene plus UVA induced DNA double strand breaks: Visualization of Ku assembly in the nucleus having DNA lesions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.174>
- Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamato, H., Tanaka, I., Sagai, M., Hirano, H., Nagata, N., Itoh, H., Kasai, H., 1999. Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 20, 1573–1576. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.8.1573>
- Tung, E.W.Y., Philbrook, N.A., Belanger, C.L., Ansari, S., Winn, L.M., 2014. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 760, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.003>
- Uribe-Hernandez, R., Vega-Barrita, M.L., Uribe-Vega, E., Ramon-Gallegos, E., 2019. Analysis of DNA Damage Biomarkers in Human Leukocytes by PAHs Exposure. *Asian J. Res. Biochem.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.9734/AJRB/2018/45967>
- van der Toorn, M., Rezayat, D., Kauffman, H.F., Bakker, S.J.L., Gans, R.O.B., Koëter, G.H., Choi, A.M.K., van Oosterhout, A.J.M., Slebos, D.-J., 2009. Lipid-soluble components in cigarette

- smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, L109–L114. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90461.2008>
- van Sluis, M., McStay, B., 2015. A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes Dev.* 29, 1151–1163. <https://doi.org/10.1101/gad.260703.115>
- Venkatesh, H.N., Jeru Manoj, M., Ghosh, D. et al. *I.J.E.S.T.* (2015) 12: 2415. <https://doi.org/10.1007/s1376-015-0790-5>, 2015. Environmental pollutants leading to carcinogenesis: process of natural selection of human cells due to chronic inflammation and sustained stress environment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 2415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13762-015-0790-5>
- Wang, F.P., Zhu, X.N., Zhang, Z.B., Chen, L.P., Fan, J.L., Li, Q.Y., Chen, S., Chen, W., 2017. [The relationship between histone H3Ser10 phosphorylation and DNA damage in periphery blood lymphocytes of polycyclic aromatic hydrocarbons exposed workers]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 51, 421–426. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2017.05.010>
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O., Jones, K.C., 2005. Real-time visualization and quantification of PAH photodegradation on and within plant leaves. *Environ. Sci. Technol.* 39, 268–273.
- Xia, T., Kovoichich, M., Nel, A.E., 2007. Division of Clinical Immunology and Allergy, Department of Medicine; Southern California Particle Center and Supersite, University of California, Los Angeles, CA 1238–1246.
- Yan, C., Lu, J., Zhang, G., Gan, T., Zeng, Q., Shao, Z., Duerksen-Hughes, P.J., Yang, J., 2011. Benzo[a]pyrene induces complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM, ATR, and DNA-PK. *Toxicol. In Vitro* 25, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.012>
- Yan, S., Sorrell, M., Berman, Z., 2014. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3951–3967. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1666-4>
- Zaboikin, M., Zaboikina, T., Freter, C., Srinivasakumar, N., 2017. Non-Homologous End Joining and

Homology Directed DNA Repair Frequency of Double-Stranded Breaks Introduced by Genome Editing Reagents. PLoS One 12, e0169931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169931>

- Zaragoza-Ojeda, M., Eguía-Aguilar, P., Perezpeña-Díazconti, M., Arenas-Huertero, F., 2016. Benzo[ghi]perylene activates the AHR pathway to exert biological effects on the NL-20 human bronchial cell line. *Toxicol. Lett.* 256, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.05.023>
- Zimmer, J., Tacconi, E.M.C., Folio, C., Badie, S., Porru, M., Klare, K., Tumiat, M., Markkanen, E., Halder, S., Ryan, A., Jackson, S.P., Ramadan, K., Kuznetsov, S.G., Biroccio, A., Sale, J.E., Tarsounas, M., 2016. Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds. *Mol. Cell* 61, 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.004>

APÉNDICE
(ARTÍCULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO)



Cytotoxic and genotoxic effects of Benzo[ghi]perylene on the human bronchial cell line NL-20

Zelmy Castro-Gálvez^a, Mónica Garrido-Armas^a, Margarita Isabel Palacios-Arreola^d,
Ulises Torres-Flores^a, Guadalupe Rivera-Torruco^{b,e,f}, Ricardo Valle-Rios^{b,e},
Omar Amador-Muñoz^d, Abrahan Hernández-Hernández^{a,c}, Francisco Arenas-Huertero^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación en Patología Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico

^b Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Colonia Doctores, 06720 Ciudad de México, Mexico

^c Unidad de Biología de Células Individuales (Biocelín), Laboratorio de Investigación en Patología Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico

^d Laboratorio de Especiación Química de Aerosoles Orgánicos Atmosféricos y Desarrollo de Tecnologías Verdes, Departamento de Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

^e Unidad Universitaria de Investigación, División de Investigación, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^f Departamento de Fisiología y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Benzo[ghi]perylene
DNA damage
γH2AX foci
Caspase-independent apoptosis
Cell proliferation
Permanent DNA damage

ABSTRACT

Benzo[ghi]perylene is the most abundant polycyclic aromatic hydrocarbon in the atmosphere of highly polluted cities with high altitudes like Mexico City. We evaluated the *in vitro* cytotoxic and genotoxic effects that Benzo[ghi]perylene could induce to the bronchial cell line NL-20 after 3 h of exposure. Furthermore, exposed cells were washed and maintained for 24 h without the treatment (recovery time), in order to evaluate a persistent damage to the cells. We found that at 3 h of exposure, 20% and 47% of the cells displayed cytoplasmic vesicles ($p < 0.05$) and γH2AX foci in the nuclei ($p < 0.05$), respectively. Furthermore, 27% of cells showed translocation of the factor inductor apoptosis into the nuclei ($p < 0.05$) and an increase of proliferating cells was also observed (21%, $p < 0.05$). The cells after recovery time continued displaying morphological changes and γH2AX foci, despite of the increased expression (> 2 -times fold change) of some DNA repair genes ($p < 0.05$) found before the recovery time. We also found that the cell nuclei contained Benzo[ghi]perylene after the exposure and it remains there after the recovery time ($p < 0.01$). Therefore, hereby we report the cytotoxic and genotoxic effects that Benzo[ghi]perylene is capable to induce to NL-20 cells.

1. Introduction

The atmosphere of cities with high pollution contains urban particulate matter with a diameter of 2.5 μm (PM_{2.5}) with organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). PAHs are considered a health risk, mainly due to their association with increased morbidity and mortality from acute and chronic cardiopulmonary diseases to lung cancer (Salcido-Neyoy et al., 2015). Several studies carried out both *in vitro* and *in vivo* have revealed that PAH cause cellular morphological changes such as atypical nuclei, the presence of cytoplasmic vesicles, the accumulation of lipid-protein droplets, a vacuolated cytoplasm, structural alterations in the mitochondria, dilatation of the ER, and changes in the structure and dynamics of membrane lipids (Ali et al., 2015; Gdula-Argasinska et al., 2015; Gualtieri et al., 2009; Li

et al., 2003; Lin et al., 2015; Miguel-Pérez et al., 2013; Samara et al., 2015; Subashchandrabose et al., 2014; Zaragoza-Ojeda et al., 2016). It has been shown that diffusion of PAHs occurs passively through the cell membrane, once in the cytoplasm this hydrocarbon can be metabolized or stored in organelles with a large amount of lipids, vesicles and endoplasmic reticulum (de Gelder et al., 2018; Furuno et al., 2012; Gerde et al., 1997; Kang et al., 2010; Murphy et al., 2008; Subashchandrabose et al., 2014; Wild et al., 2005).

In cities highly polluted like Mexico City, Benzo[ghi]perylene (B[ghi]p) is the most abundant PAH in its atmosphere; it is generated mainly by the incomplete combustion of gasoline in vehicles engines (Amador-Munoz et al., 2011). The airways are the main route of entry into the human body of PAHs, which accumulate mostly in the lungs (Armstrong et al., 2004). The updated 2010 IARC (International Agency

* Corresponding author.

E-mail address: farenashuertero@yahoo.com.mx (F. Arenas-Huertero).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104645>

Received 13 March 2019; Received in revised form 26 July 2019; Accepted 7 September 2019

Available online 10 September 2019

0887-2333/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Experimental design and groups.

Group	Experimental design
Control-3 h	NL-20 cells cultured in medium (HAM-F12) plus 0.0056% DMSO (vehicle) for 3 h.
B[ghi]p-3 h	NL-20 cells cultured in medium (HAM-F12) plus 2 μ M B[ghi]p in 0.0056% DMSO for 3 h
Control-24 h-R	NL-20 cells cultured in medium (HAM-F12) plus 0.0056% DMSO for 3 h and then cultured for 24 h with the culture medium alone.
B[ghi]p-24 h-R	NL-20 cells cultured and exposed as the B[ghi]p-3 h group followed by a recovery time of 24 h, with the cells cultured in medium alone.

for research of cancer) report, established that B[ghi]p is a non-carcinogenic compound to humans; however, such report was based on the results of studies of mice exposed to this PAH by cutaneous application that were carried out almost 30 years before (Deutsch-Wenzel et al., 1983). It should be noted that the formation of epidermoid sarcomas was recorded only in 11% of the rats to which 4 mg of B[ghi]p was applied *via* intrapulmonary, whereas 1 mg of Benzo[a]perylene (B[a]p) produced tumors in 94% of the rats (Deutsch-Wenzel et al., 1983). However, B[ghi]p produced mutagenicity in the Ames test with exogenous metabolic system (Platt and Grupe, 2005) and in the MutaTM-Mouse rodent assay (Long et al., 2016).

There are several studies *in vitro* and *in vivo* that have shown that B[ghi]p can induce the formation of stable adducts in the DNA (Hughes and Phillips, 1993; Labib et al., 2016; Long et al., 2016; Pan et al., 2013). More recent studies have also shown that B[ghi]p produces the metabolites 3,4-oxide B[ghi]p and 3, 4, 11, 12 dioxide B[ghi]p, both of which are may form stable adducts with guanine and adenine (Pan et al., 2013). Furthermore, B[ghi]p can cause DNA fragmentation (Platt et al., 2008), guanine oxidation (Isabel et al., 2012) and presence of H2AX phosphorylation (γ H2AX) foci (Audebert et al., 2012; Hughes and Phillips, 1993; Labib et al., 2016; Pan et al., 2013).

In mice exposed to B[ghi]p by oral gavage, it was shown that this HAP can cause alterations in processes related to endocytosis, intracellular transport, lipid and amino acid metabolism, proteolysis and in the Wntless pathway (Wnt) (Labib et al., 2016). In a previous work from our group, Zaragoza-Ojeda et al. (2016) found morphological changes in cytoplasm, oxidative stress and the activation of the Ah receptor (AhR) in a bronchial cell line exposed to three different concentrations of B[ghi]p for 48 h. However, the cytotoxic and genotoxic effects of B[ghi]p during acute exposure in this system are still unknown. In the present study we found that B[ghi]p is cytotoxic, genotoxic and that it remains in the nucleus despite of recovery time of the cells for 24 h.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Analytical standard of B[ghi]p with chemical purity 98% (CAS 191-24-2) was provided by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) obtained by Sigma-Aldrich. Also, *N*-acetyl-cysteine (NAC) was obtained by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Primary antibodies anti γ H2AX, AIF and H4 were purchased from Merc Millipore (Frankfurter, Germany), R&D systems (Minneapolis, Minnesota, USA) and Abcam (Cambridge, MA, USA), respectively. Secondary antibodies Alexa Flour[®] 594, Alexa Flour[®]488, FITC were obtained from Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA), Abcam (Cambridge, MA USA) and Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA), respectively. Secondary antibody anti-rabbit (IgG-HRP) was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). Mounting medium Vectashield was obtained from Vector Laboratoires (Burlingame, California USA). Bradford protein assay, 4 \times Laemmli Sample Buffer, nonfat dry milk and PVDF membranes were purchased from BioRad (Hercules, CA, USA). ECL Prime Western Blotting Detection reagent was purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). First strand cDNA kit, Maxima SYBR Green qPCR and protein inhibitor cocktail

were provided by Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA); DeadEnd Colorimetric TUNEL System kit was purchased from PROMEGA (Madison, Wisconsin, USA); Muse[™] MultiCaspase kit and Muse[™] Ki67 Proliferation Kit were obtained from Millipore (Burlington, Massachusetts, USA); APC Annexin V Apoptosis Detection kit with 7-ADD and Ki67 Alexa Flour 647 were provided by BioLegend (San Diego, California, USA).

2.2. Cell culture

Human bronchial epithelial non-tumoral cell line NL-20 (CRL-2503) was obtained from the American Type Culture Collection, (ATCC[®] CRL2503). NL-20 cells were cultured in HAM-F12 medium supplemented with 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 5 μ g/mL of insulin, 10 ng/mL of epidermal growth factor, 1 μ g/mL of transferrin, 500 ng/mL of hydrocortisone, 100 μ g/mL of streptomycin sulfate and 100 μ g/mL of penicillin/streptomycin, under the following conditions: 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ and relative humidity. The cells were detached from dishes using 0.025% trypsin for 10 min and they were centrifuged at 1300 rpm for 8 min.

2.3. B[ghi]p preparation and cell exposure

One mg of B[ghi]p was dissolved in 100 μ L DMSO and this stock solution was diluted in the culture medium to a final concentration of 2 μ M. The NL-20 cells were exposed to B[ghi]p according to the experimental scheme depicted in Table 1.

All experiments were performed in three independent biological experiments and the results were obtained by triplicate (technical replicates) of each biological experiment. In order to verify whether the cytotoxic and genotoxic effects of B[ghi]p were due to oxidative stress, cells were exposed to 10 mM of the glutathione precursor *N*-acetyl-cysteine (NAC) and then subjected to the experimental scheme described above. Experimental groups thus are named the same than in Table 1 but with the +NAC suffix after the group name.

2.4. Analysis of vesicles appearance

6×10^4 cells were seeded on sterile coverslips. Subsequently, they were exposed to B[ghi]p under the previously described exposure scheme and afterwards were fixed with absolute methanol at -20° C for 5 min. Coverslips with cells were allowed to dry, and were then stained with 500 μ L of Giemsa dye [1:10] for 10 min. They were washed to remove the excess dye and allowed to dry before mounting them onto slides using resin. The cells were observed under an optical microscope Leica DMI8 at 100 \times magnification, and photographs were taken of each treatment to reveal the morphological changes in the cytoplasm. One hundred random cells were analyzed on each slide to quantify the presence of vesicles. This quantification was repeated for three independent experiments.

2.5. Immunofluorescence staining of γ H2AX and the apoptosis-inducing factor (AIF)

6×10^4 cells were cultured 24 h before exposure onto coverslips pre-treated with poly-L-lysine [1:10] into 35 mm Petri dishes. At the end

of the exposure time, the cells were washed with 1 mL of PBS and they were fixed with absolute methanol at -20°C for 5 min. The fixative was then removed and the cells washed 3 times with PBS for 5 min each. One mL of 0.2% Triton in PBS was used per sample for 30 min to permeabilize the cells. Subsequently, 3 washes were performed with 1 mL of PBS and background noise was blocked with 1 mL of 50 mM glycine. Glycine was then removed and 100 μL of 0.1% BSA in PBS supplemented with 10% goat serum was added for 1 h. Samples were washed twice with 1 mL of PBS and 35 μL of diluted primary antibody was added and incubated for 30 min at room temperature (RT) followed by incubation for 24 h at 4°C in a humid chamber. The primary antibodies used were anti-mouse anti- γH2AX [1:200] and anti-rabbit anti-AIF [5:100] diluted in PBS as indicated.

The next day, 3 washes of 10 min each were performed with 1 mL of 0.05% tween in PBS. 14 μL of the following secondary antibodies were added over 90 min: anti-mouse Alexa Flour594 [1:200] and anti-rabbit FITC [1:200] diluted in PBS as indicated. Subsequently, excess of antibody was removed with 3 washes of 0.05% Tween in PBS for 10 min each and 1 wash with PBS for 10 min.

The samples were incubated with 100 μL DAPI [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] per sample for 5 min, mounted with mounting medium Vectashield and kept in dark at 4°C for further analysis with the fluorescence microscope Leica DMi8.

2.6. RNA extraction

Cells from the different experimental groups were lysed by adding 300 μL of Trizol to each petri dish and kept at -70°C until the samples from three biological experiments were collected. To continue with the extraction procedure, the cell lysate was incubated for 5 min at RT and 180 μL of pre-chilled chloroform was added; then the lysate was vortexed and left to rest for 10 min. Afterwards, the lysate was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4°C , and only the aqueous phase containing the RNA was recovered. This was transferred to a tube with 450 μL of ice-cold isopropanol with 1 μL of glycogen and incubated overnight at -20°C to precipitate the highest amount of total RNA possible. The tube was subsequently centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C . The supernatant was removed and the pellet was washed three times with 300 μL of 70% ethanol, shaking gently, and then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4°C . Ethanol was decanted and the pellet was allowed to dry and resuspended in 25 μL of nuclease-free water. The resuspended pellet was then treated with DNase I (1 U per 1 μg of RNA) for 30 min, the enzyme was inactivated with EDTA at 70°C for 10 min, and the concentration and purity of the RNA was quantified in a NanoDrop spectrophotometer. All samples showed a 260/280 ratio higher than 1.8.

2.7. cDNA synthesis

cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA using the First Strand cDNA Synthesis kit in the thermal cycler T100™ (BIORAD) with the following conditions: 37°C for 60 min, 70°C for 10 min and 22°C for 1 min.

2.8. RT-qPCR

Real-time quantification was performed using SYBR green as the main fluorophore and ROX as a passive reference dye; both were included in the Maxima SYBR green qPCR Master mix kit. Using the specific primers for each gene (Table 2), the reactions were carried out in a real time thermocycler Stratagene Mx3005P qPCR system (Agilent) using the following program: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s plus 30 s at 57°C as alignment temperature, an extension of 30 s at 72°C , and a final cycle of 95°C for 1 min, 57°C for 1 min and 95°C for 30 s. The expression levels were analyzed using the mathematical model of $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), using the

Table 2

Forward (F) and Reverse (R) sequences of primers of the genes *18s*, *BRCA2*, *GADD45B*, *POLB*, *POLD1*, *POLG*, *POLR2C*, *XRCC1* and *XRCC6* for RT-qPCR analysis.

		Oligo sequences for RT-qPCR
<i>18s</i>	F	ATT TTG CGA GTA CTC AAC ACC AAC AT
	R	TTT CCT CAA CAC CAC ATG AGC ATA TCT T
<i>BRCA2</i>	F	ATT TTT AAG ACA CGC TGC AAC AAA GC
	R	CAG GTT CAG AAT TAT AGG GTG GAG C
<i>GADD45B</i>	F	AAC GAC ATC AAC ATC GTG CG
	R	GTG TGA GGG TTC GTG ACC AG
<i>POLB</i>	F	TAA AGA GTG GAG CTG AAG CTA AGA AAT TG
	R	CTT TTC CAG TTT ACG TAA TTT TCC AGT TGC
<i>POLD1</i>	F	CCC TCA TCT TCC AAC AGT TGG AGA T
	R	CAG ACA GAG AAC CCC TCA TCG G
<i>POLG</i>	F	TGG ATT ACT TAG AAG TGG AGG CTG AGG
	R	TTG TAA GGT CCA TTG CCA TGG TGA TAG
<i>POLR2C</i>	F	ATT GAC TGG GTT CAG ATT GAT GCC A
	R	CAG CTT GTC CAC AAT GTC ATC ACT
<i>XRCC1</i>	F	CGG CGG AAA CTC ATC CGA TA
	R	CCA TCA GGG CCT CCT CAA AG
<i>XRCC6</i>	F	CAT GGG TTT CAA GCC GTT GG
	R	TGA GCA GAG CAC TGA ACA GG

18s gene as endogenous gene.

2.9. TUNEL assay

This assay was carried out using the DeadEnd Colorimetric TUNEL System kit. 4.5×10^4 cells were exposed as described in the experimental design. Subsequently, the culture medium was removed and the cells were washed with 1 mL of saline solution before adding trypsin for 10 min to detach them. To concentrate the cells, they were centrifuged at 1300 rpm for 5 min. The solution was then decanted and 100 μL of saline solution was added for one wash with centrifugation at 1300 rpm for 5 min. The solution was again decanted and the concentrated cells were resuspended in 100 μL of saline solution. Smears of each treatment were made on slides previously prepared with silane and allowed to dry at 37°C . These samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 25 min to reveal the presence of DNA fragmentation following the manufacturer instructions. The slides from three independent experiments were examined with an optical microscope Leica DMi8 and the nuclei of 100 cells were counted for each treatment and expressed as the percentage of nuclei with DNA fragmentation.

2.10. Quantification of active caspases and the proliferation marker Ki67

1.5×10^4 cells were seeded for each treatment (in duplicate) in 96-well plates 24 h before treatment. Cells were detached with trypsin and centrifuged at 1300 rpm for 7 min. The Muse Multi-Caspase Kit and the Muse Ki67 Proliferation Kit were used to quantify caspases and cell proliferation with the MUSE equipment (Muse® Cell Analyzer, Merck) according to the manufactures instructions.

2.11. Western blot

5×10^5 cells were plated, cultured and subjected to the experimental design as described in Table 1. Cytoplasmic protein fraction was extracted with 100 μL of pre-chilled lysis buffer (320 mM Sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM PMSF, $1 \times$ protease inhibitor cocktail) for 10 min and nuclei were pelleted at 3400 rpm for 10 min at 4°C . The supernatants were transferred to a new tube and stored for their use as cytoplasmic extracts if needed. The remaining pellets were thoroughly resuspended with 100 μL of pre-chilled RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% Triton, 0.5% Na-deoxycholate, 0.5% SDS, 1 Mm PMSF, $1 \times$ protease inhibitor cocktail) for 4 min, centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C . Supernatant were transferred to a new

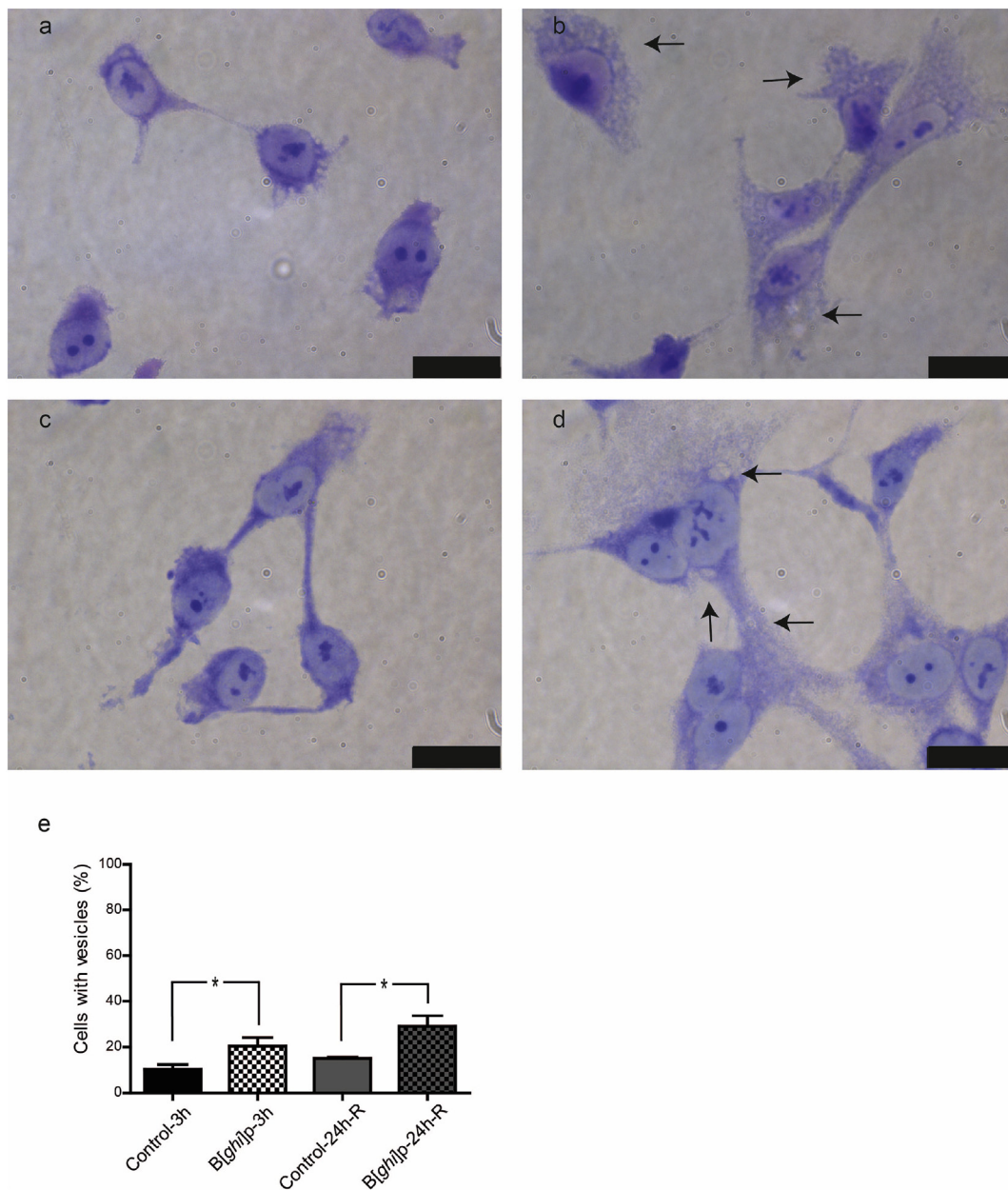


Fig. 1. Vesicle appearance in the cytoplasm of NL-20 cells exposed to B[ghi]p. Experimental groups: a) Control-3 h, b) B[ghi]p-3 h, c) Control-24 h-R, d) B[ghi]p-24 h-R (see Table 1 for group descriptions). Arrows point out cytoplasmic vesicles and black bar is equivalent to 20 μ m. e) Percentage of cells with vesicles in the different experimental groups. Student's *t*-test was performed and significance with a $p < 0.05$ is displayed with an asterisk.

tube and used as nuclear protein fractions. Protein concentration was assessed with the Bradford protein assay and samples were supplemented with $1 \times$ Laemmli buffer. Samples were then denaturalized for 10 min at 90°C , brought to RT and stored at -20°C until used again. 8 μ g of nuclear protein fractions were loaded in a SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes. Non-specific binding of antibodies was blocked with 5% nonfat dry milk and membranes were incubated for 1 h at RT with the primary antibody anti-AIF at a 1:200 dilution in 5% nonfat dry milk. Three washes with TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 pH = 7.6) were made before 1 h incubation with the secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) at a 1:1000 dilution in 5% nonfat dry milk. Chemoluminescence signal was produced with the ECL Prime Western Blotting Detection reagent and analyzed with a Fusion FX7 chemoluminescence imaging system. After antibody stripping, membranes were incubated with the loading control antibody

anti Histone H4 at a 1:1000 dilution and treated as mentioned before. Densitometry of protein bands was performed using Fiji ImageJ software.

2.12. Flow cytometry analyses

5×10^5 cells were plated, cultured and subjected to the experimental design as described in Table 1. Cells were collected, washed with 2 mL of FACS buffer ($1 \times$ PBS, 5% fetal bovine serum), pelleted at 1500 rpm for 5 min and resuspended in 100 μ L of Annexin V Binding Buffer or 100 μ L FACS buffer for negative samples. Samples then were stained using first 5 μ L of APC AnnexinV Apoptosis Kit for 15 min and washed with 2 mL of FACS buffer. The cells were fixed in cold 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 1 mL Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer ($1 \times$) for 5 min and washed with

2 mL of FACS buffer. Next, the anti- γ H2AX antibody (Millipore) at a 1:200 dilution was added and incubated overnight at 4 °C. The secondary antibody anti-mouse Alexa Fluor 488 was added for 1 h at a 1:500 dilution at RT. Finally, the Ki67 Alexa Fluor 647 dye was added at a 1:200 dilution for 30 min. A last washing step was performed with 2 mL FACS buffer. Cells were pelleted for 5 min at 1500 rpm and resuspended with 200 μ L of 4% paraformaldehyde before their analysis. Data acquisition was performed on a CytoFLEX LX Flow Cytometer followed by analysis using CytExpert software (Beckman Coulter).

2.13. Gas chromatography coupled to mass spectrometry with electron impact ionization (GC/MS/EI)

Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained and quantified as mentioned above. In order to quantify their B[ghi]p content, 5 μ L of each extract (as determined by the assessment of the optimal volume) were injected in splitless mode at 300 °C. A 60 m J&W ultra inert DB-35 ms (122-3862) capillary column (250 μ m \times 0.25 μ m film thickness) was used to separate the B[ghi]p from the extracts. Each chromatographic analysis by the GC/MS/EI was done with 5 μ L of the doped sample with B[ghi]p-d12 in a probe to thermal desorption (TPS) on a gas chromatograph/mass spectrometer 7890A (Agilent Technologies, USA). The oven temperature program was set to 40 °C for 1 min followed by an increase of temperature to a constant rate of 50 °C/min until reach 200 °C, then increases of 20 °C/min until reach 335 °C. Once reached this desired temperature, it was kept for 16 min. The total running time was 26.95 min. High purity helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min. The mass spectrometer was operated in electron impact mode and selected ion monitoring (276, 288).

In order to calculate the concentration of B[ghi]p in the different fractions from the experimental groups, we established a curve of known concentrations of this PAH from 10 to 200 pg/5 μ L. The deuterated B[ghi]p (B[ghi]p-d12) was added to each sample as internal standard (500 pg/5 μ L), including the standard curve, in order to normalized the observed concentration.

2.14. Statistical analyses

Mean differences between two groups were tested by independent Student's *t*-test to assess percentage of cells with vesicles, H2AX foci, nuclear translocation AIF, TUNEL and proliferation results. Real time PCR data were analyzed by Mann-Whitney test. Multiple comparisons were made to assess cytoplasmic and nuclear B[ghi]p results using one-way ANOVA, followed by the Tukey's multiple comparison for *post hoc* analysis. $P < 0.05$ is considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Exposure to B[ghi]p induces vesicle appearance in the cytoplasm and DNA damage in the nucleus

Previous studies have shown that after 3 h of exposure to other HAPs, vesicles in the cytoplasm and DNA damage can be observed (Ali et al., 2015; Mattsson et al., 2008, 2009). Thus, we first decided to evaluate if this short times of exposure to B[ghi]p could induce similar damage. We observed that 20 and 30% of the cells in the groups B[ghi]p-3 h and B[ghi]p-24 h-R displayed cytoplasmic vesicles (Fig. 1e; $p < 0.05$), indicating that acute exposure to B[ghi]p causes damage to the cells.

We then assayed DNA damage by detecting the phosphorylation of the histone H2AX (γ H2AX) by immunofluorescence. We noticed that exposure to B[ghi]p induced the presence of γ H2AX foci within the nuclei of 47 and 46% of the cells in the groups B[ghi]p-3 h and B[ghi]p-24 h-R (Fig. 2j, l, respectively; $p < 0.05$). Meanwhile, only 20 and 27% of the control cells (Control-3 h and Control-24 h, respectively) presented these foci (Fig. 2i, k). In order to rule out this damage to be

caused by reactive oxygen species (ROS), exposure was carried out in presence of the antioxidant NAC. In this scenario, 50% and 37% of exposed cells (B[ghi]p-3 h and B[ghi]p-24 h-R, respectively) displayed γ H2AX foci, results that are very similar in the cells from the groups without any ROS inhibition (Fig. 2v,x). These data suggest that B[ghi]p exposure causes DNA damage in a ROS-independent mechanism even 24 h after exposure.

3.2. B[ghi]p induces changes in the expression of genes involved in DNA repair

Exposure to B[ghi]p induced the presence of γ H2AX foci. Thus, we evaluated changes in expression of genes involved in DNA repair. Base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), homologous recombination repair (HR), non-homologous recombination repair (NHJR) and DNA mismatch repair (MMR) pathways were evaluated with a low-density array plate (Taqman DNA Repair Mechanism, Fast; Applied Biosystems). Expression of the *BRCA2*, *POLB*, *POLD1*, *POLG* and *POLR2C* genes was increased by at least a 2-fold change, while the expression of the *XRCC1*, *XRCC6* and *GADD45B* genes decreased by a 2-fold change in the cells of B[ghi]p-3 h and B[ghi]p groups (data not shown). We then analyzed the expression of these genes by RT-qPCR in cells exposed for 3 h and followed their expression after a period of recovery time from 6 to 24 h. The results of three independent experiments showed that the relative expression of the *BRCA2*, *POLB*, *POLD1*, *POLG*, *POLR2C* and *XRCC6* genes increased only after 18 h of recovery ($p < 0.05$). Whereas, at 24 h of recovery the expression of these genes was similar to that observed in the control cells (Fig. 3).

3.3. B[ghi]p exposure induces a caspase-independent apoptosis (Nuclear AIF)

The presence of γ H2AX foci and the changes in expression of genes related to DNA repair mechanisms, indicate that the genotoxic damage that B[ghi]p produces is being restored at least to certain extend. In order to assess a greater damage and thus cell death we evaluated the presence of DNA damage linked to apoptosis. B[ghi]p caused a significant increase of cells with DNA fragmentation and apoptosis only in cells exposed for 3 h (Figs. 4 and 8). These data suggest that cell death is triggered by uncompleted repair of DNA damage after exposure to B[ghi]p.

Next we tested whether this DNA fragmentation was associated with presence of active caspases. However, no significant positive active caspase was found in any of the experimental groups (Fig. 5). Thus, the caspase-independent apoptosis pathway by AIF translocation into the nucleus was evaluated by immunofluorescent. AIF signal was found in 27% of the nuclei of the exposed cells (Fig. 6j), representing a significant increase of cells with this translocation when compared to cells of Control-3 h group ($p < 0.05$) (Fig. 6i). Strikingly, when ROS activity was inhibited by the presence of NAC, exposure to B[ghi]p for 3 h did not induce a significant change in the percentage of cells with AIF (17%) in the nuclei compared to its control group (12%) (Fig. 6k,l). These data suggest that B[ghi]p-3 h exposed cells are committed to a caspase-independent apoptosis due to the presence of ROS. We confirmed these results by immunoblotting of AIF in protein extracts from nuclear fractions. As expected, AIF levels were only higher in the B[ghi]p-3 h exposed cell nuclei and restores to basal level when ROS was inhibited (Fig. 6s-t).

3.4. Increased cell proliferation by exposure to B[ghi]p

Since exposure to other PAHs can increase a ROS-mediated proliferation (Burdick et al., 2003) we next evaluated Ki67 profiles. 21% more cells were found displaying this proliferation marker in the group of B[ghi]p-3 h compared with the vehicle (Fig. 7; $p < 0.05$) and presence of NAC significantly reduced this increase to levels seen in the

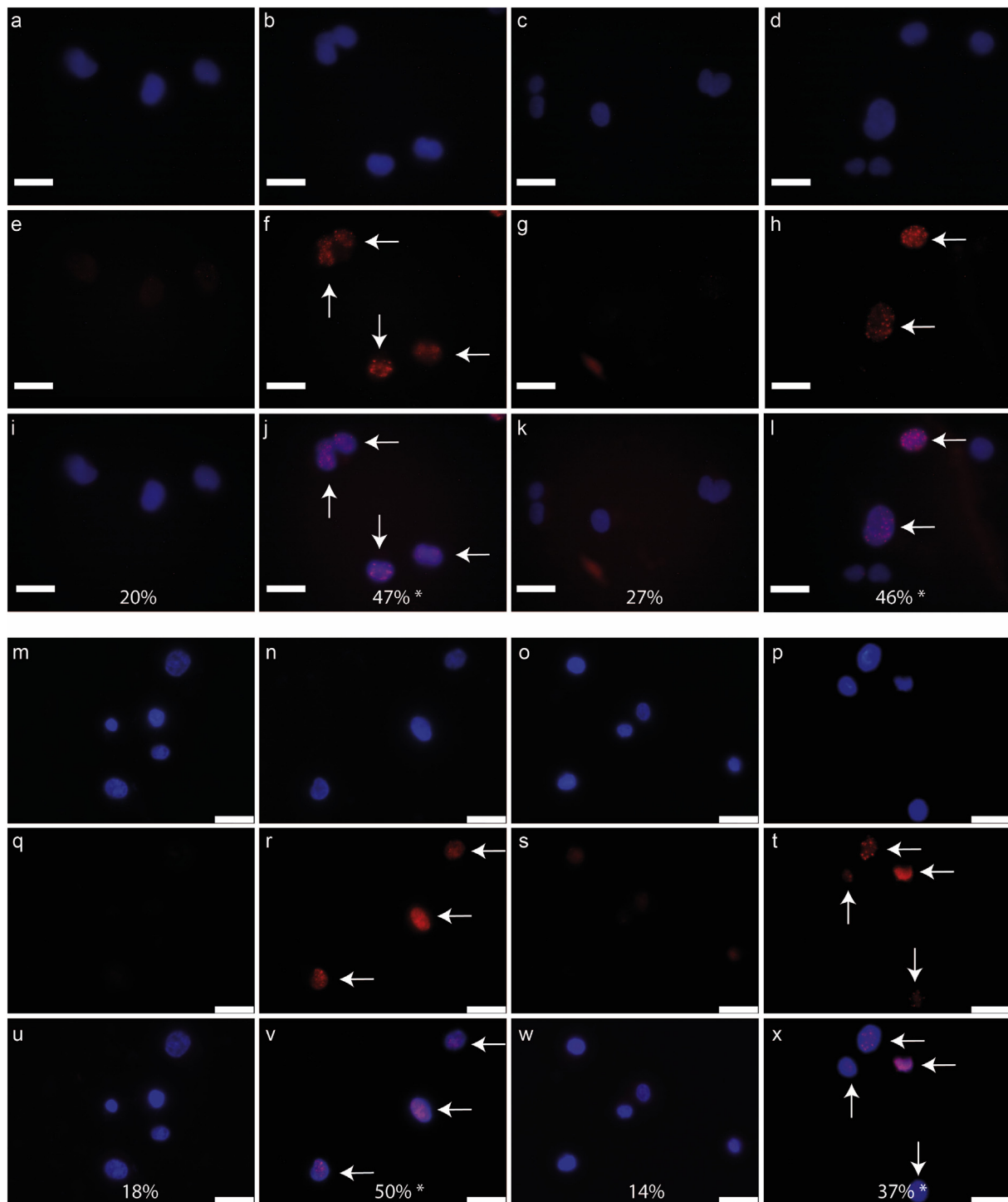


Fig. 2. Induction of histone H2AX phosphorylation (γ H2AX) in NL-20 cells exposed to B[ghi]p.

Experimental groups: a, e, i) Control-3 h with DAPI staining (a), γ H2AX in red (e) and merge (i). b, f, j) B[ghi]p-3 h with DAPI staining (b), γ H2AX in red (f) and merge (j). c, g, k) Control-24 h-R with DAPI staining (c), γ H2AX in red (g) and merge (k). d, h, l) B[ghi]p-24 h-R with DAPI staining (d), γ H2AX in red (h) and merge (l). NL-20 cells were pretreated with 10 mM NAC and exposed similarly than the experimental groups described in material and methods obtaining the following experimental groups: m, q, u) Control-3 h + NAC with DAPI staining (m), γ H2AX in red (q) and merge (u). n, r, v) B[ghi]p-3 h + NAC with DAPI staining (n), γ H2AX in red (r) and merge (v). o, s, w) Control-24 h-R with DAPI staining (o), γ H2AX in red (s) and merge (w). p, t, x) B[ghi]p-24 h-R + NAC with DAPI staining (p), γ H2AX in red (t) and merge (x). The arrows point out the nuclei with foci of γ H2AX. White bar is equivalent to 20 μ m. Student's *t*-test was performed and significance with a $p < 0.05$ is displayed with an asterisk. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

control groups (Fig. 7; $p < 0.05$).

Altogether our data suggest that exposure to B[ghi]p induces cytotoxic (cell death mediated by AIF and proliferation) and genotoxic (DNA damage as revealed by the presence of γ H2AX foci) damage to the cells, that the first are mainly due to increase in ROS and the

genotoxic effects might be related to a direct mechanism of B[ghi]p on the DNA molecule.

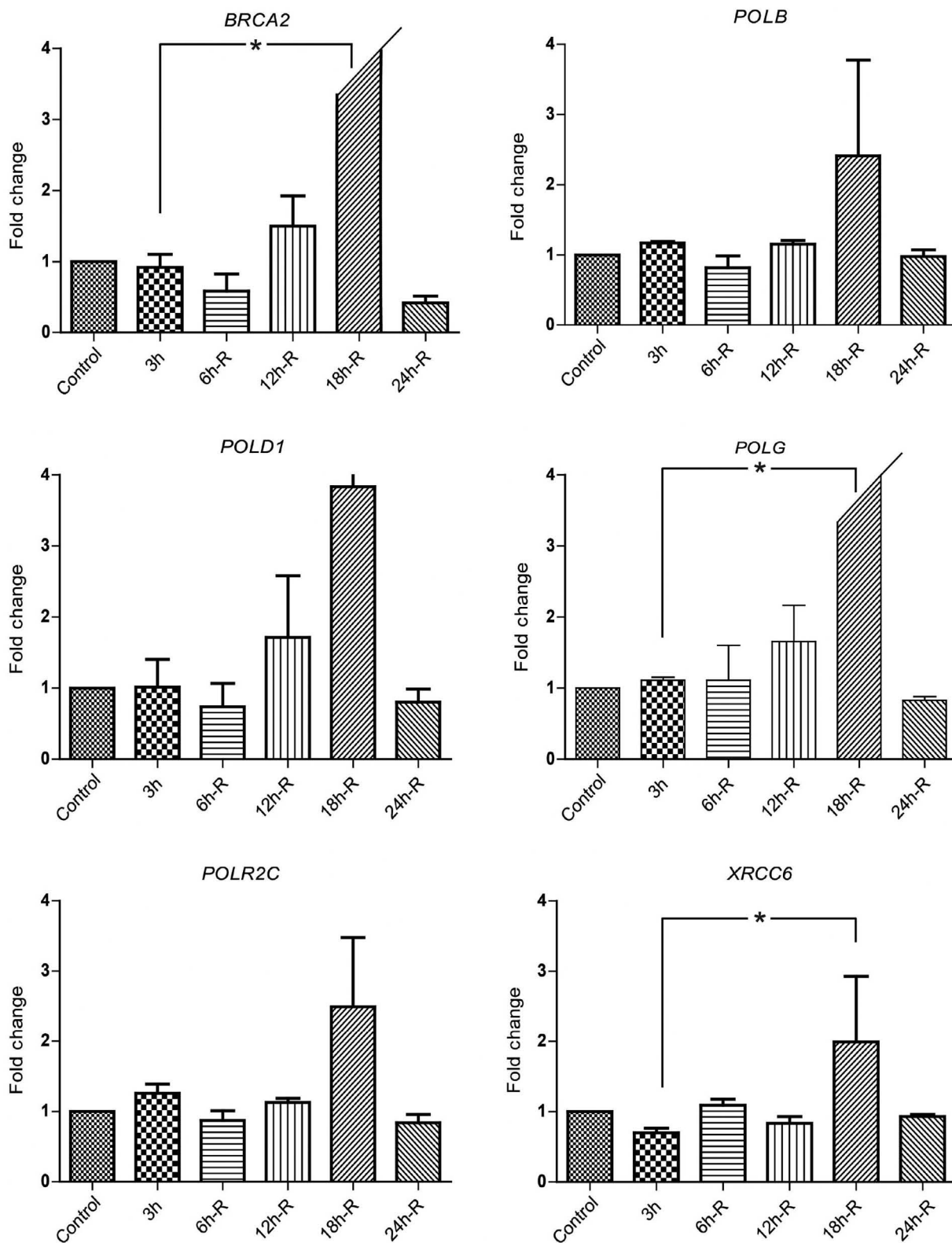


Fig. 3. Relative expression of the DNA damage response repair enzymes. BRCA2, POLB, POLD1, POLG, POLR2C and XRCC6 primers were used to evaluate their relative expression by RT-qPCR in cells exposed to B[ghi]p for 3 h (3 h) and after 6, 12, 18 and 24 h of recovery time (6 h-R, 12 h-R, 18 h-R and 24 h-R, respectively). Columns in the chart represent the average of three independent biological replicates (each one with three technical replicates). Standard error bars are displayed. Mann-Whitney test was performed and significance with a $p < 0.05$ is displayed with an asterisk.

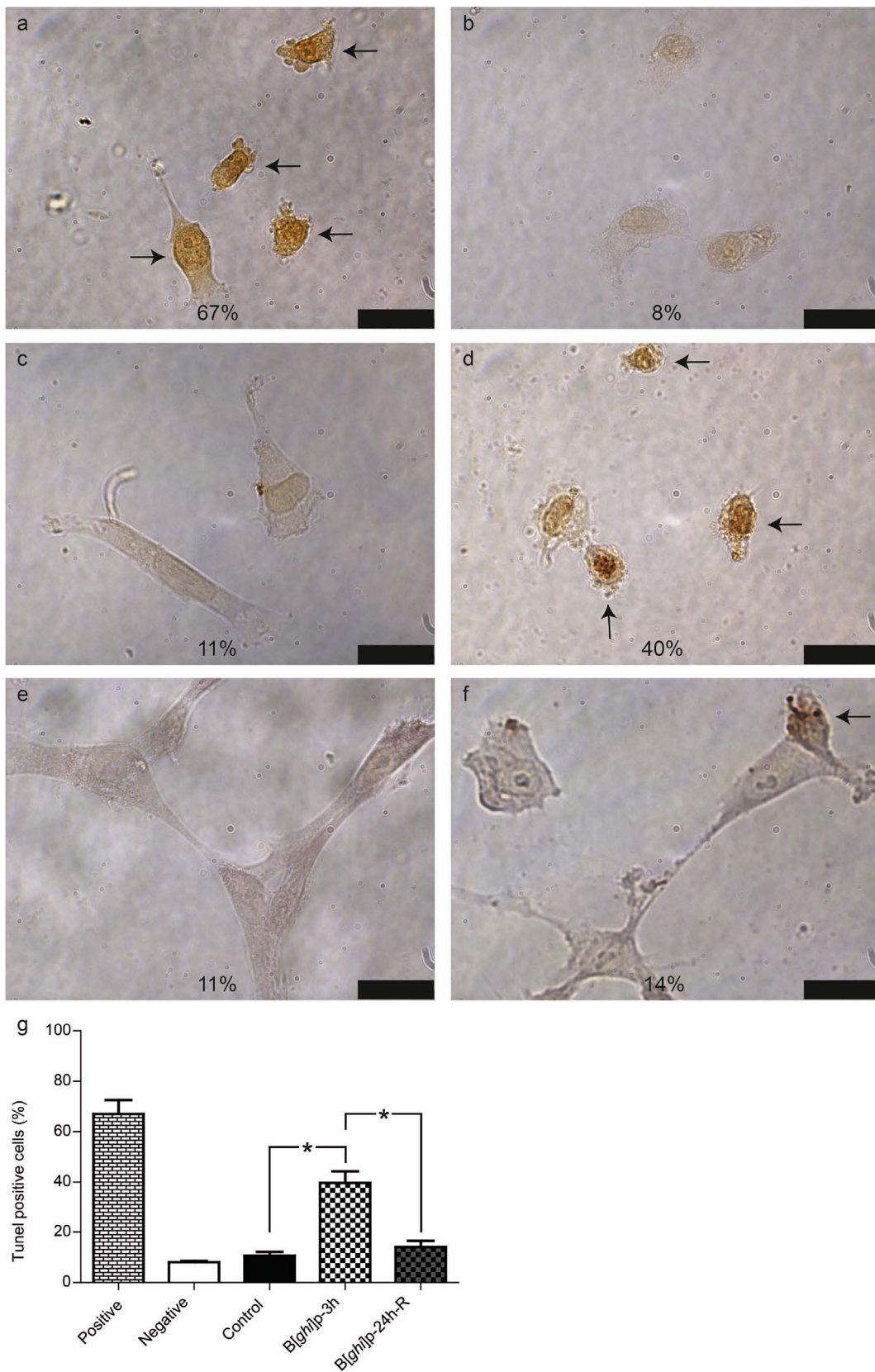


Fig. 4. Immunocytological TUNEL staining of NL-20 cells exposed to B[ghi]p. Experimental groups: a) positive control treated with DNase (10 U/mL), b) negative control (cells only cultured in medium), c) Control-3 h, d) B[ghi]p-3 h, e) Control-24 h-R and f) B[ghi]p-24 h-R. f) Column chart displaying the average of three independent biological replicates (each one with three technical replicates). Standard error bars are displayed. Student's *t*-test was performed and significance with a $p < 0.05$ is displayed with an asterisk.

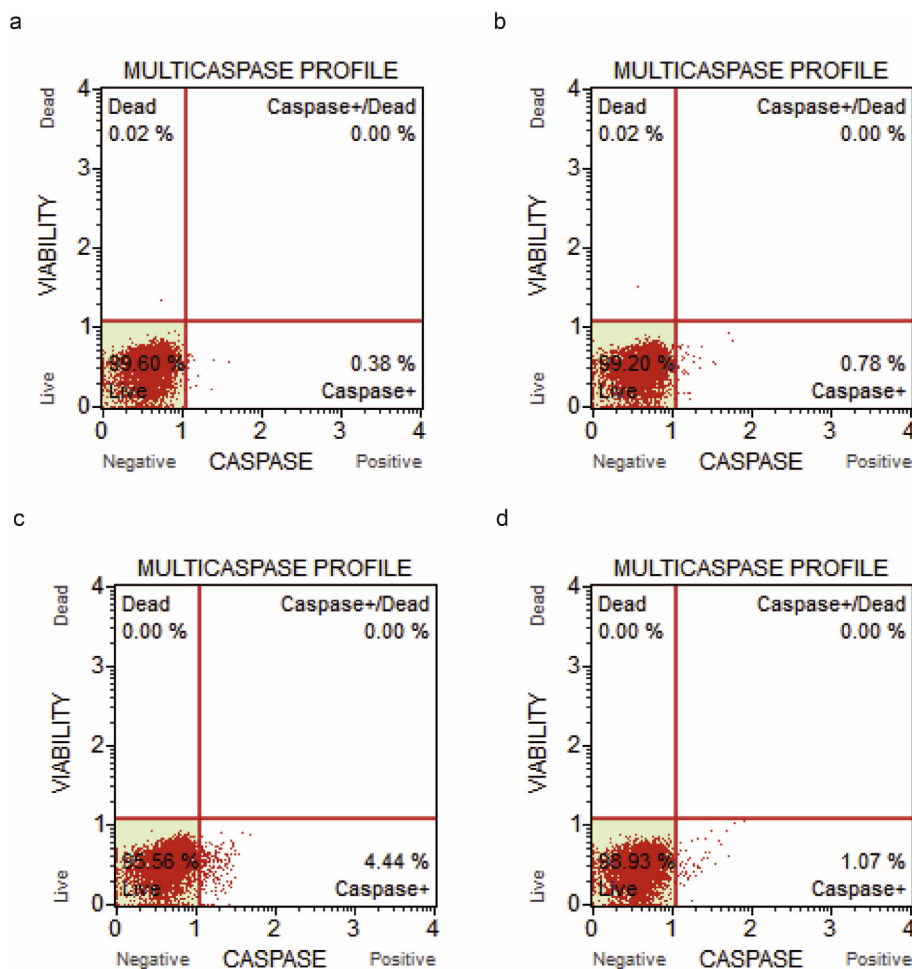


Fig. 5. Activation of caspases by effect of B[ghi]p.

Flow cytometry analysis of active caspases in the experimental groups: a) Control-3 h, b) B[ghi]p-3 h, c) Control-24 h-R and d) B[ghi]p-24 h-R.

3.5. DNA damage in a small population of cells leads to apoptosis or proliferation

Due to the variability of cellular responses observed after 3 h of exposure to B[ghi]p, we decided to evaluate the three processes at the same time. Flow cytometry analyses of γ H2AX, AnnexinV and Ki67 markers, showed that B[ghi]p mostly causes DNA damage in exposed cells. From the 76% of cells displaying γ H2AX signal, 4 and 6% also displayed either AnnexinV or Ki67, respectively (Fig. 8a–b). As expected, no overlapping between cells displaying AnnexinV and Ki67 was observed (Fig. 8c). This data set implies that DNA damage is the predominant phenotype observed due to exposure to this HAP and that there are two cell populations with DNA damage that will suffer either cell death or proliferation.

3.6. B[ghi]p is internalized and remains in the cell nucleus

In order to establish a direct link between B[ghi]p presence and its damages in the cell nucleus we performed GC–MS experiments on extracts of cytoplasmic and nuclear fractions of cells of B[ghi]p-3 h and B[ghi]p-24 h-R groups. Data analysis showed that B[ghi]p is internalized into the cell cytoplasm and nucleus at 3 h of exposure (Fig. 9a–b). Furthermore, B[ghi]p remains only in the nucleus after 24 h of recovery time (Fig. 9a–b; $p < 0.01$). At 3 h of exposure there are around 11 times more B[ghi]p in the nucleus than in the cytoplasm, whereas after 24 h of recovery time B[ghi]p remains exclusively only in the nucleus. (Fig. 9b; $p < 0.001$). These data strongly suggest that genotoxic effects of B[ghi]

p are exerted by its presence within the cell nuclei.

4. Discussion

In the present work, we found that B[ghi]p causes cytotoxic and genotoxic damage in human bronchial NL-20 cells. Cytotoxic effects (*i.e.*, cell death mediated by AIF and proliferation) are found only at 3 h of exposure and blocked by inhibiting ROS. The presence of B[ghi]p in the cytoplasm might be directly related to this damage. Meanwhile, the genotoxic effects (*i.e.*, DNA damage) produced by B[ghi]p (in a ROS independent manner) after 3 h of exposure might be related to a direct role on the DNA molecule, this is also supported by the internalization of this PAH into the cell nucleus. Notably, cytotoxic effects and PAH presence in the cytoplasm are no longer seen at 24 h after exposure elimination, except the formation of vesicles. Nevertheless, γ H2AX foci are still displayed, suggesting that the maintenance of B[ghi]p in the nucleus keeps producing these genotoxic damage.

A previous study carried out by our group showed the formation of cytoplasmic vesicles in NL-20 cells exposed to B[ghi]p for 24, 48 and 72 h (Zaragoza-Ojeda et al., 2016). Meanwhile the nature of these vesicles is unknown, it has been shown that their appearance is a hint of cytotoxic damage (Ali et al., 2015). The present study reveals that cytoplasmic vesicles appear in some cells when they are exposed to B[ghi]p for a short period of time of 3 h; however, their presence was more evident in the cells that underwent recovery time. In line with these observations, other studies have recorded the occurrence of alterations in the structure and composition of cell membranes due to exposure to

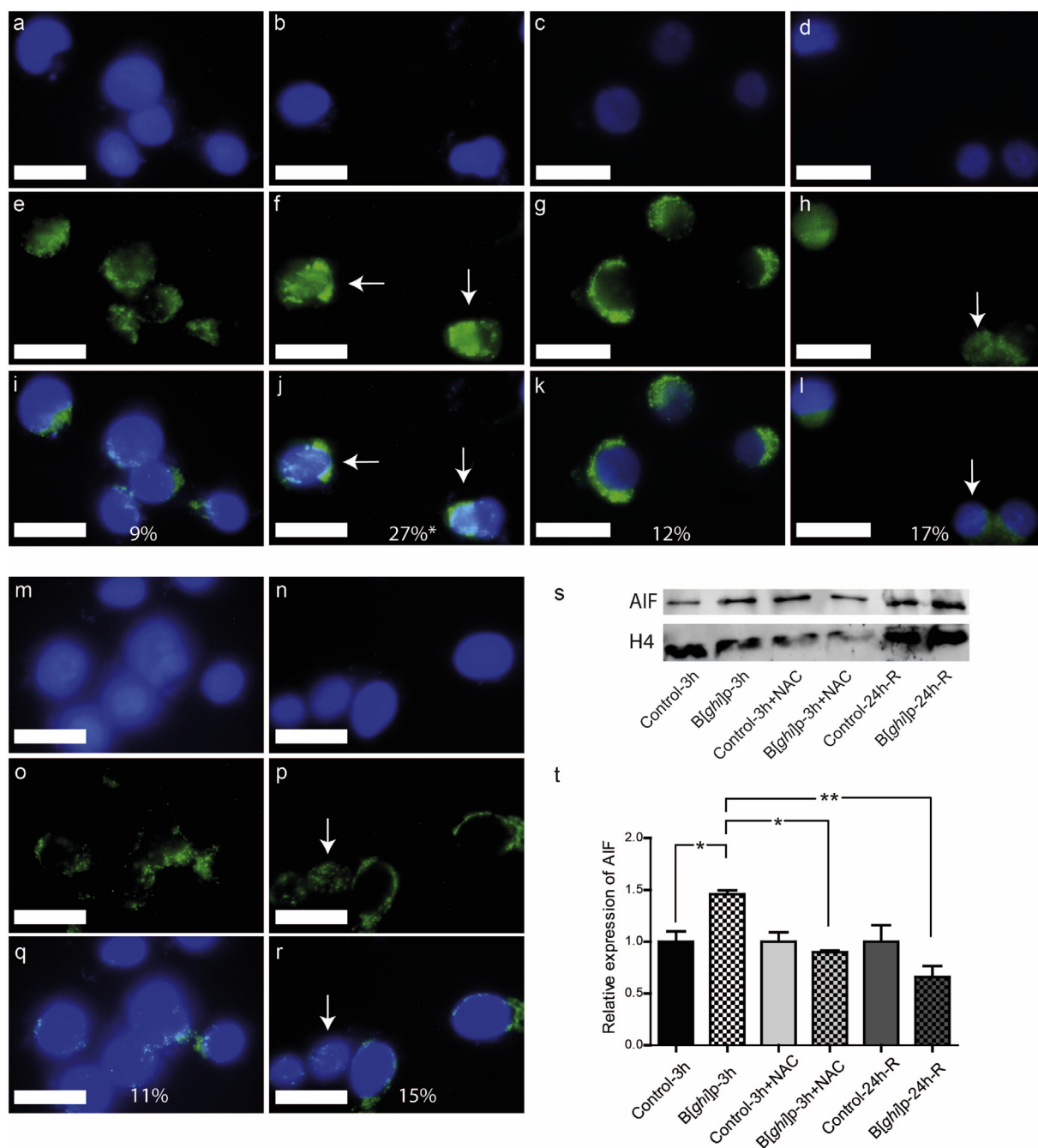


Fig. 6. Fluorescent immunodetection and immunoblotting of AIF.

Experimental groups: a, e, i) Control-3 h with DAPI staining (a), AIF in green (e) and merge (i). b, f, j) B[ghi]p-3 h with DAPI staining (b), AIF in green (f) and merge (j). NL-20 cells were pretreated with 10 mM NAC and exposed similarly than the experimental groups described in material and methods obtaining the following experimental groups: c, g, k) Control-3 h-R + NAC with DAPI staining (c), AIF in green (g) and merge (k). d, h, l). B[ghi]p-3 h-R + NAC with DAPI staining (d), AIF in green (h) and merge (l). And the recovery time cell groups: m, o, q) Control-24 h-R with DAPI staining (m), AIF in green (o) and merge (q). n, p, r) B[ghi]p-24 h-R with DAPI staining (n), AIF in green (p) and merge (r). Arrows point out nuclei with AIF. White bar is equivalent to 20 μ m. Student's *t*-test was performed and significance with a $p < 0.05$ and $p < 0.01$ are marked with one and two asterisks. s) Western blot (WB) of AIF in nuclear extracts from the different experimental groups, Histone H4 (H4) was immunoblotted in the same membrane and used as a loading control. t) Quantitation of WB bands of three independent biological replicates (each one with three technical replicates). Normalized expression of AIF/H4 in the experimental groups was compared to the normalized expression of the Control-3 h group.

PAHs (Dendele et al., 2014; Gdula-Argasinska et al., 2015; Rowan-Carroll et al., 2013). Another study with B[a]p (Gorria et al., 2006) confirmed that its cytotoxicity is due to changes in membrane dynamics and an increase in ROS. It is thus possible that B[ghi]p alters membranes fluidity when it is going through them and it changes the vesicular transport dynamics. The nature of these vesicles is currently studied in our laboratory.

DNA damage due to exposure to PAHs has mainly been associated

with an increase in ROS production causing oxidation of DNA bases such as guanine (8-OHdG) (Isabel et al., 2012). However, in our model the γ H2AX signal did not decrease in the presence of the antioxidant NAC, which indicates that the genotoxic effects cannot be attributed to an increase in ROS production. Phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γ H2AX) is an early step in the cellular response to a DNA double strand breaks (DSB) and as soon as this DNA damage is repaired γ H2AX foci disappear (Bonner et al., 2008). Thus, it would be expected

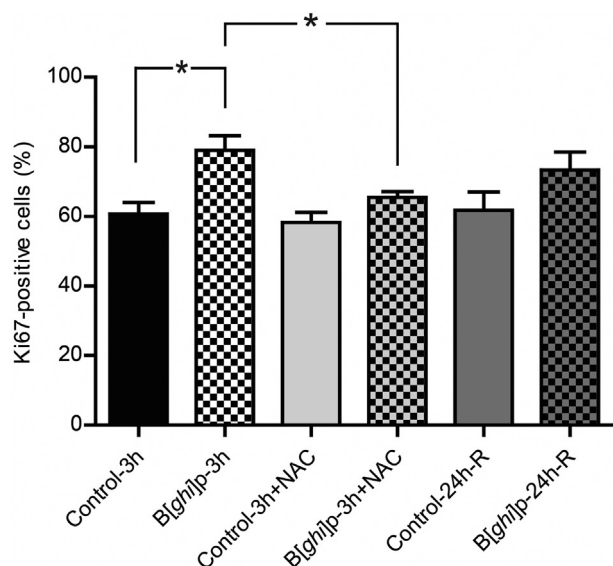


Fig. 7. Ki67-Proliferation assay.

Columns chart showing the percentages of Ki67-positive cells in the different experimental groups. Columns represent the average of three independent biological replicates (each one with three technical replicates). Standard error bars are displayed. Student's *t*-test was performed and significances with a $p < 0.05$ are displayed with an asterisk.

that cells exposed to B[ghi]p show overexpression of genes such as *XRCC1*, *XRCC5* and *XRCC6* after 3 h of exposure, however, in our study no expression of these genes was observed. Furthermore, γ H2AX foci did not decrease in the cells that underwent recovery time. These results suggest the possibility that DNA damage was not repaired or that B[ghi]p kept exerting its damage, which in turn would explain why we observed three different populations: 1) a small population of cells with DNA damage that underwent apoptosis, 2) another small population of cells with DNA damage that triggered proliferation and 3) a large population of cells with DNA damage that is maintained in the nucleus after 24 h of recovery. However, in this last cell population, we cannot distinguish newly formed γ H2AX foci due to the maintenance of B[ghi]p within the nucleus from persistent γ H2AX arisen by the first exposure. A combination of both sources of DNA damage is also plausible.

What could be the significance of unrepaired DSB? A deficient repair (e.g. in BER) can produce SSB intermediaries, which in turn can

give rise to new DSB and cause genomic instability (Bonner et al., 2008). One possibility that we must consider is that B[ghi]p could damage regions such as telomeres, physically interfering with their structure. It has been found that Pyrene and Coronene derivatives are ligands of the structures known as G-Quadruplex, non-canonical secondary structures formed by repeat sequences of guanine. The binding of these derivatives and these structures compromises the integrity of the telomeres (Franceschin et al., 2012). Therefore the increased overexpression of the repair genes *BRCA2*, *POLD1* and *XRCC6*, which, among other functions, maintain the integrity of telomeres (Dilley et al., 2016; Robles-Espinoza et al., 2015; Zimmer et al., 2016) may be a hint for genomic instability. Thus, more studies focusing in the persistence of DSBs in cells exposed to B[ghi]p are needed to assay genomic stability.

Is the B[ghi]p directly causing the DNA damage? There is the possibility that the persistent presence of B[ghi]p in the nucleus is a constant source of DSB or adducts. In agreement with this, it has been confirmed *in vitro* (Pan et al., 2013) and in an animal model that B[ghi]p is the second most potent adduct-forming PAH (Labib et al., 2016). It has been shown that B[ghi]p at 10 μ M can induce γ H2AX foci in intestinal LS174t cells and colon Caco-2 cells. Although H2AX is mainly phosphorylated due to the appearance of DSB, it can also be phosphorylated as a result of another type of damage, such as the formation of adducts, as has been reported in A549 cells after 3 h of exposure to diol-epoxides of Benzo[a]pyrene and to Dibenzo[a,l]pyrene (Mattsson et al., 2009). The fact that B[ghi]p and the γ H2AX mark persist in the cell nucleus after the recovery time suggests the existence of unrepaired adducts or DSB generated by inefficient repair or, simply, genomic instability, as was the case when the cells were exposed to B[a]p (Tung et al., 2014).

Our data also showed that DNA damage leads a small population of cells either to proliferation or death in a ROS-dependent manner. After 18 h of recovery there was an increase in the expression of the genes involved in DNA repair, such as *BRCA2* (9-fold) and *POLD1* (4-fold), which are mainly expressed in the S phase of the cell cycle to repair DSB by HR (Zaboikin et al., 2017). The induction of the overexpression of these HR genes could also be evidence of a secondary effect associated with an increase in the number of cells in the S phase, as described in the research of Chramostova et al. (2004) for liver epithelial cells (WB-F344) exposed to 10 μ M of B[ghi]p (Chramostova et al., 2004). Thus it is not surprising to detect an increase of cells in proliferation. Furthermore, recent results by Ke et al. (2018) classified B[ghi]p among the PAHs with moderate cytotoxicity, increasing cell death between 20% to 30% in human pulmonary alveolar epithelial cells HPAEpiC. Similarly,

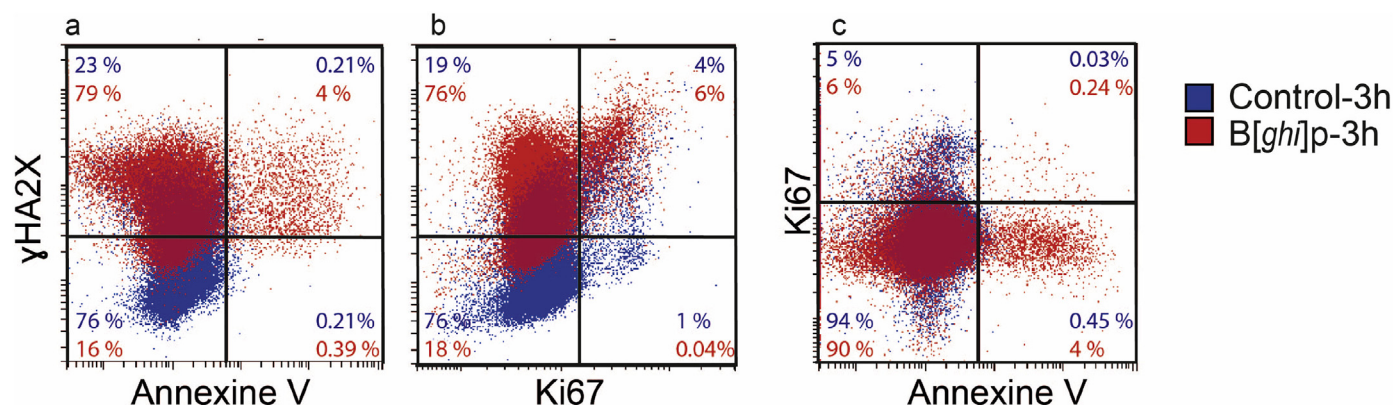


Fig. 8. Flow cytometry analyses of DNA damage, apoptosis and proliferation.

The γ H2AX, AnnexinV and Ki67 markers were simultaneously used to analyze the genotoxic and cytotoxic effects that B[ghi]p induces in the NL-20 cells. a) Profile of γ H2AX and AnnexinV markers in the experimental groups Control-3 h (in blue) and B[ghi]p-3 h (in red). b) Profile of γ H2AX and Ki67 markers in the experimental groups Control-3 h (in blue) and B[ghi]p-3 h (in red). c) Profile of Ki67 and AnnexinV markers in the experimental groups Control-3 h (in blue) and B[ghi]p-3 h (in red). Percentages of cells falling into the different gates of the profile are displayed in a color code manner. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

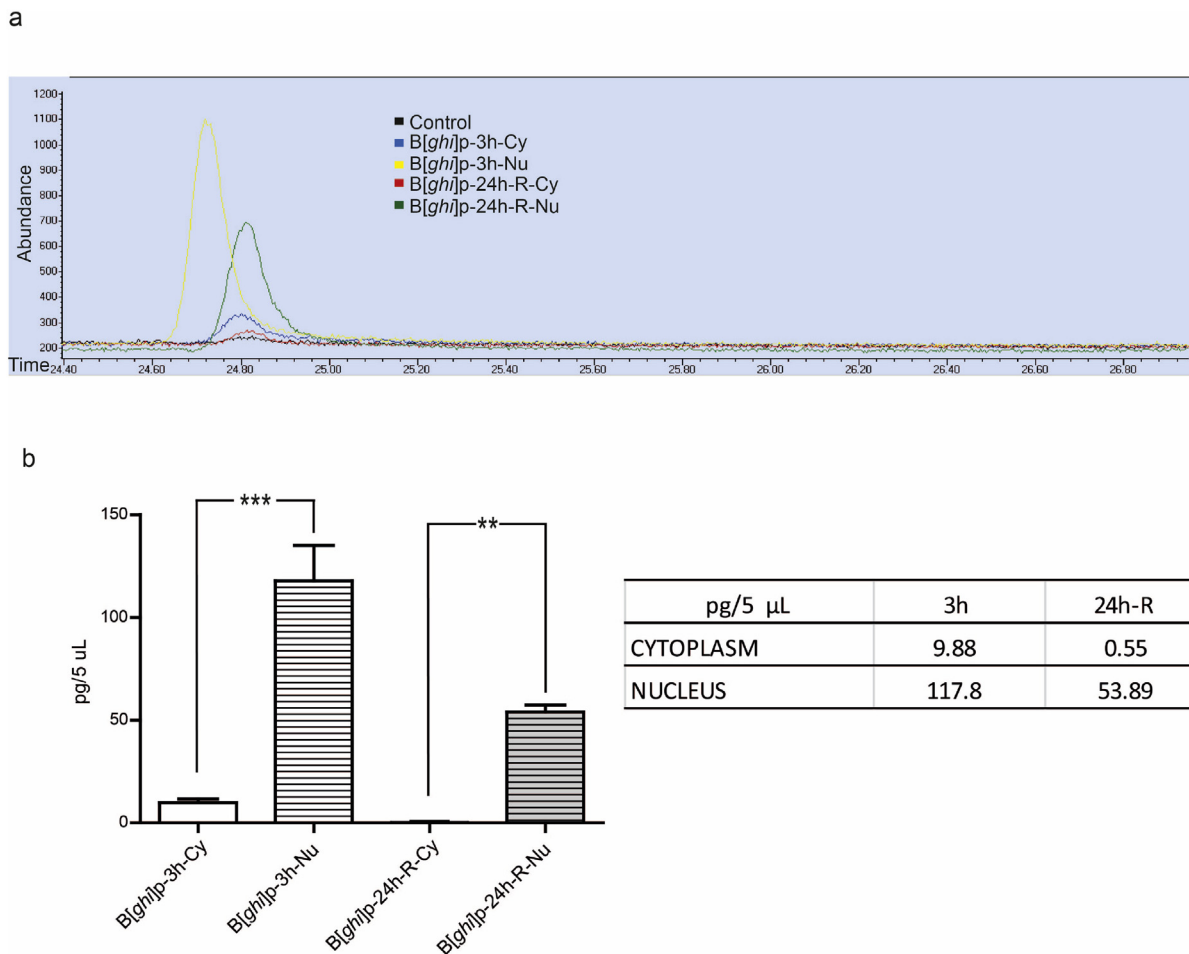


Fig. 9. Gas chromatographic analysis of B[ghi]p in cytoplasmic and nuclear extracts. a) Representative chromatograph of the detection of B[ghi]p in either cytoplasmic (Cy) or nuclear (Nu) extracts of the experimental groups Control-3 h, B[ghi]p-3 h and B[ghi]p-24 h-R. b) Concentration of B[ghi]p (pg/5 μ L) in cytoplasmic and nuclear extracts. Tukey ANOVA test was performed and statistical significances with a $p < 0.01$ and $p < 0.001$ are marked with two or three asterisks.

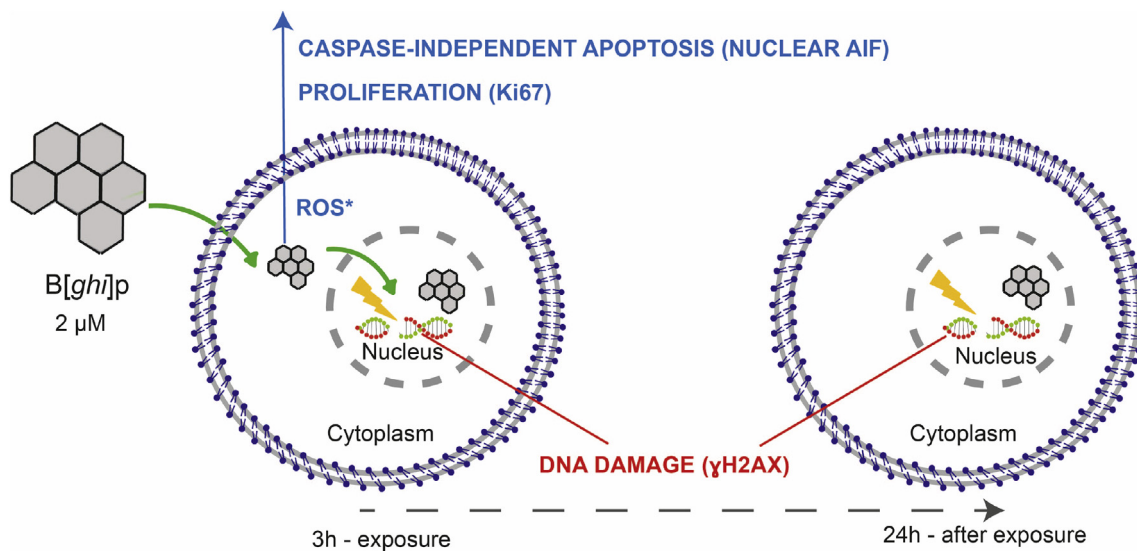


Fig. 10. Model of the cytotoxic and genotoxic effects induced by exposure of human bronchial NL-20 cell line to B[ghi]p.

in the present study, 27% of the cells showed nuclear translocation of AIF, a process involved in caspase-independent apoptosis. Both cytotoxic effects (proliferation and death) are mainly due to ROS production, a similar response has been observed in rat liver epithelial cells

(F258) exposed to B[a]p plus NAC (Huc et al., 2007).

5. Conclusions

In this work we have found B[ghi]p produces cyto- and geno-toxic damages to the exposed human bronchial epithelial cells NL-20 (Modeled in Fig. 10). Changes in cell morphology, cell death mediated by translocation of AIF and increase in proliferation are seen at 3 h of exposure and blocked by inhibiting ROS. Perhaps, the presence of B[ghi]p in the cytoplasm may be producing this cytotoxic damages, which also have an impact on the DNA molecule. On the contrary, the abundant presence of this PAH in the cell nucleus may be directly responsible for most of the genotoxic damage on the DNA. After recovery time, the cell maintains B[ghi]p only in the nucleus where the genotoxic damage persists; thus, reinforcing the notion that this HAP directly induces DNA damage. However, the consequences of this genotoxic damage remain to be elucidated.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We thank Rosario Ortiz-Hernández for her help with material processing and technical information. This article constitutes a partial fulfillment of the requirements of the PhD Graduate Program in Biological Sciences of National Autonomous University of Mexico (Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México). The doctoral student, Zelmy Castro Gálvez acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT) PhD scholarship CVU-441122 and UNAM.

Acknowledgement to Dirección de Investigación of the Hospital Infantil de México Federico Gómez through Fondos Federales HIM/2016-006 SSA 1257 for the financial support received.

References

- Ali, R., Trump, S., Lehmann, I., Hanke, T., 2015. Live cell imaging of the intracellular compartmentalization of the contaminate benzo[a]pyrene. *J. Biophotonics* 8, 361–371. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300170>.
- Amador-Munoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Miranda, J., Vera-Avila, L.E., 2011. Organic compounds of PM2.5 in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Sci. Total Environ.* 409, 1453–1465. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.026>.
- Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., Fletcher, T., 2004. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 112, 970–978. <https://doi.org/10.1289/ehp.6895>.
- Audebert, M., Zeman, F., Beaudoin, R., Pery, A., Cravedi, J.-P., 2012. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.022>.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y., 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 957–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2523>.
- Burdick, A.D., Davis 2nd, J.W., Liu, K.J., Hudson, L.G., Shi, H., Monske, M.L., Burchiel, S.W., 2003. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and inactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63, 7825–7833.
- Chramostova, K., Vondracek, J., Sindlerova, L., Vojtesek, B., Kozubik, A., Machala, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like H2AX cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.12.008>.
- de Gelder, S., Sundh, H., Pelgrim, T.N.M., Rasinger, J.D., van Daal, L., Flik, G., Berntssen, M.H.G., Klaren, P.H.M., 2018. Trans epithelial transfer of phenanthrene, but not of benzo[a]pyrene, is inhibited by fatty acids in the proximal intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 204, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.006>.
- Dendele, B., Tekpli, X., Hardonniere, K., Holme, J.A., Debure, L., Catheline, D., Arlt, V.M., Nagy, E., Phillips, D.H., Ovrebo, S., Mollerup, S., Poet, M., Chevanne, M., Rioux, V., Dimanche-Boitrel, M.-T., Sergent, O., Lagadic-Gossman, D., 2014. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chem. Biol. Interact.* 207, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.002>.
- Deutsch-Wenzel, R.P., Brune, H., Grimmer, G., Dettbarn, G., Misfeld, J., 1983. Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 539–544. <https://doi.org/10.1093/jnci/71.3.539>.
- Dilley, R.L., Verma, P., Cho, N.W., Winters, H.D., Wondisford, A.R., Greenberg, R.A., 2016. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* 539, 54–58. <https://doi.org/10.1038/nature20099>.
- Franceschin, M., Rizzo, A., Casagrande, V., Salvati, E., Alvino, A., Altieri, A., Ciamaichella, A., Iachettini, S., Leonetti, C., Ortaggi, G., Porru, M., Bianco, A., Biroccio, A., 2012. Aromatic core extension in the series of N-cyclic bay-substituted perylene G-quadruplex ligands: increased telomere damage, antitumor activity, and strong selectivity for neoplastic over healthy cells. *ChemMedChem* 7, 2144–2154. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200348>.
- Furuno, S., Foss, S., Wild, E., Jones, K.C., Semple, K.T., Harms, H., Wick, L.Y., 2012. Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5463–5470. <https://doi.org/10.1021/es300810b>.
- Gdula-Argasinska, J., Czepiel, J., Toton-Zuranska, J., Jarczyszyn, A., Perucki, W., Wolkow, P., 2015. Docosahexaenoic acid regulates gene expression in HUVEC cells treated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* 236, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.05.002>.
- Gerde, P., Muggenburg, B.A., Thornton-Manning, J.R., Lewis, J.L., Pyon, K.H., Dahl, A.R., 1997. Benzo[a]pyrene at an environmentally relevant dose is slowly absorbed by, and extensively metabolized in, tracheal epithelium. *Carcinogenesis* 18, 1825–1832.
- Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossman, D., 2006. Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in F258 cells: protection by exogenous cholesterol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090, 108–112. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.011>.
- Gualtieri, M., Mantecchia, P., Corvaja, V., Longhin, E., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Camatini, M., 2009. Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). *Toxicol. Lett.* 188, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.003>.
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J.A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossman, D., 2007. C-Jun NH2-terminal kinase-related Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67, 1696–1705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2327>.
- Hughes, N.C., Phillips, D.H., 1993. 32P-postlabelling analysis of the covalent binding of benzo[ghi]perylene to DNA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* 14, 127–133.
- Isabel, R.-R.M., Sandra, G.-A., Rafael, V.-P., Carmen, M.-V., Josefina, C.-E., del Carmen, C.-E.M., Rocío, G.-M., Francisco, A.-H., Elena, C.-S.M., 2012. Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol. Mech. Methods* 22, 170–183. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.623330>.
- Kang, F., Chen, D., Gao, Y., Zhang, Y., 2010. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* lam.). *BMC Plant Biol.* 10, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-210>.
- Ke, S., Liu, Q., Yao, Y., Zhang, X., Sui, G., 2018. An in vitro cytotoxicities comparison of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human pulmonary alveolar epithelial cells HPAEpiC. *Toxicol. Lett.* 290, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.03.005>.
- Labib, S., Williams, A., Guo, C.H., Leingartner, K., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Yauk, C.L., White, P.A., Halappanavar, S., 2016. Comparative transcriptomic analyses to scrutinize the assumption that genotoxic PAHs exert effects via a common mode of action. *Arch. Toxicol.* 90, 2461–2480. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1595-5>.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111, 455–460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>.
- Lin, C.-Y., Huang, F.-P., Ling, Y.S., Liang, H.-J., Lee, S.-H., Hu, M.-Y., Tsao, P.-N., 2015. Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics to characterize the biochemical effects of naphthalene on various organs of tolerant mice. *PLoS One* 10, e0120429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120429>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Long, A.S., Lemieux, C.L., Arlt, V.M., White, P.A., 2016. Tissue-specific in vivo genetic toxicity of nine polycyclic aromatic hydrocarbons assessed using the Muta™ Mouse transgenic rodent assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 290, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.010>.
- Mattsson, Å., Malmlöf, M., Seidel, A., Stenius, U., Jernström, B., 2008. H2AX, MDM2 AND P53 phosphorylation are differently affected by bay- and fjord-region diol epoxides derived from carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl. Aromat. Compd.* 28, 392–401. <https://doi.org/10.1080/10406630802374937>.
- Mattsson, A., Jernström, B., Cotgreave, I.A., Bajak, E., 2009. H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[a]pyrene and dibenzo[a,h]perylene diol epoxides. *Chem. Biol. Interact.* 177, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.015>.
- Miguel-Pérez, G., Maya, G., Flores-Márquez, A.R., Amador-Munoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Eguía-Aguilar, P., Pérezpeña-Díazconti, M., Arenas-Huertero, F., 2013. Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón. *Boletín médico del Hosp. Infant. México*.
- Murphy, G.J., Rouse, R.L., Polk, W.W., Henk, W.G., Barker, S.A., Boudreaux, M.J., Floyd, Z.E., Penn, A.L., 2008. Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in respiratory cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 532–540. <https://doi.org/10.1152/ajrc.00000.2008>.

- 1165/rcmb.2007-02040C.
- Pan, S., Li, D., Zhao, L., Schenkman, J.B., Rusling, J.F., 2013. Genotoxicity-related chemistry of human metabolites of benzo[ghi]perylene (B[ghi]P) investigated using electro-optical arrays and DNA/microsome biocolloid reactors with LC-MS/MS. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1229–1239. <https://doi.org/10.1021/tx400147c>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Platt, K.L., 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. <https://doi.org/10.1021/tx049698a>.
- Platt, K.L., Aderhold, S., Kulpe, K., Fickler, M., 2008. Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions. *Mutat. Res.* 650, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.09.011>.
- Robles-Espinoza, C.D., Velasco-Herrera, M. del C., Hayward, N.K., Adams, D.J., 2015. Telomere-regulating genes and the telomere interactome in familial cancers. *Mol. Cancer Res.* 13, 211–222. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0305>.
- Rowan-Carroll, A., Halappanavar, S., Williams, A., Somers, C.M., Yauk, C.L., 2013. Mice exposed in situ to urban air pollution exhibit pulmonary alterations in gene expression in the lipid droplet synthesis pathways. *Environ. Mol. Mutagen.* 54, 240–249. <https://doi.org/10.1002/em.21768>.
- Salcido-Neyoy, M.E., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsebatt, M.E., Melendez-Zajgla, J., Morales-Barcenas, R., Petrosyan, P., Molina-Servin, E.D., Vega, E., Manzano-Leon, N., Garcia-Cuellar, C.M., 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM(1)(0)) of Mexico city: participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Pollut.* 203, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.051>.
- Samara, C., Kouras, A., Kaidoglou, K., Emmanouil-Nikoloussi, E.-N., Simou, C., Bousnaki, M., Kelessis, A., 2015. Ultrastructural alterations in the mouse lung caused by real-life ambient PM10 at urban traffic sites. *Sci. Total Environ.* 532, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.139>.
- Subashchandrabose, S.R., Krishnan, K., Gratton, E., Megharaj, M., Naidu, R., 2014. Potential of fluorescence imaging techniques to monitor mutagenic PAH uptake by microalga. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9152–9160. <https://doi.org/10.1021/es500387v>.
- Tung, E.W.Y., Philbrook, N.A., Belanger, C.L., Ansari, S., Winn, L.M., 2014. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 760, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.003>.
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O., Jones, K.C., 2005. Real-time visualization and quantification of PAH photodegradation on and within plant leaves. *Environ. Sci. Technol.* 39, 268–273.
- Zaboikin, M., Zaboikina, T., Freter, C., Srinivasakumar, N., 2017. Non-homologous end joining and homology directed DNA repair frequency of double-stranded breaks introduced by genome editing reagents. *PLoS One* 12, e0169931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169931>.
- Zaragoza-Ojeda, M., Eguía-Aguilar, P., Perezpeña-Díazconti, M., Arenas-Huertero, F., 2016. Benzo[ghi]perylene activates the AHR pathway to exert biological effects on the NL-20 human bronchial cell line. *Toxicol. Lett.* 256, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.05.023>.
- Zimmer, J., Tacconi, E.M.C., Folio, C., Badie, S., Porru, M., Klare, K., Tumiati, M., Markkanen, E., Halder, S., Ryan, A., Jackson, S.P., Ramadan, K., Kuznetsov, S.G., Biroccio, A., Sale, J.E., Tarsounas, M., 2016. Targeting BRCA1 and BRCA2 deficiencies with G-Quadruplex-interacting compounds. *Mol. Cell* 61, 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.004>.