

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

Estudio de la respuesta en células bronquiales humanas durante la exposición aguda

a benzo[ghi]perileno

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

Carlos Ulises Torres Flores

Comité de tutores:

Codirector: Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero

Codirectora: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Asesora: Dra. María del Carmen Maldonado Bernal

Ciudad de México, 05 de septiembre de 2018

El presente trabajo, fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

*“El Programa de **Maestría en Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **615601***

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "*Estudio de la respuesta en células bronquiales humanas durante la exposición aguda a benzo[ghi]perileno*", que presentó:

Carlos Ulises Torres Flores

El día 05 de septiembre del año 2018

Sinodales

Presidente



Dra. Verónica Souza Arroyo
CBS, Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Secretaria



Dra. María del Carmen Maldonado
Bernal
Hospital Infantil de México Federico
Gómez

Vocal



Dra. Roxana Uri Miranda Labra
CBS, Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Vocal



Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo
CBS, Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Codirector

Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero

Investigador en Ciencias Médicas D, SNI II

Jefe del Laboratorio de Investigación en Patología Experimental

Hospital Infantil de México Federico Gómez

e-mail: farenashuertero@yahoo.com.mx

Tel: 52 289917 ext: 2369, 2367

Codirectora

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Profesor titular C tiempo completo, SNI III

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I

e-mail: mcgr@xanum.uam.mx

Tel: 55 73 29 11, ext. 27304, 27305

Asesora

Dra. María del Carmen Maldonado Bernal

Investigador en Ciencias Médicas D, SNI II

Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica

Hospital Infantil de México Federico Gómez

e-mail: cmaldonadobe@yahoo.com

Tel: 52 289917 ext: 4511

Dedicatorias y agradecimientos

Dedicado y con especial cariño para mis padres, tías y hermanos, quienes me han proporcionado la estabilidad emocional y el cariño incondicional que contribuyeron de manera significativa con mi pleno desarrollo profesional y humano.

Agradezco profundamente a mi comité de tutores, por el asesoramiento y la constante compañía, durante esta travesía.

Por último, agradezco a mis amigos, compañeros de laboratorio y de generación por todos los momentos compartidos.

Gracias a todos ellos, ¡Gracias universo!

RESUMEN

El benzo[*ghi*]perileno (b[*ghi*]p) es un contaminante atmosférico de la familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) generados por combustión incompleta de materia orgánica. Este HAP, es producto de actividades antropogénicas como el uso de automóviles, de hecho, es un indicador de combustión incompleta de gasolinas. En el área metropolitana de la Ciudad de México (AMCDMX), se ha reportado que el b[*ghi*]p, es el contaminante mas abundante en la atmósfera. El presente estudio, se enfoca en los efectos que provoca este HAP sobre la línea celular de epitelio bronquial humano NL20, durante una exposición aguda por 24 horas (h).

Con el uso de técnicas como la exclusión de azul de tripano, actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) y por el ensayo de conteo celular (CCK-8), se determinó que el b[*ghi*]p a la concentración utilizada no provocó cambios en la viabilidad celular; de la misma manera la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) total no fue afectada. Sin embargo, se identificó que las diferencias significativas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) ocurre de las 0.5 a las 3 h de exposición al HAP.

Por último, los análisis de expresión de genes por RT-qPCR, revelaron que las células NL20 expuestas a b[*ghi*]p incrementaron significativamente la expresión de las citocinas proinflamatorias interleucina (IL)-6, interleucina (IL)-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- β . Los resultados sugieren que las citocinas proinflamatorias

podrían ser inducidas por la activación del receptor aril hidrocarburo (AHR), además, por una vía paralela, que se relaciona con la presencia de ERO, ya que cuando las células fueron expuestas a b[*ghi*]p mas un antagonista del AHR (CH223191) o N-acetilcisteína (NAC), el resultado de inducción de genes fue considerablemente disminuido a niveles basales.

ABSTRACT

Benzo[ghi]perylene (b[ghi]p) is an atmospheric pollutant that belongs to the family of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are generated from incomplete combustion of organic matter. This PAH is produced by anthropogenic activities like transporting in diesel or gasoline based vehicles. In fact, b[ghi]p levels are used as indicator of incomplete combustion of gasoline and only in the metropolitan area of Mexico's city, this atmospheric pollutant is the most abundant. Therefore, the effects produced on bronchial cells due to exposure to b[ghi]p need to be studied.

In this research project, we evaluated some possible effects produced by the acute exposure (24 hours) of the bronchial cell line, NL-20, to b[ghi]p. By using the viability assays: trypan blue exclusion, release of lactate dehydrogenase (LDH) and cell counting kit -8 (CCK-8), we found no changes on cell viability after the exposure to b[ghi]p. Furthermore, cells exposed to b[ghi]p did not display changes on superoxide dismutase (SOD) activity at the end of the acute exposure. Nevertheless, greater production of reactive oxygen species (ROS) was identified as early as 0.5 to 3 hours after exposure.

Finally, evaluation of gene expression analysis with the TaqMan™ Array, Human Cytokine Network and by RT-qPCR using SYBER green Master Mix, showed an increase in the expression levels of the proinflammatory cytokines: *IL-6*, *IL-8*, *TNF-β*, after exposure to b[ghi]p. In recovery assays aiming to antagonize the AHR pathway

(with CH223191) and ROS levels (with N-acetylcysteine), the increased expression of proinflammatory cytokines is returned to basal levels. All together these data suggest that exposure to b[ghi]p has two steps inflammatory effect on the bronchial cells. First, an early proinflammatory effect induced by an unknown ROS-production related pathway, and a second proinflammatory effect produced by the AHR detoxification pathway after acute exposure to b[ghi]p.

ÍNDICE

RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura y clasificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). 1	
1.2 Fuentes naturales y antropogénicas de HAPs	3
1.3 Efectos en la salud humana de los HAPs.....	3
1.4 Propiedades fisicoquímicas del b[ghi]p	6
2 ANTECEDENTES	7
3 JUSTIFICACIÓN	9
4 HIPÓTESIS	10
5 OBJETIVO GENERAL	10
5.1 Objetivos específicos.....	10
6 MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1 Línea celular de epitelio bronquial humano NL20 y condiciones de cultivo	11
6.2 Reactivos de Laboratorio.....	11
6.3 Exposición celular y ensayos de citotoxicidad.....	12
6.4 Cuantificación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO)	13
6.5 Preparación de la muestra para el ensayo de superóxido dismutasa (SOD)...	14
6.6 Análisis de expresión de citocinas proinflamatorias por RT-qPCR en placas TaqMan™ Array y corroboración por RT-qPCR de los genes seleccionados.....	15
6.7 Análisis estadístico	17
7 RESULTADOS	18
7.1 Viabilidad en las células NL20.....	18
7.2 El b[ghi]p induce la producción intracelular de ERO en células NL20.....	20
7.3 El b[ghi]p induce la expresión de genes de citocinas proinflamatorias	22

7.4 La expresión de citocinas proinflamatorias es afectada por el antagonista del AHR y por el antioxidante NAC	23
8 DISCUSIÓN	25
9 CONCLUSIÓN	31
10 PERSPECTIVAS.....	32
11 MODELO MOLECULAR PROPUESTO	32
12 REFERENCIAS.....	36

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura y clasificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

(HAPs)

Los HAPs, son compuestos orgánicos formados por 2 o más anillos aromáticos fusionados, constituidos exclusivamente por átomos de carbono e hidrógeno, por lo tanto, no contienen heteroátomos (Lee, 2000; Kim *et al.*, 2013). Se presentan ubicuamente en el ambiente y son la clase de contaminantes ambientales más estudiados (Lee, 2000). Pueden clasificarse en peri-condensados y cata-condensados. Los primeros se definen, como compuestos cuyos centros anulares están unidos y forman ciclos, además, se subdividen en 2 clases. Los alternantes, que están formados exclusivamente por anillos de seis carbonos y los no alternantes, que incluyen algunos anillos de 5 carbonos (Ramesh *et al.*, 2004).

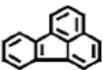
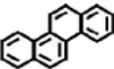
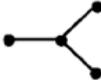
Compuesto	Fórmula	Gráfica	Características
<i>Peri-condensado</i>			
Pireno			Ciclo alternante
Fluorantreno :			Ciclo No alternante
<i>Cata-condensado</i>			
Criseno			Lineales Alternantes no ramificados
Trifenileno			Lineales Alternantes ramificados

Figura 1. Estructuras de los HPAs. Tomado y adaptado de Guillen y Sopelana, 2003.

Por otro lado, los cata-condensados, se definen como aquellos HAPs en los que la disposición de sus anillos no forman ciclos y estos pueden subcategorizarse, como ramificados o no ramificados, siendo los primeros, termodinámicamente más estables y químicamente menos reactivos que los no ramificados del mismo tamaño (Guillen y Sopelana, 2003) (figura 1). La estructura de los HAPs (algunas regiones y posiciones de los átomos de carbono) determinan su actividad biológica, en ese sentido, se puede encontrar regiones, como la región bahía (figura 2A), formada por 3 anillos aromáticos conectados de forma angular, mientras que, la región pseudo-bahía (figura 2B) esta compuesta por dos anillos aromáticos y un anillo alifático terminal. Por otra parte, la región golfo (figura 2C), resulta de la disposición angular de 4 anillos aromáticos, mientras que, en la región pseudo-golfo (figura 2D) el anillo terminal se encuentra saturado (Ramesh *et al.*, 2004).

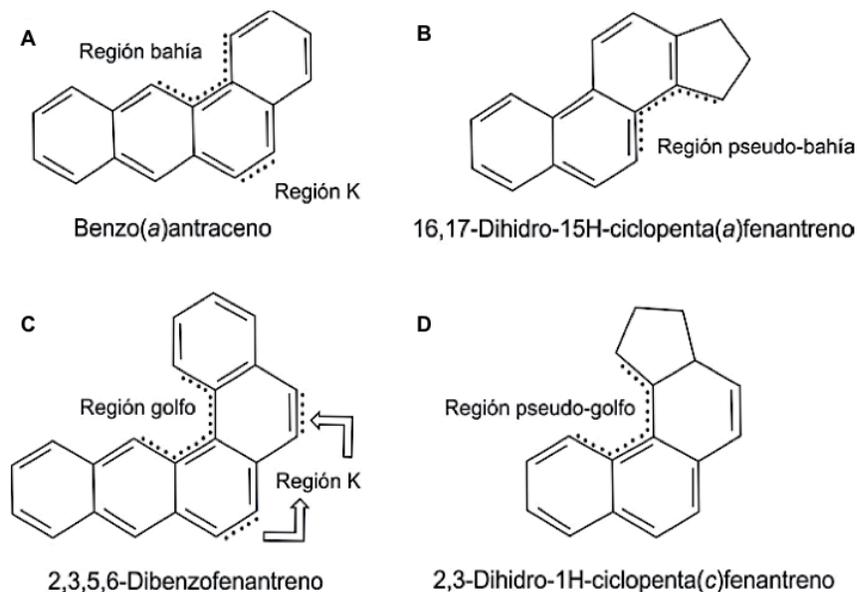


Figura 2. Regiones de los HPAs que determinan su efecto biológico. Tomado de Marin-Morales *et al.*, 2009.

Por último, estos compuestos presentan una región denominada K, la cual, es altamente electrodensa lo que permite la formación de epóxidos y es blanco de los ataques en las reacciones de biotransformación (Marin-Morales *et al.*, 2009).

1.2 Fuentes naturales y antropogénicas de HAPs

Las características fisicoquímicas de los HAPs hacen que sean fácilmente dispersados en el medio ambiente (Kim *et al.*, 2013), permitiendo ser distribuidos por el aire, asociados a material particulado con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 micrómetros (PM_{2.5}) (Ferecatu *et al.*, 2010), en partículas de agua, aceite, vegetación e incluso en la comida cocinada a la parrilla (Lee, 2000, Kim *et al.*, 2013). Estos compuestos, son formados principalmente por la combustión incompleta de hidrocarburos y materia orgánica (Lee, 2000). La mayor fuente de emisión de los HAPs hacia la atmósfera es de origen antropogénico, como el uso de vehículos a motor, algunos tipos de calefacción en el hogar, la combustión de hidrocarburos fósiles y algunas actividades industriales (Lee, 2000, Salam *et al.*, 2011), mientras que, en menor medida, los incendios forestales y las erupciones volcánicas contribuyen a la formación y acumulación de estos compuestos de manera natural (Naufal, 2008).

1.3 Efectos en la salud humana de los HAPs

Los seres humanos están expuestos a los HAPs principalmente por vía respiratoria y uno de los órganos blanco donde ejercen efecto tóxico son los pulmones (Podechard

et al., 2008). Estos compuestos son lipofílicos, por lo que, pueden ser absorbidos por las células (Hassanien, 2009) y provocar efectos carcinogénicos, proinflamatorios, exacerbación del asma o alergia, (Bølling *et al.*, 2012; Podechard *et al.*, 2008). Cuando los HAPs ingresan por vía aérea, son incorporados por células del epitelio bronquial y macrófagos alveolares (Li *et al.*, 2002), que revisten la superficie pulmonar y son los blancos celulares primarios para las partículas depositadas, (Bølling *et al.*, 2012). De esta manera, su respuesta dependerá del tamaño y del sitio donde sean depositados estos compuestos (Nel *et al.*, 2001).

Las células del epitelio bronquial, no sólo desempeñan un papel importante en la inflamación alérgica, sino que, presentan respuestas biológicas que incluyen la liberación de mediadores proinflamatorios como la IL-1 α , IL-8, TNF α (Bølling *et al.*, 2012; Ferecatu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2002) lo que repercute, directa o indirectamente en la actividad de eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, macrófagos y linfocitos (Bayram *et al.*, 1998). Sin embargo, dado que las células epiteliales no son fagocíticas y difieren en muchos otros aspectos de los macrófagos (principales fagocitos), el mecanismo de acción de los HAPs en estas células, aún no se ha descrito completamente (Nel *et al.*, 2001).

Los efectos de los HAPs en la salud generalmente aparecen bajo exposiciones agudas (Visciano y Perugini, 2011). La exposición aguda *in vitro* a los HAPs presentes en PM_{2.5} se asocia con la respuesta inflamatoria, como consecuencia del

incremento del estrés oxidante en la célula (Ferecatu *et al.*, 2010). Estos compuestos, también, son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) e interferir en la transferencia de electrones en la mitocondria, así mismo, se demostró que esta interferencia tiene lugar entre los complejos I-III, lo que sugiere, que las quinonas de ciclo redox como la 9 y 10-fenantaquinona pueden interrumpir el ciclo Q que opera entre los complejos I y III. Esta interrupción en el flujo de electrones favorece la formación de ubi-semiquinonas, contribuyendo así la producción del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Xia *et al.*, 2004).

La respuesta biológica y metabolismo de los HAPs, se realiza mediante la activación de enzimas de la familia del citocromo P450, que forman especies electrofílicas capaces de reaccionar con sitios nucleofílicos del DNA y formar aductos (Visciano y Perugini, 2011). Esta respuesta se relaciona con la activación del receptor aril hidrocarburo (AHR, por sus siglas en inglés) (Podechard *et al.*, 2008). El AHR, es un factor de transcripción ligando dependiente, que se transloca al núcleo (Fan *et al.*, 2009), se une a la región promotora de los elementos de respuesta a xenobióticos (ERXs) para activar la transcripción de genes de enzimas biotransformadoras de fase I (como los citocromos CYP 1A1/2, etc.) y de fase II que contribuyen a la desintoxicación de los xenobióticos (Podechard *et al.*, 2008).

Por otra parte, en el año 2002, el comité científico sobre alimentos (SCF, por sus siglas en inglés) concluyó que, 15 HAPs, entre ellos el benzo[ghi]perileno (b[ghi]p),

mostraron evidencia de mutagenicidad/genotoxicidad en células somáticas de animales experimentales y que con excepción del b[ghi]p, todos mostraron efectos de carcinogénesis en varios experimentos con animales. Por ello, la SCF estableció que estos HAPs deben considerarse como potencialmente genotóxicos y carcinogénicos a humanos, (Visciano y Perugini, 2011). Por otra parte, la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), clasifica al b[ghi]p en el grupo 3: el agente o mezcla, no es clasificable en cuanto a su carcinogenicidad, porque la evidencia, es inadecuada en humanos e inadecuada o limitada en animales de experimentación, (IARC, 2010).

1.4 Propiedades fisicoquímicas del b[ghi]p

La fórmula molecular del b[ghi]p es $C_{22}H_{12}$ y su masa molecular es de 276.33 g/mol, este hidrocarburo, es un compuesto sólido en forma de cristales de color verdoso a temperatura ambiente y al solubilizarse presenta un color amarillo o amarillo verdoso. Su punto de fusión es de 278 °C, mientras que, el de ebullición es de 500 °C y su coeficiente de partición agua/etanol es de 6.63 (Michigan.gov, 2018). En su estructura molecular no se encuentran heteroátomos (figura 3), además, está conformado por 6 anillos cíclicos de 6 carbonos. No posee regiones bahía, pero si regiones K. Es clasificado como un HAP pericondensado cicloalternante (Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2016).

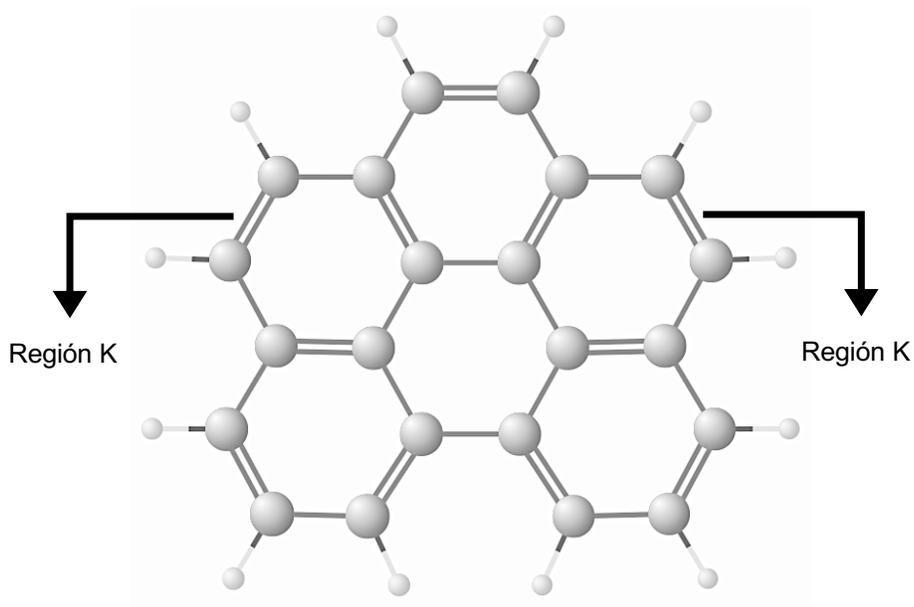


Figura 3. Estructura del b[ghi]p. Se muestran las regiones K, que son susceptibles a biotransformaciones. Los círculos grandes representan átomos de carbono, mientras que, los pequeños representan átomos de hidrogeno. Tomado y adaptado de: Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2018.

2 ANTECEDENTES

El área metropolitana de la Ciudad de México (AMCDMX) está localizada en una cuenca dentro de la meseta central de México, con una población de alrededor de 20 millones en la zona metropolitana del Valle de México (INEGI, 2015), además, cuenta con 5.5 millones de automóviles y cada año se suman 250 mil vehículos nuevos en promedio al parque vehicular (Fimevic, 2018). También cuenta con alrededor de 35000 industrias. El área urbana es de alrededor de 3500 Km² a una altitud de 2240 metros sobre el nivel del mar y se encuentra rodeada por altas montañas. Estas características geográficas, hacen que la calidad del aire no sea óptima (Zaragoza-Ojeda, *et al.*, 2016). En consecuencia, en las últimas décadas se han realizado investigaciones dirigidas a identificar contaminantes atmosféricos. En ese sentido, en

el estudio realizado por Amador-Muñoz, *et al.*, 2011, se identificaron a HAPs en muestras recolectadas de cinco estaciones de monitoreo de la Ciudad de México (Tlalnepantla, localizado al Noroeste (NO); San Agustín, ubicada al Noreste (NE); Merced, ubicada en el centro (Centro); Coyoacán, ubicado al Suroeste (SO); y la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, ubicada al Sureste (SE). Posteriormente, clasificaron a los HAPs en dos grupos, los de bajo peso molecular ($<228 \text{ g mol}^{-1}$), referidos como HAPs ligeros y los de alto peso molecular ($\geq 228 \text{ g mol}^{-1}$), referidos como HAPs pesados. Estos últimos, fueron los más abundantes en la zona centro y en particular el b[ghi]p, mostró concentraciones superiores respecto a los otros 4 sitios de monitoreo. Esto se debe, probablemente, a que esa zona es residencial y comercial, en consecuencia, es altamente impactada por las emisiones de vehículos, lo cual, ha provocado que sea considerado como un marcador de combustión de gasolina.

Por otra parte, Tokiwa *et al.*, 1998, en su estudio, determinaron la concentración de HAPs en tejido pulmonar y así correlacionarla con la presencia de cáncer. Para ello, recolectaron y analizaron biopsias de pacientes con cáncer (293) y con tuberculosis, pero sin carcinoma (63) como testigo, durante los periodos de 1961-1962. En este periodo, se registró muy mala calidad del aire, debido a que no había regulación de las emisiones originadas por automóviles, además, se incluyó el periodo de 1991-1996, en el cual, se estableció regulación de emisión de contaminantes a la atmosfera. Sus hallazgos revelaron, que existe una correlación entre la acumulación de HAPs y la edad, siendo las biopsias de pacientes con edad avanzada en las que

se encontró mayor concentración de los HAPs y los 3 contaminantes mas abundantes en las muestras fueron, el b[ghi]p, el pireno y el fluorantreno. Finalmente, Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2016, en su estudio, utilizó los resultados obtenidos por las investigaciones de Amador-Muñoz *et al.*, 2011 y Miguel-Peréz, *et al.*, 2013, con el fin de escalar las concentraciones atmosféricas del b[ghi]p y calcular su porcentaje presente en la fracción orgánica del PM_{2.5}. Con ello, obtuvo tres concentraciones, la primera de 0.272 µg/mL (correspondiente a la zona noreste en temporada de lluvias), la segunda de 0.561 y la tercera de 1.24 µg/mL (ambas, correspondientes a la zona centro, pero una en temporada de lluvias y la otra en temporada seca). Con esas concentraciones, evaluaron la toxicidad inducida por el b[ghi]p en células bronquiales humanas, obteniendo como resultado, que este HAP, activa la vía del AHR a las 24 h, principalmente a la concentración de 1.24 µg/mL.

3 JUSTIFICACIÓN

El b[ghi]p, es el HAP más abundante de la atmósfera de la CDMX y es un indicador de contaminación por combustión incompleta de gasolina, por ello, es importante describir los efectos que provoca este contaminante en distintos modelos biológicos. Si bien, existe evidencia de estudios *in vitro* del efecto citotóxico de este compuesto, aún no se han descrito, las citocinas proinflamatorias que son inducidas, cuando es aplicado el b[ghi]p, que podrían asociarse a enfermedades respiratorias o a procesos inflamatorios. Este trabajo contribuye a describir, los efectos provocados por este HAP en células bronquiales humanas.

4 HIPÓTESIS

El b[ghi]p es un compuesto potencialmente citotóxico, que por exposición aguda durante 24 h generará estrés oxidante en células bronquiales humanas de la línea NL-20 e inducirá la expresión de genes que participan en procesos inflamatorios, como las citocinas.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos *in vitro* de una exposición aguda al b[ghi]p en células bronquiales humanas de la línea NL-20.

5.1 Objetivos específicos

Evaluar el efecto citotóxico del b[ghi]p.

Determinar el efecto del b[ghi]p en la generación de especies reactivas de oxígeno.

Evaluar el efecto del b[ghi]p en la respuesta proinflamatoria en células pulmonares.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Línea celular de epitelio bronquial humano NL20 y condiciones de cultivo

En este trabajo, se utilizó la línea celular NL20 (ATCC® CRL2503™), que es una línea inmortalizada, no tumoral, de epitelio bronquial humano, derivada de bronquios normales, obtenida de la autopsia de una víctima de accidente. La línea celular, fue establecida por transfección con el origen de replicación del SV40 large T plásmid, p129. Las células NL20 se cultivaron en medio Ham's F12 con 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 2.7 g/L glucosa, 2.0 mM de L-glutamina, 0.1 mM de amino ácidos no esenciales, 0.005 mg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 0.001 mg/ml transferrina, 500 ng/ml de hidrocortisona, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 100 µg/mL de penicilina-G y 4% de suero fetal bovino (SFB). Las células se incubaron en una atmósfera con humedad relativa, conteniendo 5% de CO₂ a 37 °C y se subcultivaron, cuando se alcanzó una confluencia del 80%, usando tripsina al 0.05 % y verseno al 0.01 %, durante 10 min a 37°C.

6.2 Reactivos de Laboratorio

A continuación se mencionan los reactivos utilizados y su correspondiente marca. El b[ghi]p y el antagonista del AHR (CH223191), con pureza >98% de Sigma-Aldrich. Por otra parte, el ensayo para el conteo celular (CCK-8) de Dojindo molecular technologies, mientras que, para la detección de especies reactivas de oxígeno (O₂[•] y H₂O₂) de Invitrogen y de ThermoFisher scientific™. Para el ensayo de la superóxido

dismutasa de abcam®. El TRIzol® de Invitrogen. Las placas TaqMan™ Array, Human Cytokine Network, Fast 96-well, la DNase I, Rnase-free, el ReverAid First strand cDNA synthesis y el Maxima SYBR green qPCR Master Mix kit de ThermoFisher scientific™. El ensayo para la deshidrogenasa láctica (LDH por sus siglas en inglés) y demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

6.3 Exposición celular y ensayos de citotoxicidad

Las células NL20 fueron sembradas en placas de 96 pozos. Se colocaron 15,000 células/cm² y se cultivaron en una atmósfera con humedad relativa, conteniendo 5% de CO₂ a 37 °C. Las células fueron expuestas a b[ghi]p durante 24 horas (h) a una concentración de 1.24 µg/mL, cuya conversión a Molaridad es de 4.4 µM (microMolar) y este valor será referido en adelante. Cada ensayo se realizó por triplicado en tres diferentes series (n=9). El b[ghi]p, fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO), referido en adelante como vehículo y preparado en medio de cultivo, el cual, se aplicó a una concentración final menor de 0.01%, además, se realizaron ensayos con un antagonista del AHR (CH223191) a una concentración de 10 µM.

El conteo celular se realizó con un hemocitómetro y la viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión del colorante azul de tripano. Para el caso del ensayo citotóxico basado en la actividad de LDH en el medio de cultivo, una vez, concluido el tiempo de exposición (24 h), el sobrenadante del medio de cultivo libre de células (100 µL) se transfirió a otra placa de 96 pozos, con el fin de evaluar la

actividad de la LDH. En adelante, se siguieron las especificaciones del fabricante y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nanómetros (nm).

La viabilidad celular se determinó con el kit CCK-8, para esta metodología se sembraron 15,000 células/cm² en placas de 96 pozos y se consideró prolongar los tiempos de exposición a 24, 48 y 72 h, con el fin de determinar, si exposiciones por periodos mas prolongados alteraban la viabilidad celular. Concluida la exposición, se retiró el medio con tratamiento, se agregaron 100 µL de medio fresco sin SFB y 10 µL de la solución de CCK-8. Finalmente, se incubó durante una hora y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

6.4 Cuantificación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los niveles intracelulares de ERO fueron cuantificados con Dihidroetidio (DHE) que es un indicador del O₂[•] y emite fluorescencia cuando es oxidado. Para este ensayo, se sembraron 15,000 células/cm² en placas de 96 pozos con fondo transparente y paredes negras. El DHE, inicialmente fue resuspendido en dimetil-sulfóxido (DMSO) como lo indica el fabricante. Transcurido el tiempo de exposición, se retiró el medio con tratamiento de las células y se agregaron 100 µL a cada pozo de DHE, estabilizado en solución de fosfatos Krebs-Ringer (KRPg), 1 µL de DHE por cada mL de KRPg.

El K RPG está compuesto por 145 mM de NaCl, 5.7 mM de fosfato de sodio, 4.86 mM KCl, 0.54 mM de CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄ y 5.5 mM de glucosa a pH 7.35. Se incubó durante 15 minutos (min) a 37 °C y se cuantificó la fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 580 nm y a una longitud de onda de excitación de 606 nm, como testigo negativo, se aplicaron 10 mM del antioxidante N-acetilcisteína (NAC).

Por otra parte, para cuantificar el H₂O₂, se utilizó Amplex[®] (reactivo rojo 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), que al oxidarse genera un producto rojo fluorescente llamado resorufina. Se prepararon 50 µM de Amplex[®] y 0.1 U/mL de peroxidasa de rabano picante (HRP) en K RPG. Se retiró el medio con tratamiento de las células y se agregaron 100 µL de la solución antes mencionada. Se incubó durante 10 min a 37 °C y se midió la fluorescencia en un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación de 545 nm y a una longitud de onda de emisión de 595 nm.

Los resultados se reportaron en unidades relativas, normalizadas con el vehículo. Como testigo positivo, se utilizó H₂O₂ a una concentración de 250 µM y como testigo negativo, se aplicaron 10 mM de NAC.

6.5 Preparación de la muestra para el ensayo de superóxido dismutasa (SOD)

Para este ensayo, se cosecharon 2x10⁶ células de cada condición experimental establecida. Posteriormente, se lisaron en frío con 0.1 M de Tris/HCl a pH 7.4 conteniendo 0.5% de Tritón X-100, 5 mM β-ME (β-mercapto-etanol), 0.1mg/ml PMSF

(fluoruro de fenilmetilsulfonilo). El lisado, se centrifugó a 14,000 x g (fuerza centrífuga relativa) por 5 min a +4 °C. En seguida, se recolectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio, mantenido en hielo. Para concluir este ensayo, se siguieron las especificaciones del fabricante. La actividad de la SOD fue medida en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

6.6 Análisis de expresión de citocinas proinflamatorias por RT-qPCR en placas TaqMan™ Array y corroboración por RT-qPCR de los genes seleccionados

El RNA total fue extraído con el reactivo comercial TRIzol®, posteriormente, se hizo un tratamiento con DNAsa, agregando 1µL de la enzima, 1 µL del buffer con MgCl₂ por cada 1µg de RNA y se llevó a un volumen final de 10 µL, se incubó a 37 °C por 30 min. Concluido el tiempo de incubación, se agregó 1 µL de EDTA 50 mM y se volvió a incubar a 65 °C por 10 min. Después, se realizó la síntesis de cDNA en un termociclador de punto final con el siguiente perfil térmico: 37 °C por 60 min, 70 °C por 10 min y por último 22 °C por un min. La síntesis de cDNA, se realizó con el kit ReverAid First strand cDNA synthesis, bajo las siguientes condiciones: 37 °C por 60 min, 70 °C por 10 min y finalmente, 22 °C por 1 min.

Posteriormente, para revelar los perfiles de expresión de los genes de la red de citocinas humanas, se usaron las placas TaqMan™ Array, Human Cytokine Network. Se utilizó el siguiente perfil térmico: temperatura de disociación a 95 °C por 3 segundos (s), temperatura de alineamiento/extensión a 60 °C por 30 s, durante 40

ciclos. Esto se realizó en un termociclador en tiempo real 7900HT de ThermoFisher scientific™ en la unidad de secuenciación y microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). En los ensayos de expresión de los genes seleccionados, se normalizó para las placas TaqMan™ Array con el gen endógeno *18s* y para los ensayos con Sybr Green con *β-actina*. Posteriormente, la diferencia entre los niveles de expresión de los genes seleccionados de células expuestas al vehículo y expuestas al b[ghi]p, se utilizó el algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (Cachon et al., 2014). Del análisis de expresión de las placas TaqMan™ Array, se decidió estudiar los genes de *IL-12A*, *IL-6*, *IL-8* y *TNFβ*.

Para verificar si su expresión depende de la expresión del AHR, también, se evaluó en presencia del antagonista del AHR (CH223191) a una concentración de 10 μM. Finalmente, para corroborar los genes seleccionados de las placas TaqMan™ Array, Human Cytokine Network, se realizó RT-qPCR, pero esta vez, se utilizó Syber Green como fluorocromo principal y ROX™ como tinción pasiva de referencia. Los iniciadores de los genes analizados se muestran en la tabla 1. La reacción se realizó en un termociclador Agilent Mx3005 P, con el siguiente perfil térmico: 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 s y la temperatura de disociación para cada iniciador por 1 min, finalizando con un ciclo de 95 °C por 1 min, 58 °C por 30 s y 95 °C por 30 s.

6.7 Análisis estadístico

Siempre se evaluaron las diferencias entre las células expuestas al vehículo contra las expuestas al b[ghi]p. Para el análisis estadístico de los valores obtenidos de la viabilidad celular, cuantificada por la exclusión de azul de tripano, actividad de LDH y actividad de SOD, se utilizó t-test. Las diferencias en la expresión de los genes analizados por RT-qPCR en placas TaqMan™ Array, se realizó mediante ANOVA de dos vías, mientras que, para la corroboración de los genes de citocinas seleccionados analizados por RT-qPCR, se utilizó ANOVA de una vía y para ambas se aplicó una prueba post hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05. Para el procesamiento de datos, se utilizó Microsoft® Excel, versión 16.12 (180410) y el GraphPad PRISM®, versión 6.0c.

Tabla 1. Secuencia de iniciadores utilizados para los ensayos de qRT-PCR

Gen	Secuencia 5'→3'	Tamaño nucleótidos	Temperatura de alineamiento	Producto nucleótidos
<i>β-actina</i>	F: AATGAGCTGCGTGTGGCT R: ATAGCACAGCCTGGATAGCA	18 20	58 °C	90
<i>AHR</i>	F: GGCTCTGAATGGCTTTGTATT R: TGACATCAGACTGCTGAAACC	20 21	60 °C	101
<i>CYP4B1</i>	F: CCACTCTGGTTCGGACAGTT R: GCTGTACACAGCTTTGGCAT	20 20	58 °C	72
<i>IL-6</i>	F: ATCTCAGCCCTGAGAAAGGA R: CCATCTTTGGAAGGTTTCAGG	20 20	60 °C	97
<i>IL-8</i>	F: CTGCGCCAACACAGAAATTA R: CTGCACCCAGTTTTCTTG	20 19	58 °C	79
<i>IL-12A</i>	F: CTTTTATGATGGCCCTGTGC R: AGAAGCTTTGCATTCATGGTC	20 21	60 °C	88
<i>TNF-β</i>	F: CCTGCTGCTCACCTCATTG R: CTCAAGGAGAAACCATCCTG	19 20	60 °C	98

7 RESULTADOS

7.1 Viabilidad en las células NL20

Después de la exposición con 4.4 μM de b[ghi]p durante 24 h, se determinó la viabilidad de las células NL20 mediante 3 técnicas. La primer técnica empleada fue la exclusión del colorante azul de tripano, con ella se encontró que con el b[ghi]p no hay incorporación del colorante a las células ($p < 0.05$), lo cual indica, que las células son viables (figura 4A). La segunda técnica, se basa en la actividad de LDH en el medio de cultivo, en la cual tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos entre las células expuestas al vehículo y al hidrocarburo (figura 4B). De igual forma, con el reactivo CCK-8, basado en la reducción de WST-8 por deshidrogenasas en la célula, se confirma que el b[ghi]p no produce cambios en la viabilidad celular, esto incluso a tiempos de 48 y 72 h (figura 4C; $p > 0.05$). Es importante mencionar, que se realizaron experimentos en presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), 30 min antes de concluir el tiempo de exposición, para utilizar esta condición como control positivo de la prueba y cuantificar la viabilidad mediante las tres técnicas descritas anteriormente, mostrando que la técnica fue realizada adecuadamente. También, se expusieron células al antagonista CH-223191 a una concentración de 10 μM , con el objetivo de verificar que este compuesto no provocara cambios en la viabilidad celular. Después de su evaluación con las técnicas anteriores, no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

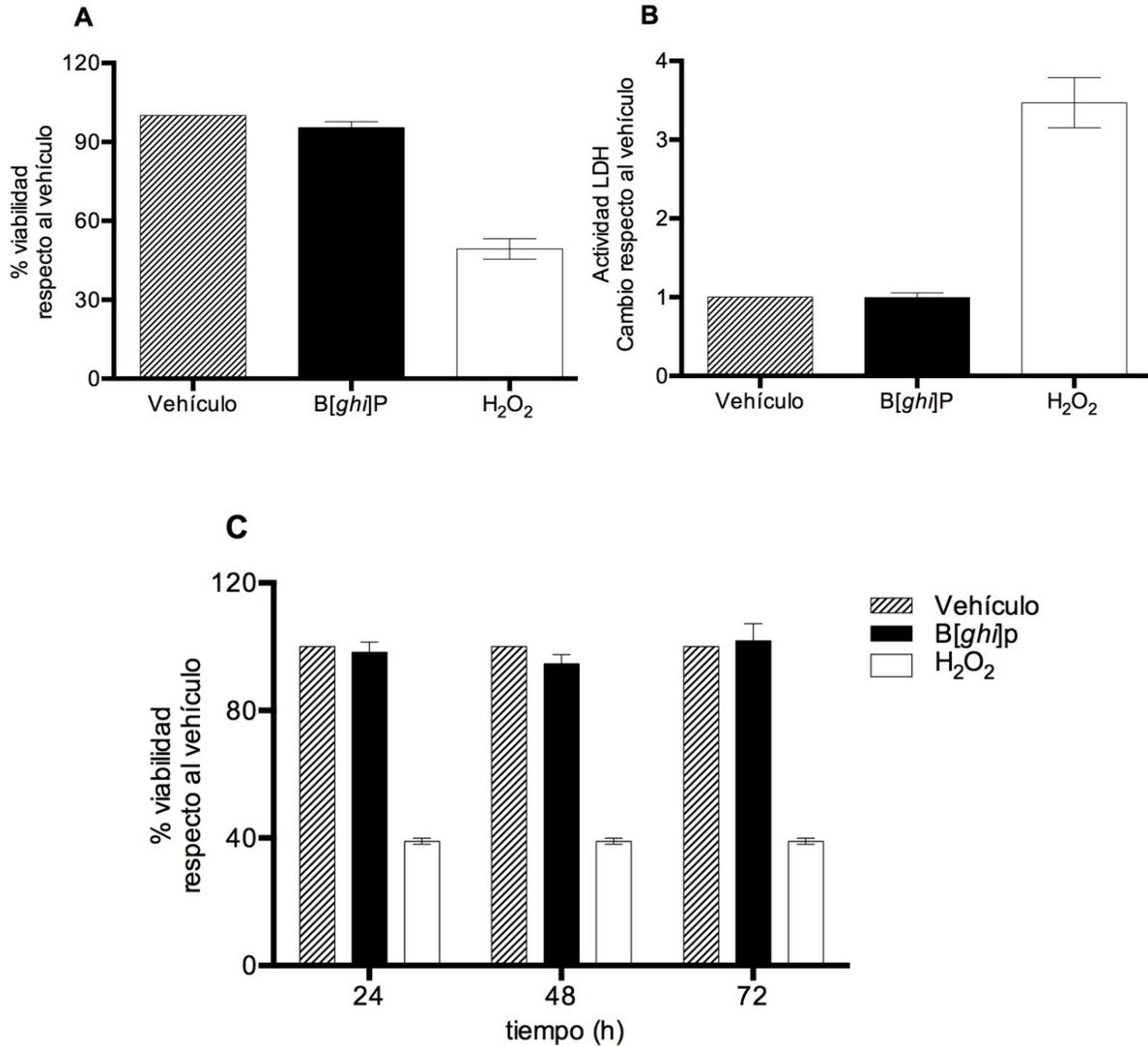


Figura 4. Ensayos de viabilidad en células NL20. A) El porcentaje de viabilidad celular no se afectó al exponer las células NL20 a b[ghi]p 4.4 μ M y al vehículo durante 24 h. **B)** Actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo después de la exposición a b[ghi]p por 24 h, no se observaron diferencias significativas. **C)** Viabilidad celular determinada con el kit CCK-8, no se observaron diferencias significativas después de la exposición a b[ghi]p durante 24, 48 y 72 h. Para A y B se utilizó t-test como prueba estadística, mientras que para C se utilizó ANOVA de dos vías complementada con la prueba Sidak para la corrección de múltiples comparaciones. Valores graficados con el error estándar de la media (SEM). Ensayos realizados por triplicado en tres diferentes series (n=9). H₂O₂: peróxido de hidrógeno; LDH: deshidrogenasa láctica.

7.2 El b[ghi]p induce la producción intracelular de ERO en células NL20

Con en el ensayo de fluorescencia utilizando DHE, se examinó si el b[ghi]p induce la producción del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Las células NL20, fueron expuestas al vehículo y al b[ghi]p a diferentes tiempos (0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h), observándose, que la producción de $O_2^{\bullet-}$ es dependiente del tiempo de exposición: a las 0.5, 1 y 3 h, se observó un incremento en las células expuestas a b[ghi]p, que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al compararlo contra la producción en células expuestas al vehículo. El mayor cambio en la fluorescencia se observó a las 0.5 h (figura 5A).

Por otra parte, se examinó si el b[ghi]p induce la producción de H_2O_2 mediante el ensayo de fluorescencia con Amplex[®], por lo cual, se expusieron las células NL20 al b[ghi]p durante diferentes tiempos (0.25, 0.5, 1, 3 y 6 h), observándose, que el mayor cambio en la fluorescencia se identificó a las 0.5 h (figura 5B) y en ese tiempo fue donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar las células expuestas a b[ghi]p contra las células expuestas al vehículo.

Durante la cuantificación de ambas ERO, se verificó la inhibición de producción en presencia de un antioxidante y para ello se realizaron experimentos agregando N-acetilcisteína (NAC) a una concentración de 10 mM 16 h antes del ensayo (testigo negativo para la producción de ERO). Por último, respecto a los resultados de la actividad de la SOD total, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) al exponer las células NL-20 al b[ghi]p (figura 5C).

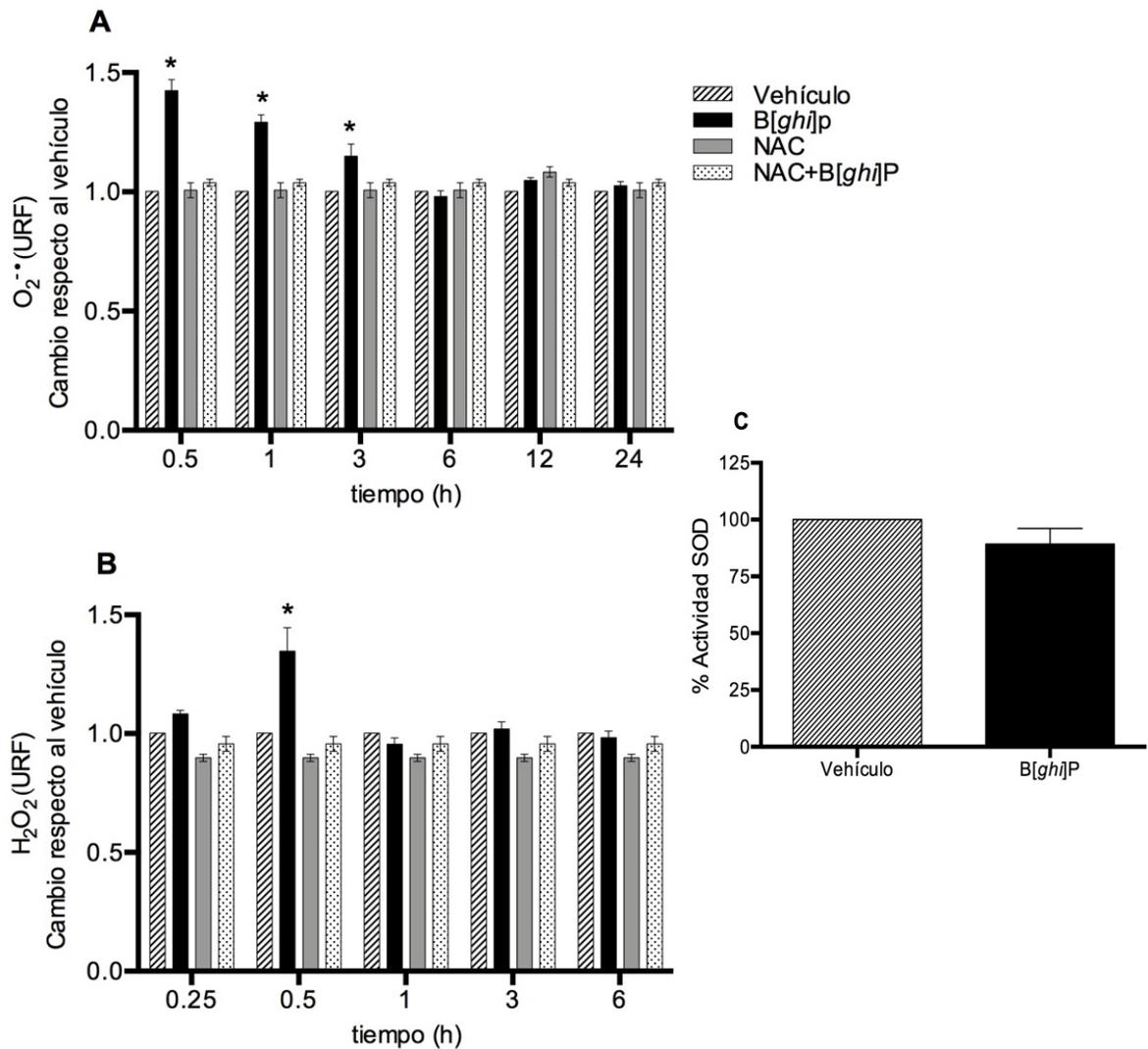


Figura 5. Inducción de ERO por exposición a b[ghi]p en la línea celular NL20 y actividad de la SOD. (A) Células expuestas a b[ghi]p generan anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en las primeras 3 h de exposición. **(B)** La mayor generación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) ocurre a las 0.5 h de exposición. **(C)** Actividad de la SOD en la línea NL20 evaluada al concluir la exposición a $4.4 \mu M$ de b[ghi]p por 24 h. * $p < 0.05$ al comparar el b[ghi]p contra el vehículo. A y B ANOVA de dos vías Tukey's post hoc; para C se aplicó t-test. Valores graficados con el error estándar de la media (SEM). Ensayos realizados por triplicado en tres diferentes series ($n=9$). URF: unidades relativas de fluorescencia; h: horas; SOD: superóxido dismutasa; NAC: N-acetilcisteína.

7.3 El b[ghi]p induce la expresión de genes de citocinas proinflamatorias

Para determinar si el b[ghi]p induce la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias, se utilizaron placas de arreglos TaqMan®, 28 genes contenidos en la placa pertenecen a una red de citocinas humanas y 4 corresponden a genes endógenos. Como resultado de este ensayo, se obtuvo, que la exposición durante 24 h a b[ghi]p induce significativamente la expresión relativa de los genes de citocinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-6, interleucina (IL)-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- β . El mayor aumento en la expresión fue para el gen de IL-8 de aproximadamente 1.5 unidades respecto al vehículo. Por otra parte, para el caso del gen de IL-12A, se observó una disminución de 0.5 unidades en la expresión relativa respecto al vehículo ($p < 0.05$), (figura 6).

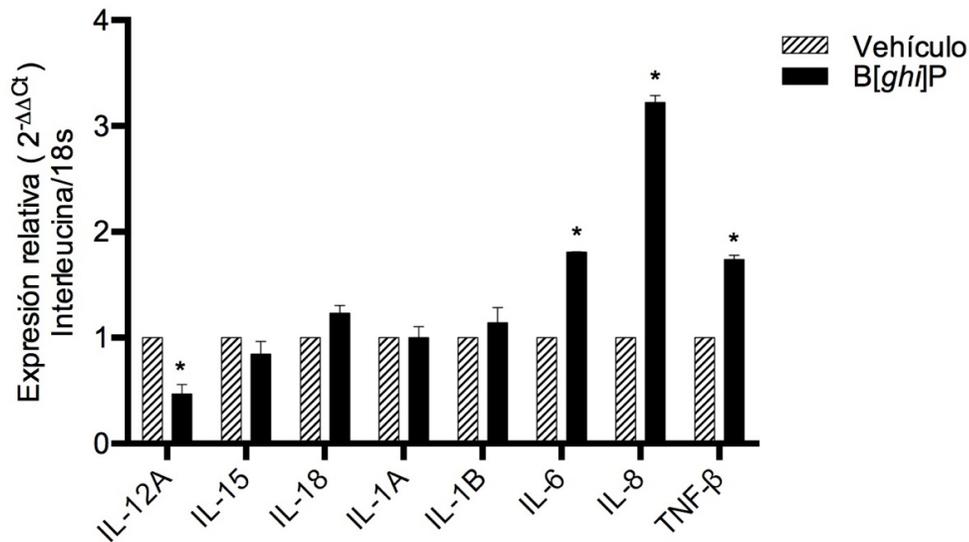


Figura 6. Efecto del b[ghi]p en la expresión de genes de citocinas proinflamatorias en el arreglo Taqman. El b[ghi]p induce significativamente la expresión de la Interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y del factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), pero no de IL-12A después de una exposición a una concentración de 4.4 μ M durante 24 h. * $p < 0.05$ al comparar el b[ghi]p contra el vehículo. ANOVA de dos vías Tukey's post hoc. Valores graficados con el error estándar de la media (SEM). Ensayos realizados por triplicado en tres diferentes series (n=9).

7.4 La expresión de citocinas proinflamatorias es afectada por el antagonista del AHR y por el antioxidante NAC

Con el propósito de corroborar que el b[ghi]p induce la expresión del *AHR* y algunos de sus genes blanco, como el citocromo P450 4B1 (*CYP4B1*), se realizó la cuantificación por RT-qPCR. Se comprobó, que ambos genes son inducidos de manera importante en las células NL20 al exponerlas al HAP (figura 7), además, se observó, que esta expresión disminuye significativamente, en el caso de *AHR* fue de 3 veces, mientras que para *CYP4B1* fue de 4 veces al agregar el CH223191 más el b[ghi]p. También, se observó, que al agregar NAC más el b[ghi]p a las células NL20, la expresión de *AHR* disminuyó 4 veces comparándola con los niveles de expresión en células que solo fueron expuestas a b[ghi]p; resultados similares se obtuvieron para la expresión del *CYP4B1* (figuras 7A y 7B).

Después, se verificó la expresión de los genes de las citocinas *IL-6*, *IL-8*, *TNF- β* e *IL-12A* por RT-qPCR y efectivamente, la expresión de estas tres citocinas incremento de manera significativa ($p < 0.05$) al exponerlas a b[ghi]p durante 24 h (figura 8). Sin embargo, este efecto se abatió en las células expuestas al CH223191, además, cuando las células NL20 fueron expuestas al CH223191 mas b[ghi]p, disminuyó la expresión relativa ($p < 0.05$), para la *IL-6* la disminución fue de 2 veces (figura 8A), mientras que, para *IL-8* un orden de magnitud (figura 8B) y para *TNF- β* de 3 veces (figura 8C). Las comparaciones, se realizaron contra las células expuestas solo a b[ghi]p.

Con el uso del CH223191 y b[ghi]p juntos se evidenció que la inducción del mRNA de esas 3 citocinas, también, podría ser por una vía independiente de AHR, pero que esta relacionada a la presencia de ERO, puesto, que al exponer las células al NAC más el b[ghi]p no se observó esta inducción de las tres citocinas mencionadas al compararlas con las células expuestas solo al b[ghi]p (figuras 8A, B y C; $p < 0.05$). Finalmente, para el caso de *IL-12A*, no se encontraron diferencias significativas como las reportadas en la figura 6, donde el b[ghi]p disminuyó la expresión 0.5 veces respecto al vehículo, por lo cual, aparentemente el b[ghi]p no provoca cambios en la expresión de *IL-12A* durante su exposición a las 24 h (figura 8D).

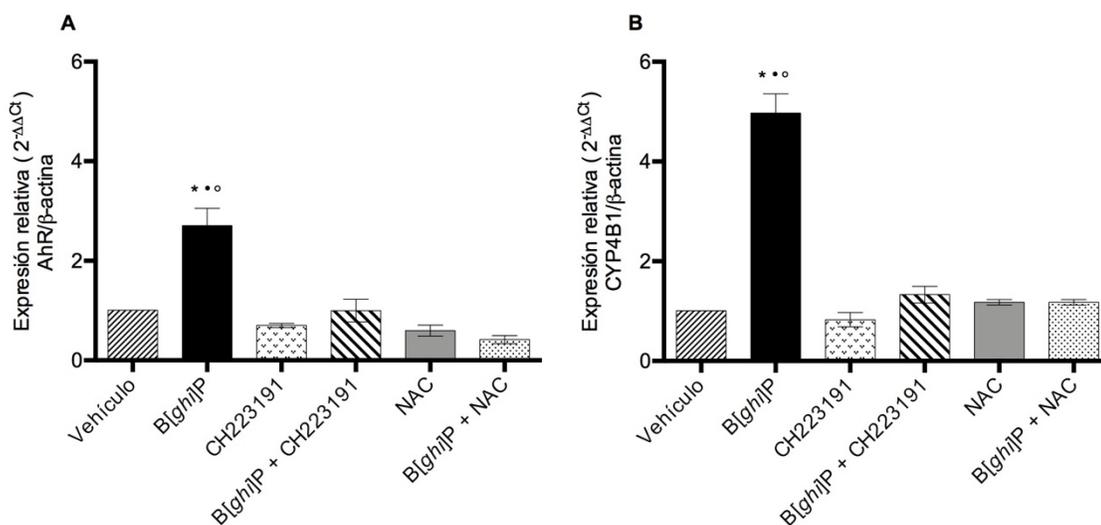


Figura 7. Expresión de los genes *AhR* y *Cyp4b1* en las células NL20. El b[ghi]p induce significativamente la expresión de *AHR* y *Cyp4b1* después de una exposición a 4.4 μM durante 24 h. * $p < 0.05$ al comparar el b[ghi]p contra el vehículo; ** $p < 0.05$ al comparar b[ghi]p contra b[ghi]p+CH223191; *** $p < 0.05$ al comparar el b[ghi]p contra b[ghi]p+NAC. ANOVA de una vía Tukey's post hoc. Valores graficados con el error estándar de la media (SEM). Ensayos realizados por triplicado en tres diferentes series (n=9). Vehículo: Dimetil-sulfóxido; NAC: N-acetilcisteína; CH223191: antagonista del AHR.

8 DISCUSIÓN

Los ensayos de viabilidad celular son importantes, para poder determinar la respuesta celular a cualquier agente tóxico. Estos ensayos, proporcionan información de muerte, supervivencia o actividades metabólicas en la célula (Lee *et al.*, 2011). En ese sentido, estudios realizados con PM_{2.5} reportaron una disminución en la viabilidad celular de manera dosis dependiente en la mayoría de las líneas celulares de pulmón utilizadas: células BEAS-2B y células A549 (Oh *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2013; Cachon *et al.*, 2014).

Este trabajo muestra, que la actividad de LDH en el medio de cultivo y viabilidad de células expuestas a b[ghi]p no se afectó al compararlas con las células expuestas al vehículo, indicando de esta manera, que la concentración utilizada de b[ghi]p no disminuye el número de células viables en una exposición aguda durante 24 h e incluso a tiempos de 48 y 72 h de exposición. Esto, no concuerda con lo reportado por Ke *et al.*, 2018, quienes encontraron la disminución en la viabilidad celular y un aumento en la actividad de LDH en el medio de cultivo, al exponer las células a concentraciones de 2 y 10 μ M de b[ghi]p durante 24 h. Esta discrepancia, podría deberse al tipo celular que emplearon. En el estudio de Ke *et al.*, 2018, utilizaron la línea HPAEpiC, que son células de epitelio alveolar de pulmón humano, mientras que, en el presente estudio, se uso la línea celular NL20, que son células de epitelio bronquial. Las diferencias en la especialización de cada epitelio, podrían influir en

que una línea celular sea más susceptible a ciertos xenobióticos y como consecuencia su respuesta a HAPs sea diferente.

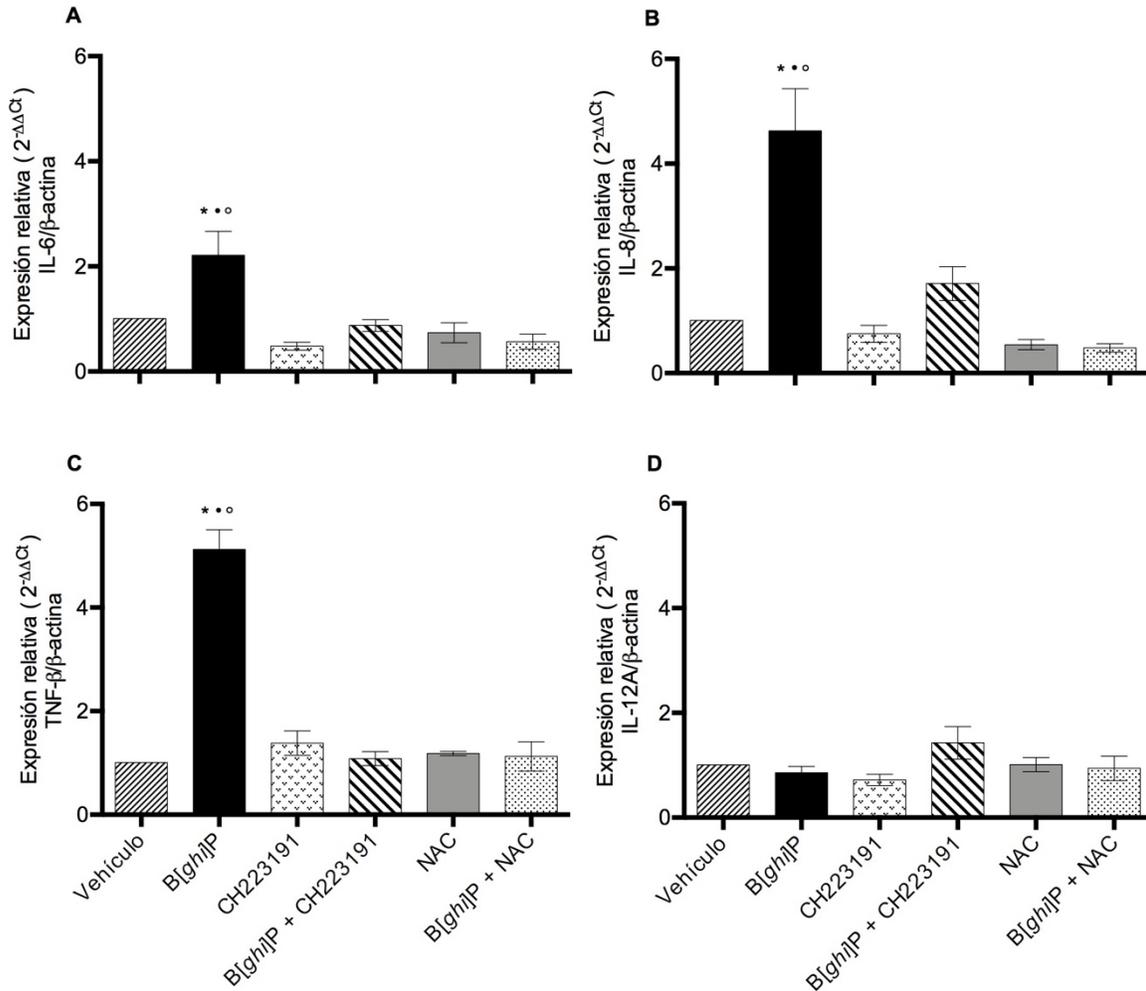


Figura 8. Expresión de los genes *IL-6*, *IL-8*, *TNF-β* e *IL-12A* en células NL20 expuestas a b[ghi]p y al antagonista de AHR. A, B y C). El b[ghi]p induce significativamente la expresión de *IL-6* e *IL-8* después de una exposición a una concentración de 4.4 μM durante 24 h. D) El b[ghi]p a una concentración de 4.4 μM no provoca cambios en la expresión de *IL-12A*. *p<0.05 al comparar el b[ghi]p contra el vehículo; *p<0.05 al comparar b[ghi]p contra b[ghi]+ CH223191; °p<0.05 al comparar el b[ghi]p contra b[ghi]p+NAC. ANOVA de una vía Tukey's post hoc. Valores graficados con el error estándar de la media (SEM). Ensayos realizados por triplicado en tres diferentes series (n=9). Vehículo: Dimetil-sulfóxido; NAC: N-acetilcisteína; CH223191: antagonista de AHR.

Por otra parte, de acuerdo con lo reportado en la literatura, tanto, el b[ghi]p, como el b[a]p, pueden inducir estrés oxidante, debido a su estructura (6 y 5 anillos respectivamente) y con ello provocar la disminución de la SOD de manera dosis dependiente (Ke *et al.*, 2018). El estrés oxidante, podría generarse debido a la activación intracelular de la vía AHR (Yu *et al.*, 2008; Tsuji *et al.*, 2011; Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2016; Ke *et al.*, 2018). Los experimentos mostrados aquí, indican, que el b[ghi]p induce la producción de ERO (O_2^{\bullet} y H_2O_2) en las primeras 3 h y pasando ese tiempo, las concentraciones de ERO disminuyen hasta aproximarse a los niveles basales. Lo anterior, no concuerda con lo reportado por Ke *et al.*, 2018, quienes indican, que en una exposición durante 24 h, se encontraron diferencias significativas en la producción de ERO en células de epitelio alveolar expuestas a b[ghi]p.

Estas diferencias notables, podrían deberse a varios factores. El primero, es la concentración empleada de b[ghi]p. Ellos, realizaron sus experimentos a una concentración de 10 μ M, mientras que, en esta investigación se utilizó una concentración de 4.4 μ M. Segundo, su método de identificación fue con diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), método para determinar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, con limitaciones documentadas (Kalyanaraman *et al.*, 2012), mientras que, para la presente investigación se emplearon DHE y rojo 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, separando la identificación de O_2^{\bullet} y H_2O_2 . Por último, Ke *et al.*, 2018, no le dieron seguimiento a la producción de ERO durante su tiempo de exposición, mientras que, en esta investigación se decidió realizar mediciones de

ERO a las 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h. De esta manera, se logró identificar los tiempos en los cuales la producción de ERO es mayor en células expuestas a b[ghi]p comparadas con las expuestas al vehículo.

En cuanto a la actividad de la SOD, se ha reportado ampliamente que diferentes HAPs provocan cambios tanto en la concentración como en la actividad de la enzima de manera dosis dependiente, en especial, las mezclas de HAPs que se encuentran en el PM_{2.5} (Cachon *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015; Kamal *et al.*, 2016; Ke *et al.*, 2018). Por lo cual, en este trabajo se considera que la concentración utilizada de b[ghi]p no provoca cambios en la actividad de la SOD, ni tampoco, se presenta estrés oxidante.

Respecto a los resultados de los análisis de expresión de los genes de las placas TaqMan™ Array y corroboración de estos genes por RT-qPCR, se investigó, que para las cuatro citocinas seleccionadas, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12A*, *TNF-β*, existen datos en la literatura, que indican que pueden ser inducidas o reprimidas por el AHR. Entonces, en este trabajo, se evaluó primeramente la inducción de *AHR* y *CYP4B1* en las células NL20 y los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2016, quienes demostraron la activación de *AHR* y *CYP4B1* por el b[ghi]p, además, para el caso del *CYP4B1*, se reportó que es el citocromo más abundante en el pulmón de varias especies de mamíferos y está relacionado con la biotransformación de xenobióticos (Gonzalez y Gelboin, 1994; Baer y Rettie, 2006).

Como ya se mencionó, existen reportes en la literatura donde la activación del AHR puede inducir la expresión de citocinas, uno de ellos fue el realizado por Podechard *et al.*, 2008, quienes encontraron que aproximadamente 3000 nucleótidos en el extremo 5' de la región promotora para *IL-8*, se localiza una "caja" con la secuencia de nucleótidos de ERXs, la cual, es reconocida por el dímero AHR-ARNT en el núcleo, cuando es aplicado el benzo[a]pireno (b[a]p). De igual manera, para el gen de *IL-6*, se encontró, que a lo largo de 3000 nucleótidos del extremo 5' de la región promotora, se encuentran 4 cajas ERXs, que podrían participar en la inducción de esta citocina. Adicionalmente, existen reportes, que indican que los HAP presentes en las PM_{2.5} o en partículas de diésel (DEP por sus siglas en inglés) activan la transcripción de los genes de ambas citocinas (Øvrevik *et al.*, 2009; Totlandsdal *et al.*, 2010; Cachon *et al.*, 2014).

Por otra parte, se observó, que esta inducción disminuye cuando las células NL20 son expuestas al b[ghi]p en presencia de un antagonista del AHR (CH223191). Por lo tanto, de acuerdo con este estudio y a los reportes mencionados, la inducción de la expresión de *IL-8* e *IL-6* se debe a la exposición del b[ghi]p, probablemente, por la activación de la vía AHR y por la presencia de los ERXs en regiones proximales a los promotores de estas citocinas. Sin embargo, los hallazgos encontrados experimentalmente, también, indican que podrían estar participando otras vías de señalización celular que inducen la expresión de estas dos citocinas proinflamatorias.

Adicionalmente, existen reportes en los cuales el factor nuclear kappa B (NF- κ B) participa en la inducción de *IL-8* e *IL-6* que es vinculada con la presencia de ERO (Zhao *et al.*, 2009; Totlandsdal *et al.*, 2010; Cachon *et al.*, 2014). Lo anterior concuerda con lo obtenido en este estudio, donde al exponer las células NL20 al NAC más el b[*ghl*]p, la expresión relativa de ambas citocinas es disminuida de forma importante, demostrando que hay una vía paralela que puede participar en la expresión de estas citocinas por la presencia de ERO.

Para el caso del TNF- β , Ronnekleiv-Kelly *et al.*, 2016, reportaron, que el flavonoide crisin, que es un agonista del AHR, induce la expresión de *TNF- β* y esto lo explican en parte, a que el promotor del gen de este factor, contiene una “caja” con la secuencia consenso para los ERXs, por lo tanto, esto explicaría la inducción del gen de *TNF- β* observada al exponer las células NL20 al b[*ghl*]p, además, la expresión relativa de *TNF- β* es afectada cuando las células NL20 son expuestas al b[*ghl*]p en presencia del antagonista CH223191, corroborando lo mencionado anteriormente.

Por último, respecto a *IL-12A*, Tanaka *et al.*, 2014, reportaron, que es regulada de manera negativa por AHR. Esta regulación, podría deberse a que *IL-12A* contiene ERXs en la región regulatoria en la posición -612 y -598 del sitio del inicio de la transcripción (Furman *et al.*, 2009). Lo reportado por estos autores, concuerda con lo obtenido inicialmente en este estudio, donde efectivamente, el gen de *IL-12A* muestra una disminución en su expresión en presencia del b[*ghl*]p. Sin embargo, al

realizar la validación de la inducción de *IL-12A* por RT-qPCR, no se observaron diferencias significativas, por lo cual, es necesario corroborar este dato antes de descartar la represión de la expresión de *IL-12A* por el AHR.

9 CONCLUSIÓN

EL b[*ghi*]p a la concentración utilizada, no induce cambios en la viabilidad de las células NL20 en una exposición aguda durante 24 h. Sin embargo, es capaz de inducir la producción tanto del O_2^{\bullet} como de H_2O_2 en las primeras 3 h. Estas ERO, podrían estar participando en vías de señalización celular, relacionadas con la inflamación, que de manera paralela a la activación de la vía del AHR por el b[*ghi*]p inducen la expresión de genes de citocinas proinflamatorias *IL-8*, *IL-6* y *TNF- β* en células de epitelio bronquial humano NL20. Las tres citocinas proinflamatorias identificadas en este trabajo, en un contexto funcional orgánico, podrían desempeñar un papel clave en la activación de células inflamatorias, puesto que *IL-8*, es un potente quimioatrayente de neutrófilos, mientras que, *IL-6* favorece la activación de neutrófilos y macrófagos. Por último, *TNF- β* , podría favorecer la expresión de proteínas de adhesión que facilitan la diapédesis a través del epitelio. Por lo cual, la activación de estas células podría exacerbar enfermedades relacionadas con vías respiratorias en la población expuesta al b[*ghi*]p.

10 PERSPECTIVAS

De los hallazgos encontrados en esta investigación, sería importante, cuantificar la proteína de cada citocina identificada (IL-6, IL-8, TNF- β), a través, de la técnica de Western blot o por ELISA, para que de esta manera, se verifique la correlación entre el aumento en la expresión de los genes y de las proteínas, además, sería importante, explorar la expresión de estos genes en las primeras horas de exposición con b[ghi]p en las células bronquiales humanas. También, sería importante, evaluar la actividad de NF- κ B y de otros factores de transcripción que participan en la vía, cuya activación se relaciona con la presencia de ERO.

11 MODELO MOLECULAR PROPUESTO

A manera de integración de los resultados obtenidos en esta investigación y la información disponible en la bibliografía, se propone el siguiente mecanismo por el cual el b[ghi]p podría inducir la expresión de las citocinas proinflamatorias identificadas (figura 9). El mecanismo de ingreso del b[ghi]p a la célula aún no ha sido descrito. Sin embargo, se ha propuesto, que podría ser por alguna de las vías identificadas para otros HAPs, como la difusión pasiva o la endocitosis mediada por receptor (Genc *et al.*, 2012). Una vez dentro de la célula, el b[ghi]p, se une al receptor aril hidrocarburo (AHR), el cual, se encuentra en el citoplasma asociado a proteínas, como las proteínas de choque térmico 90 (HSP90), a una proteína tipo inmunofilina (XAP2) y a una co-chaperona de 23 kiloDaltons (p23) (Tian, *et al.*, 2002).

Con la unión del b[ghi]p al AHR, ocurren cambios conformacionales, que resultan en la translocación del receptor al núcleo, donde se dimeriza con la proteína ARNT (translocador nuclear del receptor aril hidrocarburo). El heterodímero, se une a los elementos de respuesta a xenobióticos (ERXs), que se encuentran en regiones promotoras de genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos, como la de la familia de los citocromos P450 (*CYP1A1*, *1A2* y *CYP4B1*) y del gen de *AHR*, induciendo su transcripción (Tian, *et al.*, 2002).

Los cyt P450s, forman compuestos oxidados y generan ERO, como el O_2^{\bullet} que puede ser dismutado por la SOD a H_2O_2 . Las oxidaciones ocurren en la llamada región K, la cual, se caracteriza por ser electrodensa, dando como productos: quinonas, que pueden interferir la transferencia de electrones en la mitocondria y con ello favorecer la producción de O_2^{\bullet} , dihidrodioles o epóxidos (3,4-epoxi-3,4-dihidro-b[ghi]p o el b[ghi]p 3,4-oxido), que podrían provocar daño al DNA (Pan *et al.*, 2013).

Por lo tanto, estas enzimas, introducen grupos funcionales en los HAPs, para aumentar su solubilidad en agua, facilitando así su eliminación. Los ERXs, también se encuentran en promotores de genes de algunas citocinas proinflamatorias (*IL-6*, *IL-8* y *TNF- β*), por lo cual, la activación del AHR por el b[ghi]p podría inducir la expresión de esos genes.

Por otra parte, las ERO generadas por los cyt-P450, podrían estar participando como segundos mensajeros en la activación de cinasas sensoras, como la proteína cinasa C (PKC) o a la cinasa inductora de IK (NIK) que fosforilan a una cinasa específica del NF- κ B (IKK), que a su vez, fosforila a la proteína inhibidora I κ B (encargada de mantener al NF- κ B en citoplasma), permitiendo su ubiquitinación en residuos de serina y treonina, para su posterior degradación por el proteosoma 26S (Gomez-Quiroz y Bahena-Cuevas, 2008).

Una vez liberado de I κ B, el NF- κ B, se transloca al núcleo y se une a regiones promotoras de genes que contienen elementos de respuesta a NF- κ B (ER-NF κ B), como los genes de citocinas proinflamatorias (*IL-6*, *IL-8*, *TNF- β*) e inducen su expresión. De esta manera, se podría explicar la inducción paralela de las citocinas mencionadas. Una de las vías, podría ser dependiente de la activación del AHR, mientras que, la otra vía paralela podría ser por la activación del NF- κ B.

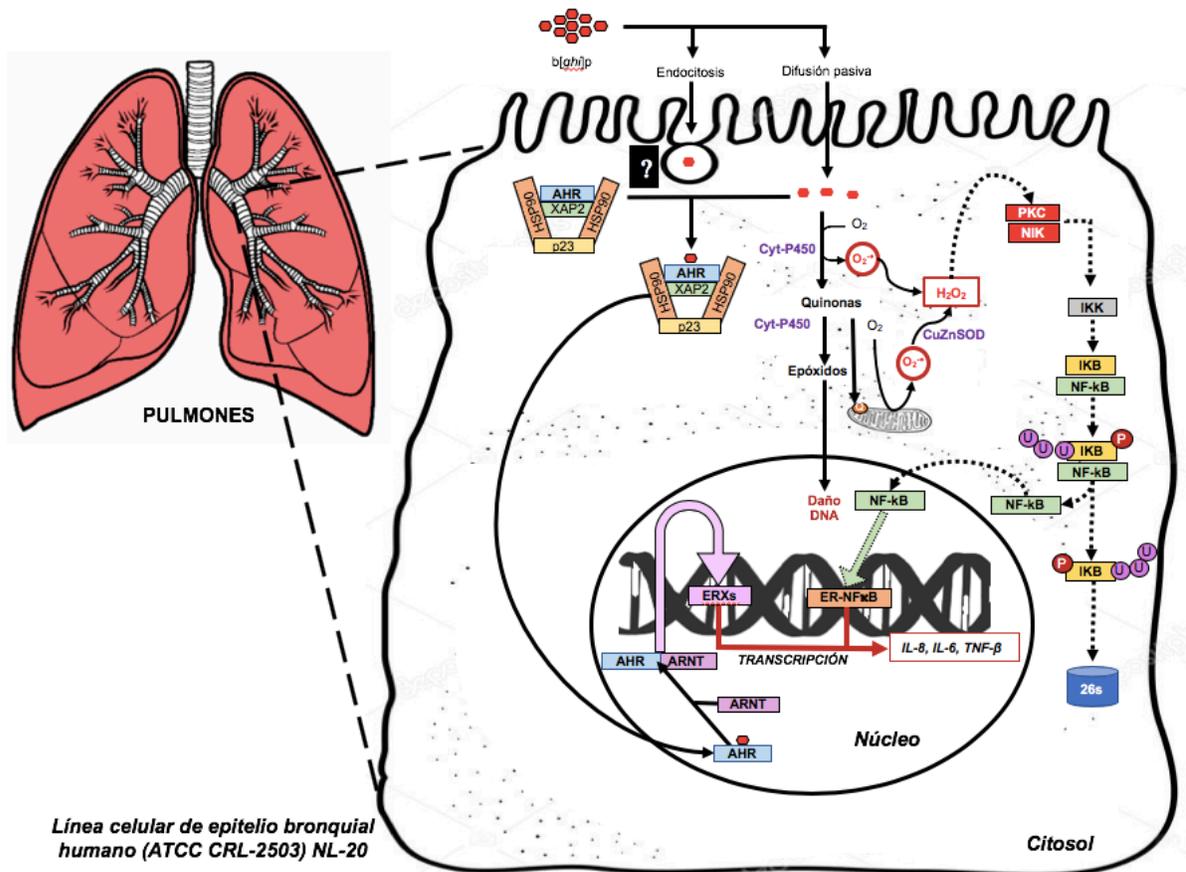


Figura 9. Posible mecanismo molecular de inducción de citocinas proinflamatorias por exposición de células NL20 a b[ghi]p. Las flechas discontinuas indican una vía probable de activación que no fue explorada en esta investigación. Para detalles de la posible activación vease el texto. AHR: receptor aril hidrocarburo; XAP2: proteína tipo inmunofilina; p23: cochaperona de 23 KiloDaltons; HSP90: proteína de choque térmico de 90 KiloDaltons; CytP450: citocromo P450 (CYP4B1); ARNT: translocador nuclear del receptor aril hidrocarburo; ERXs: elementos de respuesta a xenobióticos; PKC: proteína cinasa C isoforma alpha; NIK: cinasa inductora; CuZnSOD: enzima superóxido dismutasa con centros Cobre-Zinc; IKK: cinasa específica del NF-κB; IκB: proteína inhibidora del NF-κB; P: adición del anión fosfato (PO₄³⁻); U: ubiquitinación; 26S: proteosoma; NF-κB: factor nuclear κB; ER-NFκB: elementos de respuesta a κB; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; TNF-β: factor de necrosis tumoral-β; Q: ciclo ubiquinol-ubiquinona.

12 REFERENCIAS

- Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Miranda, J. y Vera-Avila, L. E. (2011).** Organic compounds of PM_{2.5} in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Science of the total environment*, 409(8), 1453-1465.
- Baer, B. R. y Rettie, A. E. (2006).** CYP4B1: an enigmatic P450 at the interface between xenobiotic and endobiotic metabolism. *Drug metabolism reviews*, 38(3), 451-476.
- Bayram, H., Devalia, J. L., Sapsford, R. J., Ohtoshi, T., Miyabara, Y., Sagai, M. y Davies, R. J. (1998).** The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 18(3), 441-448.
- Bølling, A. K., Totlandsdal, A. I., Sallsten, G., Braun, A., Westerholm, R., Bergvall, C. y Sandstrom, T. (2012).** Wood smoke particles from different combustion phases induce similar pro-inflammatory effects in a co-culture of monocyte and pneumocyte cell lines. *Particle and fibre toxicology*, 9(1), 45.
- Cachon, B. F., Firmin, S., Verdin, A., Ayi-Fanou, L., Billet, S., Cazier, F. y Shirali, P. (2014).** Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM_{2.5} and PM_{>2.5}) collected from Cotonou, Benin. *Environmental pollution*, 185, 340-351.
- Diagnóstico de la movilidad en la Ciudad de México. (2018).** Retrieved from <http://www.fimevic.df.gob.mx/problemas/1diagnostico.htm>
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z. y Ding, W. (2013).** PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in vitro*, 27(6), 1762-1770.
- Fan, Y., Boivin, G. P., Knudsen, E. S., Nebert, D. W., Xia, Y. y Puga, A. (2009).** The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis. *Cancer research*, 0008-5472.
- Ferecatu, I., Borot, M. C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F. y Andreau, K. (2010).** Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 18.
- Fimevic. (2018).** Diagnóstico de la movilidad de las personas en la Ciudad de México. Disponible <http://www.fimevic.df.gob.mx/problemas/1diagnostico.htm>
- Furman, D. P., Oshchepkova, E. A., Oshchepkov, D. Y., Shamanina, M. Y. y Mordvinov, V. A. (2009).** Promoters of the genes encoding the transcription factors regulating the cytokine gene expression in macrophages contain putative binding sites for aryl hydrocarbon receptor. *Computational biology and chemistry*, 33(6), 465-468.
- Genc, S., Zadeoglulari, Z., Fuss, S. H. y Genc, K. (2012).** The adverse effects of air pollution on the nervous system. *Journal of Toxicology*, 2012.
- Gomez-Quiroz, L. E. y Bahena-Cuevas, D. (2008).** Especies reactivas de oxígeno y señalización. Konigsberg-Fainstein, M. Radicales libres y estrés oxidativo:

- Aplicaciones médicas, primera edición (pp. 487-491), México:Editorial *El Manual Moderno*
- Gonzalez, F. J. y Gelboin, H. V.** (1994). Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug metabolism reviews*, 26(1-2), 165-183.
- Guillen, M. D. y Sopelana, P.** (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. *Food safety: Contaminants and toxins*, 175-198.
- Hassanien, M. A.** (2009). Risk assessment of atmospheric toxic pollutants over Cairo, Egypt. *Air Pollution XVII*, 123, 353-363.
- IARC.** (2010). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–117, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- INEGI.** (2015). Encuesta intercensal. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/df/poblacion/>
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennerly, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B. e Ischiropoulos, H.** (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1-6.
- Kamal, A., Cincinelli, A., Martellini, T., Palchetti, I., Bettazzi, F. y Malik, R. N.** (2016). Health and carcinogenic risk evaluation for cohorts exposed to PAHs in petrochemical workplaces in Rawalpindi city (Pakistan). *International journal of environmental health research*, 26(1), 37-57.
- Ke, S., Liu, Q., Yao, Y., Zhang, X. y Sui, G.** (2018). An in vitro cytotoxicities comparison of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human pulmonary alveolar epithelial cells HPAEpiC. *Toxicology letters*, 290, 10-18.
- Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E. y Brown, R. J.** (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, 60, 71-80.
- Lee, H. K.** (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Health Perspect*, 106(775), 792.
- Lee, Y.S., Kim, D.W., Lee, Y.H., Oh, J.H., Yoon, S., Choi, M.S., Lee, S.K., Kim, J.W., Lee, K., y Song, C.W.** (2011). Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC δ -dependent signaling in A549 lung cells. *Archives of Toxicology* 85, 1529– 1540.
- Li, N., Wang, M., Oberley, T. D., Sempf, J. M. y Nel, A. E.** (2002). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4531-4541.
- Ma, M., Li, S., Jin, H., Zhang, Y., Xu, J., Chen, D. y Xiao, C.** (2015). Characteristics and oxidative stress on rats and traffic policemen of ambient fine particulate matter from Shenyang. *Science of the Total Environment*, 526, 110-115.
- Marin-Morales, M. A., Leme, D. M. y Mazzeo, D. E. C.** (2009). A review of the hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. Pierre, A. H. y Milton D. H. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: pollution, health effects and chemistry (pp 1-50), *Nova Science Publishers*.

- Michigan.gov.** (2018). Disponible en línea https://www.michigan.gov/documents/deq/deq-rrd-chem_Datasheet_527768_7.pdf ; Benzoghiperylene
- Miguel-Pérez, G.,** Maya, G., Flores-Márquez, A. R., Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Eguía-Aguilar, P. y Arenas-Huertero, F. (2013). Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 107-115.
- Naufal, Z. S.** (2008). Biomarkers of exposure to complex environmental mixtures (*Doctoral dissertation, Texas A&M University*).
- Nel, A. E.,** Diaz-Sanchez, D. y Li, N. (2001). The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Current opinion in pulmonary medicine*, 7(1), 20-26.
- Oh, S. M.,** Kim, H. R., Park, Y. J., Lee, S. Y. y Chung, K. H. (2011). Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 723(2), 142-151.
- Øvrevik, J.,** Låg, M., Holme, J. A., Schwarze, P. E., y Refsnes, M. (2009). Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution. *Toxicology*, 259(1-2), 46-53.
- Pan, S.,** Li, D., Zhao, L., Schenkman, J. B. y 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. *Chemical research in toxicology*, 26(8), 1229-1239.
- Podechard, N.,** Lecqueur, V., Le Ferrec, E., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D. y Fardel, O. (2008). Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo (a) pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicology letters*, 177(2), 130-137.
- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.** (2018). Benzo[ghi]perylene-d12. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12073192#section=Top>
- Ramesh, A.,** Walker, S. A., Hood, D. B., Guillén, M. D., Schneider, K. y Weyand, E. H. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *International journal of toxicology*, 23(5), 301-333.
- Ronnekleiv-Kelly, S. M.,** Nukaya, M., Díaz-Díaz, C. J., Megna, B. W., Carney, P. R., Geiger, P. G. y Kennedy, G. D. (2016). Aryl hydrocarbon receptor-dependent apoptotic cell death induced by the flavonoid chrysin in human colorectal cancer cells. *Cancer letters*, 370(1), 91-99.
- Salam, M. A.,** Shirasuna, Y., Hirano, K. y Masunaga, S. (2011). Particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of urban and suburban residential area. *International Journal of Environmental Science and Technology: (IJEST)*, 8(2), 255-266.
- Tanaka, T.,** Narazaki, M. y Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.

- Tian, Y., Rabson, A. B. y Gallo, M. A.** (2002). Ah receptor and NF- κ B interactions: mechanisms and physiological implications. *Chemico-biological interactions*, 141(1-2), 97-115.
- Tokiwa, H., Nakanishi, Y., Sera, N., Hara, N. e Inuzuka, S.** (1998). Analysis of environmental carcinogens associated with the incidence of lung cancer. *Toxicology letters*, 99(1), 33-41.
- Totlandsdal, A. I., Cassee, F. R., Schwarze, P., Refsnes, M. y Låg, M.** (2010). Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 41.
- Tsuji, G., Takahara, M., Uchi, H., Takeuchi, S., Mitoma, C., Moroi, Y. y Furue, M.** (2011). An environmental contaminant, benzo (a) pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Journal of dermatological science*, 62(1), 42-49.
- Visciano, P. y Perugini, M.** (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons toxicity in animals and humans.
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J. N., Li, N., Venkatesen, M. I., Sioutas, C. y Nel, A.** (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environmental health perspectives*, 112(14), 1347.
- Yu, R. M. K., Ng, P. K. S., Tan, T., Chu, D. L. H., Wu, R. S. S. y Kong, R. Y. C.** (2008). Enhancement of hypoxia-induced gene expression in fish liver by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand, benzo [a] pyrene (BaP). *Aquatic toxicology*, 90(3), 235-242.
- Zaragoza-Ojeda, M., Eguía-Aguilar, P., Perezpeña-Díazconti, M. y Arenas-Huertero, F.** (2016). Benzo [ghi] perylene activates the AHR pathway to exert biological effects on the NL-20 human bronchial cell line. *Toxicology letters*, 256, 64-76.
- Zhao, Y., Usatyuk, P. V., Gorshkova, I. A., He, D., Wang, T., Moreno-Vinasco, L. y Garcia, J. G.** (2009). Regulation of COX-2 expression and IL-6 release by particulate matter in airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 40(1), 19-30.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00194

Matrícula 2161802562

ESTUDIO DE LA RESPUESTA EN
CELULAS BRONQUIALES HUMANAS
DURANTE LA EXPOSICIÓN AGUDA
A BENZO[GHI]PERILENO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO
DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: CARLOS ULISES TORRES FLORES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

2018



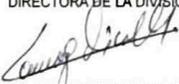
CARLOS ULISES TORRES FLORES
ALUMNO

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

VOCAL



DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL



DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

SECRETARIA



DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL