



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO DEL RETENO EN CÉLULAS HUMANAS DE COLON

Por: **Matías I. González Hernández**



Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de
Concepción para optar al grado académico de Magíster en Ciencias con
Mención en Bioquímica y Bioinformática

Diciembre, 2021

Concepción, Chile

Profesor Guía: Dr. Ariel Castro





© 2021, Matías I. González Hernández

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a : Dra. Violeta Morín, Natalia Muñoz Lagos, Francisco González Muñoz, familia González, familia Muñoz, a los integrantes del Lab. Proteasas y Cáncer, a las personas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, a mis compañeros del Magíster de Bioquímica y Bioinformática, a mis amigos de Santiago y Concepción, al jardín infantil “Pequeño Pudú”, a mi gato el Neko y finalmente a José Ilic García por confeccionar la plantilla de $\text{L}^{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ para tesis en el formato UdeC.



“[...] We’ll ride the spiral to the end and may just go where no one’s been
Spiral out, keep going
Spiral out, keep going”

Tool - Lateralus

Resumen

La industria de la producción de celulosa desde un punto de vista económico representa un importante aporte a la región del Biobío y al país, a través de la generación de trabajo y aporte al producto interno bruto. Por otro lado, la producción de celulosa puede generar compuestos con potencial tóxico. En este sentido un gran grupo de compuestos tóxicos originados en la producción de la celulosa son los Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAP) los cuales pueden intervenir en el metabolismo de los organismos expuestos a concentraciones alteradas de forma antropogénica. El grupo de HAP es amplio, algunos de los compuestos más estudiados son el Benzo[a]Pireno, Dioxinas y Benzoantracenos vinculados a toxicidad, formación de aductos en el ADN y actividad disruptora endocrina. La matriz de compuestos en las aguas residuales provenientes de la producción de celulosa es compleja, y como tal existen HAP que se desconoce sus efectos o bien están pocos estudiados, como por ejemplo el Reteno (1-metil-7-isopropil fenantreno) el cual se forma a partir de abietanos, naturalmente por la combustión de ácidos resínicos por incendios o bien por la metabolización de compuestos orgánicos debidos a bacterias en los sedimentos en ríos, pero también se ha encontrado en concentraciones superiores a las normales, en sectores aguas abajo de las descargas de las industrias de celulosa y del cual se conoce poco sobre sus alcances tóxicos en células de *Homo sapiens*. En este contexto los organismos también responden al medio cuando se enfrentan a compuestos que pueden alterar su metabolismo, para lo cual tiene la maquinaria bioquímica para metabolizar los xenobióticos. Esta se basa principalmente en la expresión de enzimas de la familia CYP450, que mediante oxidación desactivan los HAP que entran a la célula. La expresión de CYP depende a su vez de otras proteínas como el Receptor de Hidrocarburo de Arilo y el Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburo de Arilo que al unirse al xenobiótico terminan siendo

factores de transcripción de los genes de la familia CYP. Basado en lo anterior, podemos utilizar CYP como un bioindicador de contaminación ambiental ya que se expresa en condiciones de estrés por xenobióticos en particular de HAP. Bajo este escenario hipotetizamos que células de colon normal humanas expresarán proteínas marcadoras de contaminación ambiental al exponerse a Reteno debido a su interacción. Mediante un enfoque bioinformático se abordó la interacción proteína ligando a través de experimentos *in silico* de Acoplamiento y Dinámica Molecular. Por otro lado se llevaron experimentos *in vitro* tomando como modelo la línea celular CCD 841 tratadas con concentraciones de Reteno. Se utilizó la técnica de MTT para evaluar la viabilidad celular y mediante RT-PCR con partidores específicos se evaluó la expresión de los genes CYP1A1, CYP1B1 y RHA. Los resultados bioinformáticos muestran evidencia de que existiría posiciones del Reteno en las cuales es energéticamente favorable su unión al sitio activo de CYP1A1 y CYP1B1 y que esta unión se mantendría estable por un periodo de tiempo. Los ensayos de viabilidad celular reflejan que la línea celular CCD 841 es sensible al Reteno desde una concentración de 5 μM . La expresión de los genes RAH, CYP1A1 y CYP1B1 muestra una tendencia de sobreexpresión entre el tratamiento de 50 μM y 75 μM . Estos resultados podrían darnos evidencia para proponer que el Reteno sigue la ruta de metabolización de xenobióticos clásica que termina en la enzima CYP1A1. Para aportar mayor evidencia es necesario utilizar técnicas con mayor poder de resolución como son Transcriptómica, Citometría de Flujo apuntando a obtener datos que ayuden al sector público en materia de salud pública.

Palabras clave – Reteno, celulosas, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, CYP

Abstract

From an economic point of view, the pulp production industry represents an important contribution to the Biobío region and to the country, through the generation of jobs and contribution to the gross domestic product. On the other hand, pulp production can generate potentially toxic compounds. In this sense, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are a large group of toxic compounds originated from cellulose production. They can intervene in the metabolism of organisms exposed to anthropogenically altered concentrations. The PAH group is widespread, some of the most studied compounds are Benzo[a]Pyrene, Dioxins and Benzoanthracenes linked to toxicity, DNA adduct formation and endocrine disrupting activity. The matrix of compounds in wastewater from cellulose production is complex, and contain PAHs whose effects are unknown or understudied, such as Retene (1-methyl-7-isopropyl phenanthrene), which is formed from abietanes, naturally by the combustion of resin acids by fires or by the metabolization of organic compounds due to bacteria in river sediments, but it has also been found in higher than normal concentrations in downstream sectors of pulp industry discharges and its toxic effects on *Homo sapiens* cells is insufficiently studied. In this context, organisms also respond to the environment when are exposed to compounds that can alter their metabolism, for which they have the biochemical machinery to metabolize xenobiotics. This is mainly based on the expression of enzymes of the CYP450 family, which by oxidation deactivate PAHs inside the cell. CYP expression depends of other proteins such as Aryl Hydrocarbon Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator that upon binding to the xenobiotic end up being transcription factors of the CYP family genes. Based on the above, we can use CYP as a bioindicator of environmental contamination since it is expressed under conditions of xenobiotic stress, particularly PAH. Under this scenario we hypothesized that normal human

colon cells will express environmental contamination marker proteins upon exposure to Retene due to their interaction. Using a bioinformatics approach, the protein ligand interaction was addressed through *in silico* molecular docking and dynamics experiments. On the other hand, *in vitro* experiments were carried out using the CCD 841 cell line treated with concentrations of Retene as a model. The MTT technique was used to evaluate cell viability and the expression of CYP1A1, CYP1B1 and AHR genes was evaluated by RT-PCR with specific primers. The bioinformatic results show evidence that there would be poses of Retene in which its binding to the active site of CYP1A1 and CYP1B1 is energetically favorable and that this binding would remain stable for a period of time. Cell viability assays show that the CCD 841 cell line is sensitive to Retene from a concentration of 5 μM . The expression of AHR, CYP1A1 and CYP1B1 genes shows a trend of overexpression between 50 μM and 75 μM treatment. These results could give us evidence to propose that Retene follows the classical xenobiotic metabolization pathway that ends in the CYP1A1 enzyme expression. To provide more evidence it is necessary to use techniques with higher resolution power such as Transcriptomics and Flow Cytometry aiming to obtain data that help in public health sector.

Keywords – Retene, Pulp mill, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, CYP

Índice general

AGRADECIMIENTOS	I
Resumen	II
Abstract	IV
1. Introducción	1
1.1. Contexto socio-económico	1
1.2. Contexto de la industria forestal en la región del Biobío	2
1.3. Residuos industriales líquidos provenientes de la producción de celulosa	4
1.4. Mecanismos de metabolización de xenobióticos	5
1.5. Riesgos a la salud humana asociados con el retero	8
1.6. Hipótesis	12
1.7. Objetivos	12
1.7.1. Objetivo general	12
1.7.2. Objetivos específicos	12
2. Metodología	13
2.1. Ensayos <i>in silico</i>	13
2.1.1. Interacción <i>in silico</i> proteína - ligando	13
2.2. Ensayos <i>in vitro</i>	15
2.2.1. Cultivo celular	15
2.2.2. Compuesto con actividad tóxica	15
2.2.3. Determinación de la viabilidad de células normales de colon tratadas con retero	15
2.2.4. Expresión de genes marcadores de contaminación	16
2.2.4.1. Extracción de ARN	16
2.2.4.2. Obtención de ADNc a partir de ARN total	17
2.2.4.3. Amplificación de genes marcadores de contaminación por PCR	18
3. Resultados	21
3.1. Ensayos <i>in silico</i>	21

3.1.1.	Determinar mediante métodos bioinformáticos la interacción proteína ligando entre CYP y reteno	21
3.1.1.1.	Acoplamiento entre CYP1A1 y Reteno	23
3.1.1.2.	Acoplamiento entre CYP1A1 y B[a]P	25
3.1.1.3.	Acoplamiento entre CYP1B1 y Reteno	27
3.1.1.4.	Acoplamiento entre CYP1B1 y B[a]P	28
3.1.1.5.	Dinámica Molecular CYP1A1 y CYP1B1	30
3.2.	Ensayos <i>in vitro</i>	35
3.2.1.	Determinar la sensibilidad de células humanas de la línea CDD 841 al reteno	35
3.2.1.1.	Modelo de dosis-respuesta	35
3.2.2.	Determinar la expresión de CYP1A1, CYP1B1 y RHA en células humanas tratadas con Reteno	38
3.2.2.1.	Expresión del gen Receptor de Hidrocarburo de Arilo (RHA)	38
3.2.2.2.	Expresión del gen CYP1A1	41
3.2.2.3.	Expresión del gen CYP1B1	42
4.	Discusión	44
	Referencias	49



Índice de cuadros

1.2.1.Plantas de producción de celulosa en la región del Biobío	4
2.2.1.Partidores de genes CYP1A1, CYP1B1 y RHA	18
2.2.2.Reactivos de PCR	19
2.2.3.Programa de PCR para obtener productos de los genes amplificados a partir de ADNc.	19
3.1.1.Interacciones entre CYP1A1 y Reteno	24
3.1.2.Interacciones entre CYP1A1 y B(a)P	26
3.1.3.Interacciones entre CYP1B1 y Reteno	28
3.1.4.Interacciones entre CYP1B1 y B(a)P	29
3.1.5.Resumen valores de afinidad	30
3.2.2.Desviaciones estándar densitometrías	39
3.2.1.Datos de densidad de píxeles	39

Índice de figuras

1.2.1. Mapa de la región del Biobío.	3
1.4.1. Diagrama de la expresión de CYP450 inducida por benzo(A)pireno	6
1.4.2. Estructura de la proteína Citocromo P450 (CYP1A1)	7
1.5.1. Imagen de la topografía del reteno	10
1.5.2. Efecto de los residuos industriales líquidos sobre la salud humana	11
2.1.1. Esquema del protocolo bioinformático para la producción de los acoplamiento moleculares.	14
2.1.2. Resumen gráfico del protocolo bioinformático para la producción de las dinámicas moleculares.	14
2.2.1. Resumen metodología <i>in vitro</i>	20
3.1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en el experimento.	22
3.1.2. Área de experimentación alrededor del sitio activo de la enzima CYP1A1.	23
3.1.3. Representación del Reteno y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1A1	25
3.1.4. Representación del B(a)P y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1A1.	26
3.1.5. Representación del Reteno y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1B1.	27
3.1.6. Representación del B(a)P y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1B1.	29
3.1.7. Gráfico de RMSD de la variación en la posición promedio de los átomos en el tiempo de la dinámica.	35
3.2.1. Modelo exponencial de dosis-respuesta.	37
3.2.2. Análisis de la expresión del gen RHA.	40
3.2.3. Gráfico de las densitometrías realizadas a partir de la expresión de RHA.	40
3.2.4. Análisis de la expresión del gen CYP1A1.	41
3.2.5. Gráfico de las densitometrías realizado a partir de la expresión de CYP1A1.	42
3.2.6. Análisis de la expresión del gen CYP1B1.	43
3.2.7. Gráfico de las densitometrías realizado a partir de la expresión de CYP1B1.	43

4.0.1. Esquema del efecto del Reteno en células CDD 841 de colon normal. 48



Capítulo 1

Introducción

1.1. Contexto socio-económico

La contaminación de los cuerpos de agua dulce no es exclusivamente un problema local, sino más bien un problema global. La industria de la celulosa es un negocio rentable que crece cada año. Esta industria es responsable por el deterioro en el uso del agua debido a la cantidad de agua utilizada como también la cantidad de residuos líquidos que genera, estando en el sexto puesto de las industrias que generan más contaminantes líquidos (Uğurlu et al., 2008; Simão et al., 2018; Singh & Chandra, 2019). La industria forestal en Chile se remonta a tiempos de la colonización en el siglo XVI, y ha estado bajo una constante industrialización y modernización en los últimos 50 años (Donoso & Otero, 2005; Camus & Solari, 2008). En 2018, el sector forestal contribuyó con \$US 4,581 billones de dólares al producto interno bruto (P.I.B) de los cuales \$US 4,277 billones vinieron de la producción de celulosa, generando 133.769 puestos de trabajo. Ese mismo año \$US 3,66 billones de dólares fueron exportados mayormente a China, Sur Corea y Holanda (Gysling et al., 2019). La industria forestal ganó gran importancia debido a las políticas públicas de la década de los '70, generando la llegada de corporaciones interesadas en la producción de celulosa que se asentaron en Chile y

Sudamérica. Las operaciones de la producción de la celulosa no afectan solamente al componente medio ambiental, sino que también al entorno socio-cultural mediante la exclusión en la toma de decisiones de los actores sociales. El efecto negativo más reconocido ocurrió el año 2005 cuando la población valdiviana de cisnes de cuello negro se vio afectada producto de emisiones de residuos industriales líquidos al río Cruces por la celulosa Arauco (Ehrnström-Fuentes, 2015; Ehrnström-Fuentes & Kröger, 2017).

1.2. Contexto de la industria forestal en la región del Biobío

En la región del Biobío, la industria dedicada a la producción de celulosa se encuentra principalmente en la cuenca del río Biobío (Fig.1.2.1), el cual tiene su origen entre las coordenadas 36°45'S; 72°59' O y 38°20'S; 71°15' O, con una longitud de 380 Km., desde su nacimiento de los lagos Icalma y Galletué en la cordillera de los Andes (Orrego et al., 2006). El río Biobío recibe alrededor de 100.000 toneladas por año de residuos industriales líquidos, desde la producción de pulpa de celulosa y producción de papel basados en monocultivos de especies forestales como *Pinus radiata* y *Eucalyptus nitens* (Videla & Diez, 1997; Orrego et al., 2006).

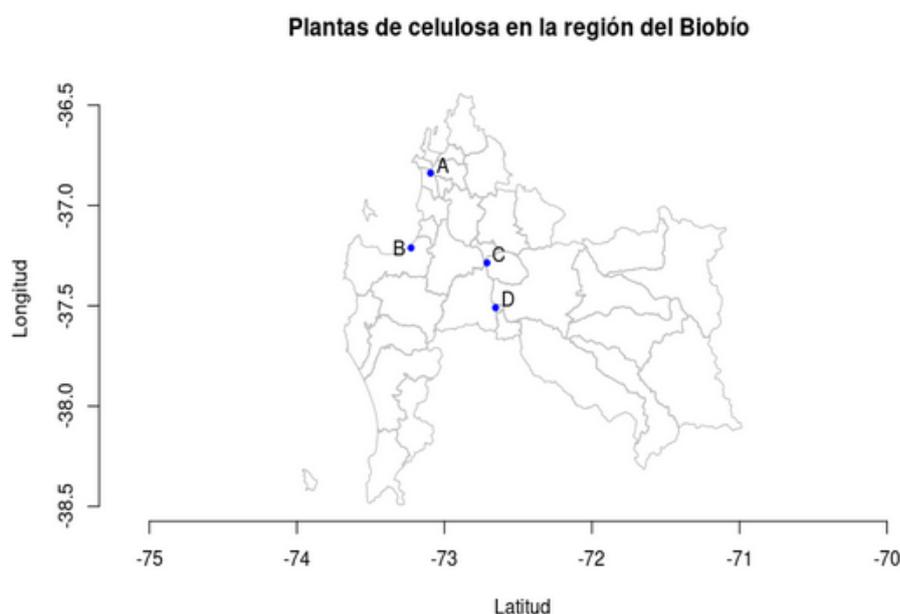


Figura 1.2.1: Mapa de la región del Biobío. (A) Planta BO- papeles Biobío en la comuna de San Pedro de la Paz [-36.8383188361583, -73.09415802864011]. (B) Planta Celulosa Arauco y Constitución S.A en la comuna de Arauco [-37.211166, -73.225725]. (C) Planta CMPC Pulp SPA en la comuna de Laja [-37.28611306653319, -72.71076150053781]. (D) Planta CMPC Pulp SPA en la comuna de Nacimiento [-37.50956251633864, -72.65334352055166]. Imagen de elaboración propia.

Por otro lado, la cuenca del río Biobío representa un sistema complejo debido a la diversidad de especies que cohabitan. A nivel nacional, el río Biobío adquiere una gran importancia en el desarrollo económico, ya que no solo la industria de la celulosa hace uso de la cuenca, sino que también la agricultura, la industria de la refinera y las hidroeléctricas. Por lo tanto, la cuenca del Biobío representa un mosaico de actividades, habitantes y diversidad biológica (Díaz et al., 2018). Finalmente es importante agregar que existen cinco plantas de producción de celulosa en la región del Biobío (Tabla 1.2.1). Estas plantas contribuyen a los niveles de empleo e industrialización de las áreas, generando el 15,8% del P.I.B y 7,765 empleos (Salas et al., 2016; Gysling et al., 2019). Por el contexto descrito anteriormente es prioridad considerar el impacto de la actividad forestal, en particular la producción de celulosa, mediante la composición de los residuos industriales líquidos que genera y cómo puede alterar la dinámica medioambiental.

Cuadro 1.2.1: Plantas de producción de celulosa en la región del Biobío

Planta celulosa	Tipo	Producción (tons)	Ubicación (Comuna)
BO Paper Biobío SA	Termoquímica	125000	San Pedro de la Paz
Celulosa Arauco y Constitución S.A	Química	790000	Arauco
CMPC Pulp SPA	Química	330000	Laja
CMPC Pulp SPA	Química	1500000	Nacimiento

1.3. Residuos industriales líquidos provenientes de la producción de celulosa

Los residuos industriales líquidos provenientes de la producción de celulosa aportan sólidos suspendidos que se originan de la descomposición de la materia orgánica. Esto se mide en base a la demanda biológica de oxígeno (DBO_5), la cual se encuentra entre los $400 \frac{mg}{l}$ a $744 \frac{mg}{l}$ de acuerdo a muestras obtenidas en efluentes cercanos al río Biobío (Gaete et al., 2000). En la actualidad, la tecnología aplicada en la industria ha permitido reducir los niveles de DBO_5 mediante tratamientos físico-químicos que eliminan los sólidos suspendidos y finalmente tratamientos biológicos con el fin de reducir la materia orgánica (Chamorro et al., 2013). Aun así, existen algunos compuestos recalcitrantes que resisten los tratamientos biológicos. Estos compuestos se encuentran presentes en cuerpos de agua dulce receptores de residuos líquidos industriales interviniendo en la fisiología y metabolismo de varios organismos (Gaete & Paredes, 1996; Gaete et al., 2000; Orrego et al., 2006; Chiang et al., 2015). La caracterización de los residuos industriales líquidos que se originan en la producción de celulosa es una tarea compleja, incluso más bien un problema, ya que constituyen una matriz compleja de compuestos orgánicos. En esta matriz podemos encontrar compuestos que usualmente están en la naturaleza

como taninos, ácidos resínicos, lignina, fitohormonas, fitoesteroles y estilbenos. Simultáneamente hay presencia de compuestos de origen productivo los cuales son exógenos al ambiente, conocidos como xenobióticos, ya que tienen un origen antropogénico y se encuentran en altas concentraciones en el ambiente cuando en la naturaleza su concentración es baja (Top & Springael, 2003). Alguno de estos compuestos xenobióticos encontrados en residuos industriales con origen en la producción de celulosa son ligninas cloradas, fenoles, dioxinas, dibenzodioxinas policlorinatadas, benzo[a]pireno, benzoantracenos, benzoflavonas, reteno y una cantidad de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Ali & Sreerishnan, 2001; Lahdelma & Oikari, 2005; Hernández et al., 2013; Murray et al., 2014).

1.4. Mecanismos de metabolización de xenobióticos



Cuando se descargan residuos líquidos industriales en ríos, con estos compuestos xenobióticos como constituyentes, estas moléculas sedimentan. El bentos retiene estas moléculas contaminantes, y son liberadas progresivamente en el hábitat de algunas especies las cuales son expuestas a estos xenobióticos debiendo expresar la maquinaria molecular para metabolizar estos compuestos y mantener la homeostasis. En general los xenobióticos que alteran el normal funcionamiento de los organismos se les llama disruptores endocrinos (DE), estos alteran directamente la producción, secreción y metabolismo de algunas hormonas, mediante un efecto mimético, produciendo por ejemplo problemas de obesidad y cambios epigenéticos en generaciones posteriores (Birkett & Lester, 2002; Anway & Skinner, 2006; Casals-Casas & Desvergne, 2011; Darbre, 2017). Los xenobióticos pueden entrar a la célula mediante transporte pasivo, por ejemplo, una vez en el citosol, un HAP se une al receptor de hidrocarburo de arilo (RHA), generando una señal que termina en la expresión de la proteína Citocromo P450 (CYP). RHA pertenece a

la subfamilia bHLH de factores de transcripción (*basic Helix-Loop-Helix*). Este forma un complejo citosólico con dos proteínas, una de 90-kDa (HSP90) y otra proteína llamada XAP2 de 36-KDa (Plant et al., 1987; Kuzhandaivelu et al., 1996; Beischlag et al., 2008). El mecanismo consiste en que el xenobiótico se une a RHA como un agonista, al formarse el complejo xenobiótico-RHA migra al núcleo y forma un dímero con otra proteína llamada Traslocador nuclear del receptor de hidrocarburo de arilo (TNRHA) disociándose de las proteínas HSP90 y XAP2 que acompañaban a RHA anteriormente (Bersten et al., 2013; Murray et al., 2014). TNRHA lleva el complejo proteína/ligando formado entre el HAP y RHA (Fig.1.4.1) hacia regiones del ADN llamadas elementos de respuesta a dioxinas (ERD) (Murray et al., 2014). ERD son secuencias consenso en las regiones promotoras de los genes como CYP1A1 (Li et al., 2014), promoviendo la expresión de enzimas requeridas para la degradación de compuestos xenobióticos.

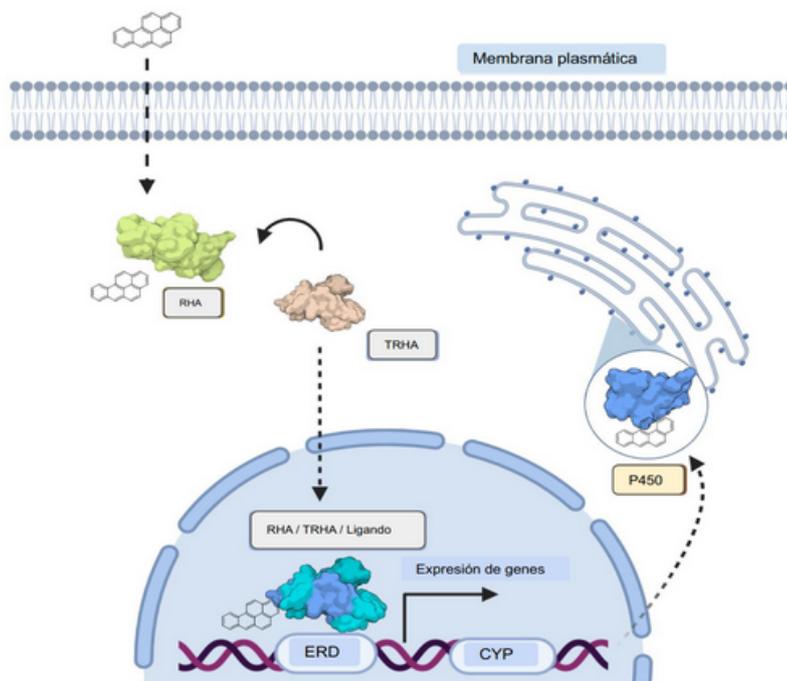


Figura 1.4.1: Diagrama de la expresión de CYP450 inducida por HAP como benzo(A)pireno. HAP entra a la célula por transporte facilitado. Este promueve la expresión de los genes CYP1A1 y CYP1B1 a través de la coordinación entre RHA, TNRHA y B[a]P. Este complejo es traslocado al núcleo donde se une a ERD corriente arriba de los genes CYP, siendo un factor de transcripción en CIS. Imagen de elaboración propia.

CYP es una enzima altamente conservada en el reino animal, presenta un grupo Hemo y usa NADPH como cofactor (Fig.1.4.2). Esta enzima participa en la degradación de xenobióticos mediante la catabolización de una reacción de mono-oxidación (Fujii-Kuriyama & Mimura, 2005). Por otro lado, CYP es una superfamilia que incluye más de 13,000 genes agrupados en 400 familias. En *Homo sapiens* al menos 57 genes y 58 pseudogenes se agrupan en 18 familias y 44 subfamilias documentadas. Las familias 1-3 de los genes CYP son las más activas y su expresión y actividad están concentradas en el hígado para metabolizar compuestos orgánicos (Manikandan & Nagini, 2018). Por esta razón, estas enzimas son útiles como marcadores moleculares de la calidad ambiental ya que se sobre-expresan en organismos expuestos a xenobióticos en sus hábitats. En general los estudios ambientales y toxicológicos miden la actividad o expresión de las isoformas de CYP como son CYP1A1 o CYP1B1 (Hong & Yang, 1997; Fujita et al., 2001; Takano et al., 2002; Buratti et al., 2003; Räsänen et al., 2012; van Rensburg et al., 2020; Vähäkangas et al., 2019).

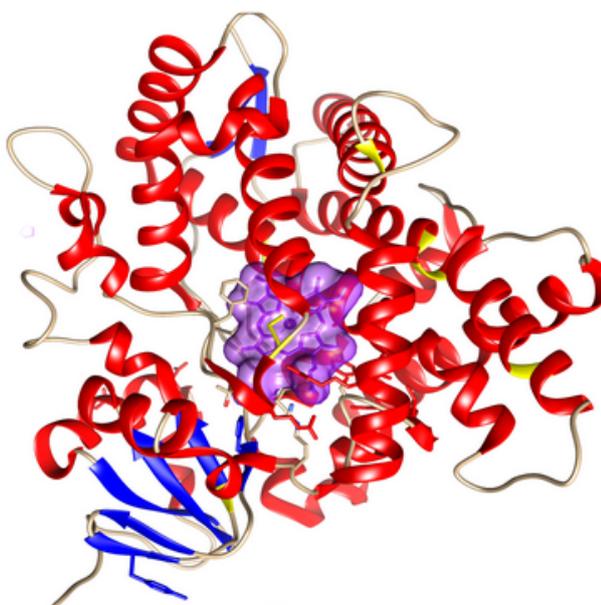


Figura 1.4.2: Estructura de la proteína Citocromo P450 (CYP1A1). Obtenida desde el Protein data bank ID:418V (Walsh et al., 2013). En color rojo se observa las cadenas α -Hélices, en azul las cadenas β -plegada y en púrpura el grupo Hemo con un átomo central de Fe^{+2} . Imagen de elaboración propia.

Posterior a la metabolización de un HAP, los epóxidos formados por la acción de CYP, pueden pasar desde el citoplasma hacia el núcleo y reaccionar con el ADN, generando lo que se conoce como aducto. Los aductos se forman por un enlace covalente del carbono del grupo bencilo del xenobiótico y el grupo amino en residuos desoxiadenosina y desoxiguanosina (Essigmann et al., 1977; Massion et al., 2016; Barnes et al., 2018; Estévez et al., 2019). Cuando el ADN se replica, el aducto interfiere generando mutaciones con el potencial de desarrollar neoplasias (Denissenko et al., 1996; Hecht, 1999; Szeliga & Dipple, 1998; Vineis & Perera, 2000; Tarantini et al., 2011; Poirier, 2016).

1.5. Riesgos a la salud humana asociados con el reteno



El Reteno (1-metil-7-isopropil fenantreno) es un HAP formado desde esqueletos de abietano por procesos de combustión, como quema de madera (Fig.1.5.1). Por esta razón, es un marcador molecular de contaminación ambiental. Cuando se somete el abietano a procesos de altas temperaturas este compuesto se reduce generalmente transformándose a Reteno y es considerado como un nuevo compuesto con actividad tóxica para el metabolismo (Ramdahl, 1983; Marchand-Geneste & Carpy, 2003; Diniz et al., 2010). El Reteno ha sido encontrado en lagos y sedimentos donde no hay actividad antropogénica en concentraciones de nanogramos por gramo seco de sedimento, esto por un proceso de aromatización de ácidos abiéticos inducido por bacterias (Zender et al., 1994; Billiard et al., 1999). Estas concentraciones aumentan en varios órdenes de magnitud en sedimentos localizados corriente abajo de emisarios de residuos industriales líquidos originados en la producción de celulosa, alcanzando concentraciones de $1300 \frac{ug}{g}$ (Lahdelma & Oikari, 2005; Räsänen et al., 2012). Estudios en vertebrados acuáticos como *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* y *Xenopus Tropicalis* asociados con compuestos aromáticos

como el Reteno y B[a]P han arrojado actividad disruptiva en varios procesos metabólicos, incluidos apoptosis, teratogénesis, crecimiento celular, adhesión y motilidad celular, desarrollo cardiovascular, metabolismo de xenobióticos, transporte y metabolismo de lípidos y metabolismo de aminoácidos (Gelboin, 1980; Billiard et al., 2002; Oikari et al., 2002; Hawliczek et al., 2012; Regnault et al., 2018). Pocos estudios se han realizado para dilucidar el efecto del reteno en humanos, en parte porque el Reteno no se encuentra en la lista de HAP con potencial carcinogénico que el gobierno de USA monitorea mediante su agencia de protección ambiental (US-EPA) (Jarvis et al., 2014). La citotoxicidad ha sido evaluada en células de pulmón humanas tratadas con una concentración de reteno al $30 \frac{ng}{ml}$ durante 72 horas evidenciando muerte celular y estrés oxidativo (de Oliveira Alves et al., 2017; Peixoto et al., 2019). En la línea celular HEpG2 de hígado se determinó que el Reteno se metaboliza en 24 horas a través de la ruta de las ortoquinonas donde la expresión de CYP450 es estimulada (Huang et al., 2017). En células de neuroblastoma sk-n-sh expuestas a concentraciones de 0-40 μM de reteno presentaron un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una sobreexpresión de los genes SOD2, BACH2 y BAX los cuales participan en la muerte celular mediante apoptosis bajo estrés oxidativo (Sarma et al., 2017). En células humanas epiteliales de bronquio (BEAS-2B) se trataron con material particulado con Reteno. Este tratamiento generó una disminución en la viabilidad celular, aumentó la muerte celular vía apoptosis y produjo un alza de estrés oxidativo al ser expuestas por 72 horas (Raudoniute et al., 2018).

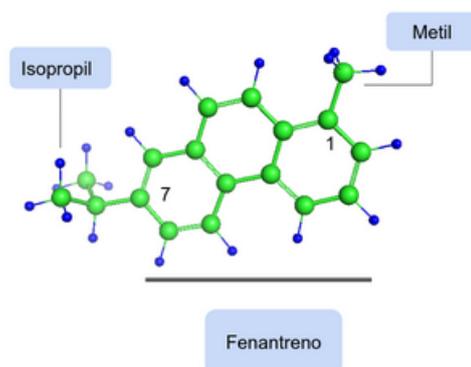


Figura 1.5.1: Imagen de la topografía del reteno. Presenta un grupo metilo en el carbono 1, y un grupo isopropilo en el carbono 7, mientras que el cuerpo central es un fenantreno. Imagen de elaboración propia.

En la región del Biobío el índice de mortalidad desde el año 2000 ha incrementado (MINSAL, 2011; Itriago et al., 2013). Algunos tipos de cáncer como el de pulmón y gliomas tienen prevalencia debido a factores de riesgo ambientales, asociados con la actividad económica, principalmente la industria forestal y la agricultura, ya que exponen a la población a residuos químicos que forman parte del proceso productivo (Torén et al., 1996; Soskolne & Sieswerd, 2010; Gomes et al., 2011; Itriago et al., 2013). En base a los antecedentes expuestos, es plausible suponer que la industria forestal por medio de la producción de celulosa podría provocar algún impacto en la salud humana mediante la generación de xenobióticos, estos originados en el proceso productivo (Fig.1.5.2). Por las características de los efluentes producidos en la elaboración de la celulosa y el poco interés por estudiar estos compuestos es que existen xenobióticos de los cuales no conocemos su impacto, sino más bien suponemos su potencial impacto.

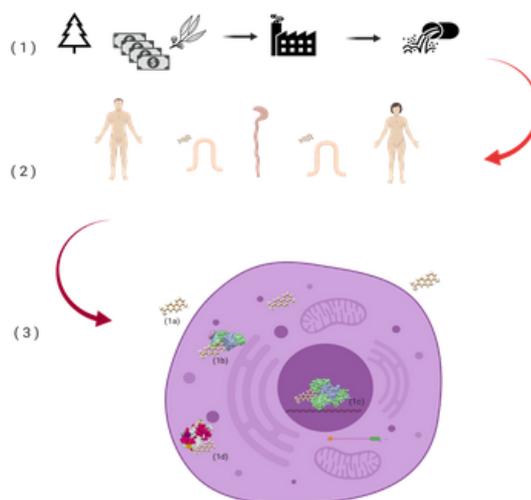


Figura 1.5.2: Efecto de los residuos industriales líquidos sobre la salud humana

(1) La producción de celulosa es una de las actividades industriales más importantes de la región del Biobío y su proceso productivo genera una gran cantidad de contaminantes como fitoesteroles, benzo[A]pireno y compuestos orgánicos policíclicos, llamados xenobióticos. (2) Los xenobióticos pueden ser absorbidos en el epitelio intestinal e.g colon y ser acumulados en el organismo a través de las diversas actividades de uso del agua. (3) (3a) Una vez que el xenobiótico entra a la célula, (3b) este forma un complejo con el receptor de hidrocarburo de arilo (RHA) (PDB ID:5NJ8). (3c) Luego este complejo es trasladado al núcleo por el traslocador nuclear de RHA (TNRHA), formando el complejo xenobiótico-RHA/TNRHA (PDB ID:5Y7Y) que se une a elementos de respuesta a dioxina (DREs) y promueve la expresión de genes de la familia Citocromo P450 (CYP) (PDB ID: 4I8V). (3d) Finalmente, una vez que la célula sintetiza la proteína, el xenobiótico es degradado. Imagen de elaboración propia.

Teniendo en cuenta que el reteno es un xenobiótico con potencial carcinogénico, consecuentemente podemos plantear la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo afectará la exposición de concentraciones de Reteno a la expresión de biomarcadores como CYP1A1 y CYP1B1 en células de colon?

1.6. Hipótesis

En base al estado del arte y la pregunta de investigación podemos proponer la siguiente hipótesis:

Células humanas de colon normal tratadas con reteno causa un aumento en la expresión de proteínas marcadoras de contaminación ambiental producto de su interacción.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Establecer si el reteno, compuesto originado en la producción de la celulosa, causa toxicidad en células humanas de colon



1.7.2. Objetivos específicos

- 1.- Determinar mediante métodos bioinformáticos la interacción proteína ligando entre CYP y reteno.
- 2.- Determinar la sensibilidad de células humanas de la línea CDD 841 al reteno.
- 3.- Determinar la expresión de CYP1A1, CYP1B1 y AHR en células humanas tratadas con Reteno.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Ensayos *in silico*

2.1.1. Interacción *in silico* proteína - ligando

Con la finalidad de identificar por medio de una técnica *in silico* la posible interacción entre el Reteno y el sitio activo de la enzima CYP fue ejecutado un protocolo de acoplamiento molecular mediante el programa Autodock Vina (Forli et al., 2016), configurando una caja experimental de 20 Å con el fin de situar el experimento en el sitio activo de la enzima CYP que contiene el grupo Hemo. Las proteínas fueron configuradas como receptores rígidos. Las estructuras cristalizadas de CYP1A1 y CYP1B1 fueron obtenidas desde el protein data bank (<https://www.rcsb.org/>) bajo los códigos 4I8V y 3PM0 respectivamente. Los ligandos fueron obtenidos desde la base de datos Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Reteno (Pubchem ID: 10222), Benzo[a]Pireno (Pubchem ID:2336) y Hexabenzocoronene (Pubchem ID: 66107). Las diferentes poses del ligando obtenidas fueron categorizadas según su afinidad predichas por el programa en unidad de $\frac{kcal}{mol}$. Se entenderá como pose a la ubicación y posición que el ligando adopta en un espacio tridimensional según nomenclatura.



Figura 2.1.1: Esquema del protocolo bioinformático para la producción de los acoplamientos moleculares. Primero las moléculas que actúan como ligandos fueron descargadas desde la base de datos Pubchem y las estructuras tridimensionales de las proteínas que actúan como receptores fueron obtenidas desde la base de datos Protein Data Bank. Los archivos correspondientes a los ligandos y proteínas fueron utilizados como input del programa AutoDock vina y los resultados de la simulación fueron visualizados en Pymol.

Para conocer la naturaleza de la interacción entre ligando y proteína de una forma más realista, fue elaborada una dinámica molecular, producida con el programa NAMD ([Acun et al., 2018](#)) utilizando el campo de fuerza ChARMM36. Fueron preparadas las estructuras de CYP para la dinámica molecular de acuerdo al siguiente flujo de pasos. Primero, los hidrógenos fueron añadidos a las moléculas. Posteriormente la molécula fue solvatada bajo los parámetros TIP3P. Luego las moléculas fueron ionizadas, añadiendo iones Cl⁻ permitiendo la neutralización de las cargas. El sistema fue minimizado por un periodo corto de 2000 pasos. Finalmente, la dinámica molecular fue producida para poder medir la distancia media cuadrática mínima (RMSD) entre el grupo hemo y el ligando, durante un periodo de 1 ns, de acuerdo a los protocolos establecidos ([Kesharwani et al., 2016](#)).

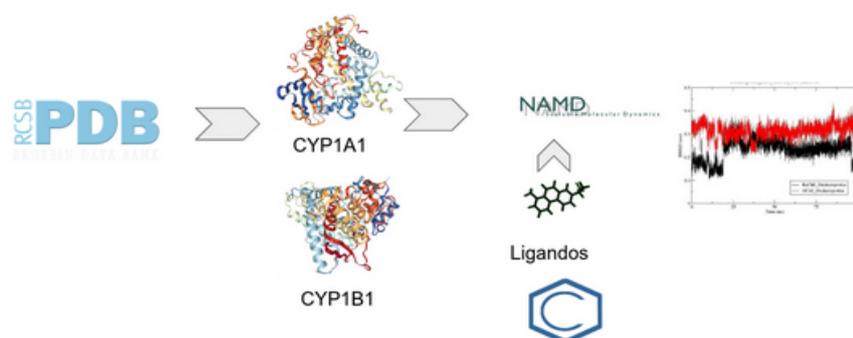


Figura 2.1.2: Las estructuras cristalizadas de las proteínas fueron descargadas desde el protein data bank, y los ligandos desde Pubchem. Los archivos fueron sometidos a control de calidad para asegurar la correcta entrada al programa NAMD en el cual fue ejecutada la dinámica molecular. Por último, las trayectorias fueron graficadas para evaluar el comportamiento de CYP1A1 y CYP1B1 con los ligandos.

2.2. Ensayos *in vitro*

2.2.1. Cultivo celular

La línea celular CCD 841 CoN se adquirió de forma comercial con el fin de utilizarlas en los ensayos celulares. Estas células fueron cultivadas con medio de cultivo DMEM (HyClone) suplementado con suero bovino fetal 10 %, fungizona, antibióticos penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales. La incubación de ambas líneas celulares fue realizada en una estufa de cultivo a 37°C con CO₂ al 5 % hasta que los cultivos celulares alcanzaron una confluencia superior al 70 %.

2.2.2. Compuesto con actividad tóxica

El compuesto reteno fue comprado al laboratorio Acros Organics en Bélgica. Este fue preparado en una solución stock de 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ en dimetilsulfóxido (DMSO), para su posterior utilización (Häkkinen et al., 2004).

2.2.3. Determinación de la viabilidad de células normales de colon tratadas con reteno

Con el propósito de determinar la viabilidad celular frente a un tratamiento de reteno fue realizado un ensayo de dosis letal media por un periodo de 24 horas (24-h LC_{50}) en la línea celular CCD 841. Para obtener estos datos fue preparada una dilución seriada de reteno de 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM y 50 μM como tratamientos. La obtención de los datos de viabilidad celular, fue realizada a través del método colorimétrico MTT (Mosmann, 1983), el cual se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolium (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. El MTT captado por las células fue solubilizado con DMSO para formar formasan.

La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables. Como parte del protocolo fue preparada una solución Stock 12mM de MTT (Sigma) disolviendo 5 mg de reactivo MTT en 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril en un tubo ámbar de 2 mL con el propósito de evitar la fotodegradación del compuesto. El ensayo se realizó en células CCD 841 CoN tratadas con reteno, en las concentraciones previamente descritas durante un periodo de 24 horas. A cada pocillo fue añadido medio medio de cultivo DMEM fresco sin rojo fenol (Santa Cruz) suplementado con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a una concentración de 1mM por pocillo. Después de 4 horas, los cristales de formazan formados fueron disueltos en DMSO, y la absorbancia fue registrada en un espectrofotómetro (Tecan, modelo infinite 200pro) donde la longitud de onda de lectura fue de 570 nm. La absorbancia medida fue graficada mediante el software estadístico R aplicando un modelo de dosis-respuesta (Team et al., 2013) .

2.2.4. Expresión de genes marcadores de contaminación

2.2.4.1. Extracción de ARN

Las células CCD 841 fueron tratadas con los siguientes compuestos: Reteno a concentraciones de 50 μ M y 75 μ M, Doxorubicina 5 μ M como control positivo y DMSO al 0.1 % como control negativo. Todos los tratamientos fueron aplicados durante un periodo de 24 horas (Vázquez-Gómez et al., 2018). Al terminar el tratamiento fue retirado el medio de cultivo con el compuesto correspondiente, seguido de un lavado con PBS y centrifugado por un periodo de 5 minutos a 10,000g. Una vez obtenido el sobrenadante, el ARN total fue extraído a través del método del Trizol (Chomczynski & Sacchi, 1987). A la fase acuosa, que contiene el ARN, le fueron adicionados 250 μ l de isopropanol e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 10,000g por un periodo de 10 minutos a una temperatura de 4° C. El sobrenadante fue descartado,

al pellet obtenido fue agregado 500 μl de etanol al 75 % $\frac{v}{v}$ y centrifugado a 10,000g por 5 minutos. El pellet obtenido fue secado a temperatura ambiente y disuelto en 30 μL de agua con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1 % $\frac{v}{v}$ (calentada a 58° C y esterilizada previamente a 120°C). La concentración del ARN obtenido fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm. La integridad del ARN se corroboró de la relación de absorbancia $\frac{260}{280}$, así como también mediante su visualización por electroforesis en gel de agarosa al 1 % $\frac{p}{v}$ en tampón TAE (Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM, pH 8) al 1 % $\frac{v}{v}$ con bromuro de etidio 0.5 gml.

2.2.4.2. Obtención de ADNc a partir de ARN total

La obtención de ADN complementario (ADNc) fue realizada mediante transcripción reversa (RT-PCR), utilizando para ello el sistema de transcripción reversa Improm-II Reverse Transcription System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este ensayo se utilizaron 5 μg del ARN total a una concentración final de 100 gml, en un volumen final de 5 μl . Posteriormente, la mezcla fue incubada en un termociclador (Bioer, TC-96/G/H(b)), a una temperatura de 70° C por 5 minutos y luego a 4° C por 5 minutos, con el objetivo de linealizar el RNA (mezcla de linealización). A este ARN linealizado le fueron añadidos los siguientes reactivos: Tampón de reacción 5X al 20 % $\frac{v}{v}$, MgCl₂ 4.5 mM, dNTPs 0.5 mM, inhibidor de RNAsa 5 μl , 1 μl transcriptasa reversa al 5 % $\frac{v}{v}$ y agua estéril hasta alcanzar un volumen final de 15 μl . La mezcla fue procesada a un ciclo de PCR de 25 °C durante 1 minuto, 42 °C por 60 minutos y 70 °C por 15 minutos, en un termociclador (Bioer, TC-96/G/H(b)). El ADNc obtenido fue cuantificado por absorbancia a 260 nm y su integridad fue determinada mediante la relación de absorbancia $\frac{260}{280}$.

2.2.4.3. Amplificación de genes marcadores de contaminación por PCR

El siguiente objetivo de la técnica fue amplificar el producto de PCR a partir de ADNc. Para este propósito fue utilizada la enzima GoTaq Flexi (Promega) siguiendo las indicaciones resumidas en las tablas 2.2.2 y 2.2.3. Los partidores utilizados, su temperatura de denaturación y el tamaño esperado del producto obtenido fueron resumidos en la tabla 2.2.1. Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% $\frac{v}{v}$ con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\frac{\mu g}{ml}$, siendo el tiempo de corrida 40 minutos a 70 Volts. Las fotografías de los productos obtenidos por PCR, fueron visualizadas en un transiluminador UV (Vilber Lourmat, AAR 5047). Finalmente, la expresión de los genes marcadores de contaminación fue evaluada por medio de una densitometría realizada a las imágenes de los geles mediante el software ImageJ (Rueden et al., 2017) y la intensidad de la señal graficada en el software estadístico R project (Team et al., 2013).

Cuadro 2.2.1: Partidores utilizados para obtener productos PCR de los genes CYP1A1, CYP1B1 y Receptor de Hidrocarburo de Arilo (RHA). Fue indicado el tamaño del producto PCR obtenido y la temperatura de *melting* (T_m).

Partidores				
Gen	Sentido	Antisentido	Tamaño producto	T_m (°C)
CYP1A1	5'TTCGTCCCCTTCACCATC'3	5' CTGAATTCACCCGTTGC'3	302 pb	56
CYP1B1	5' CACTACTCGGAGCACTGGAA '3	5' AAACACACGGCACTCATGAC'3	224 pb	59
RHA	5' CTTCCAAGCGGCATAGAGAC '3	5' AGTTATCCTGGCCTCCGTTT'3	198 pb	60
β -Actina	5'GAGGCCCAAGCAAGAGAG'3	5'GGGGGTGTTGAAGGTCTCAA'3	221 pb	59

Cuadro 2.2.2: Reactivos y volumen utilizado en la reacción de PCR con los partidores descritos. El Master mix contiene GoTaq flexi 5X, MgCl₂ (25 mM), dNTPs (10 mM)

Reactivos	GENES		
	CYP1A1	CYP1B1	RHA
Master mix	12.5 μ l	12.5 μ l	12.5 μ l
Partidor Sentido (10 μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Partidor Antisentido (10 μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
ADNc	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	9.5 μ l	9.5 μ l	9.5 μ l

Cuadro 2.2.3: Programa de PCR para obtener productos de los genes amplificados a partir de ADNc.

N° ciclos	Etapa	CYP1A1	CYP1B1	RHA
1	Denaturación inicial	95° C / 5 min	95° C / 2 min	95° C / 2 min
	Denaturación	95° C / 1 min	95° C / 1 min	95° C / 1 min
30	Alineamiento	56° C / 1 min	59° C / 1 min	60° C / 1 min
	Extensión	72° C / 1 min	72° C / 1 min	72° C / 1 min
1	Extensión final	72° C / 5 min	72° C / 5 min	72° C / 10 min
1	Término		4° C / ∞	

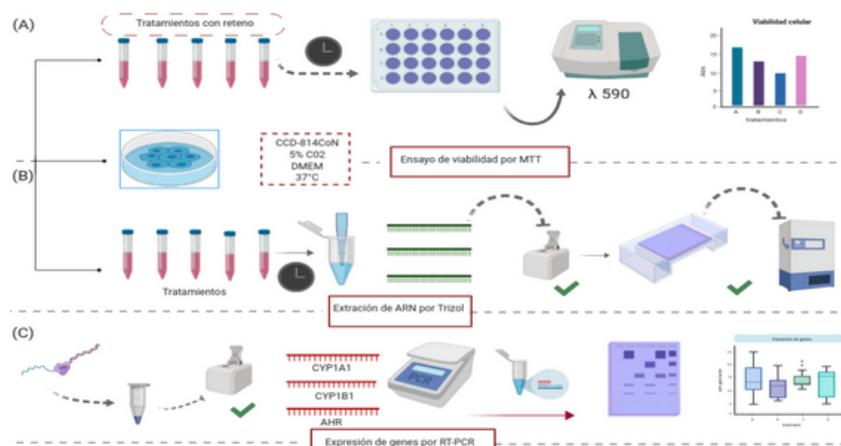


Figura 2.2.1: Resumen metodología *in vitro*. (A) Corresponde a los tratamientos utilizados con disoluciones de reteno con el objetivo de obtener datos de viabilidad celular mediante MTT. (B) Tratamientos a células normales de colon para extraer ARN mediante Trizol. (C) Finalmente del ARN total convertir a ADNc mediante RT-PCR y su posterior análisis por PCR y cuantificación de estos productos por densitometría.



Capítulo 3

Resultados

3.1. Ensayos *in silico*

3.1.1. Determinar mediante métodos bioinformáticos la interacción proteína ligando entre CYP y reteno

Con el propósito de responder si existe algún tipo de interacción molecular entre la principal proteína de metabolización de xenobióticos, CYP, y el hidrocarburo policíclico Reteno, se realizó una aproximación bioinformática mediante estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular. Como parte secuencial del experimento, en primera instancia, se llevó a cabo un acoplamiento molecular entre dos isoformas de CYP (CYP1A1 y CYP1B1) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos Reteno como tratamiento, B[a]P como control positivo y el compuesto Hexabenzocoroneno (HBC) como control negativo (Fig. 3.1.1). Teniendo en consideración, que el tamaño entre Reteno y B[a]P es relativamente similar, y que HBC es mayor en 2.1 Å en longitud entonces, se esperaría que por motivos de tamaño el acoplamiento molecular entre HBC y CYP1A1 o CYP1B1 no se favorece energéticamente resultando una energía de unión ($\frac{kcal}{mol}$) positiva. De este modo podemos utilizar HBC como control negativo.

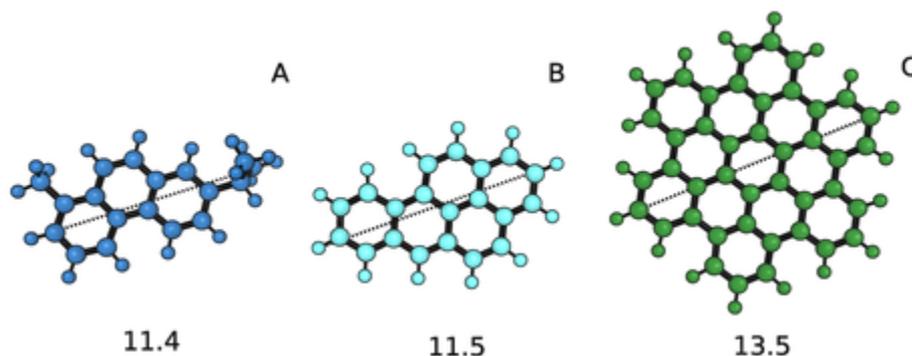


Figura 3.1.1: Hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en el experimento. Las estructuras de A) Reteno, representado en azul tiene una longitud de 11,4 Å; B) La molécula B[a]P, en calipso, tiene una longitud de 11,5 Å. C) Hexabenzocoroneno, en verde, tiene una longitud de 13,5 Å. La línea discontinua representa la distancia medida desde átomo a átomo. Imagen de elaboración propia.

Para realizar los experimentos de acoplamiento molecular, en primer lugar, se debieron convertir los formatos de las moléculas que se utilizaron como ligandos. Esto se ve reflejado en las siguientes líneas de código que se emplearon para ejecutar el programa en el sistema operativo Linux con sus respectivos archivos de configuración. A modo de ejemplo, se muestra el procedimiento para los acoplamientos entre ligandos y CYP1A1 con su respectiva cuadrícula de trabajo (Fig.3.1.2).

```

1  $!/bin/bash
2  # Preparación de Ligandos #####
3  # Código utilizado para convertir el tipo de formato: de sdf a mol
4  obabel -isdf retene.sdf -omol -O retene.mol -h
5  obabel -isdf hbc.sdf -omol -O hbc.mol -h
6  obabel -isdf bap.sdf -omol -O bap.mol -h
7  # Código empleado para ejecutar el acoplamiento molecular #####
8  /home/eulogy/Escritorio/AGGg/programas/autodock_vina_1_1_2_linux_x86/bin/vina
   ↪ --config /home/eulogy/Escritorio/AGGg/protein/cyp1a1/config_1a1_bap.txt
   ↪ --log 1a1_bapout
9  /home/eulogy/Escritorio/AGGg/programas/autodock_vina_1_1_2_linux_x86/bin/vina
   ↪ --config /home/eulogy/Escritorio/AGGg/protein/cyp1a1/config_1a1_retene.txt
   ↪ --log 1a1_reteneout
10 /home/eulogy/Escritorio/AGGg/programas/autodock_vina_1_1_2_linux_x86/bin/vina
   ↪ --config /home/eulogy/Escritorio/AGGg/protein/cyp1a1/config_1a1_hbc.txt
   ↪ --log 1a1_hbcout
11 #####

```

```
12 ##### Archivo de configuración del programa #####
13 receptor = /home/eulogy/Escritorio/AGGg/protein/cyp1a1/rig_1a1_1.pdbqt
14 ligand    = /home/eulogy/Escritorio/AGGg/ligandos/retene/retene_1.pdbqt
15 out =
16   ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/protein/cyp1a1/resultados_dock/1a1_retene.pdbqt
17 log      =
18   ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/protein/cyp1a1/resultados_dock/1a1_retene.log
19 center_x = -18.917
20 center_y = 42.861
21 center_z = -34.000
22 size_x   = 17
23 size_y   = 17
24 size_z   = 17
25 exhaustiveness = 8
26 num_modes = 9
```

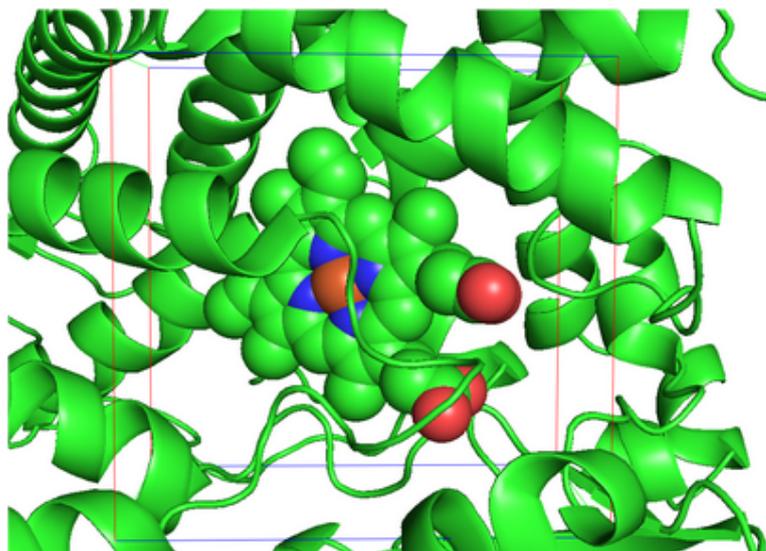


Figura 3.1.2: Área de experimentación alrededor del sitio activo de la enzima CYP1A1. Representación realizada en el programa Pymol de la cuadrícula utilizada con el propósito de definir el espacio del experimento en el sitio activo de la enzima, donde se encuentra el grupo Hemo representado por esferas. De color rojo, la esfera indica el átomo de Fe^{+2} rodeado de 4 esferas azules que representan los átomos de Nitrógeno. Imagen de elaboración propia.

3.1.1.1. Acoplamiento entre CYP1A1 y Reteno

El resultado de esta interacción se refleja en que la energía de unión correspondiente a la pose (coordenadas del ligando en el espacio tridimensional) y el sitio activo es de $-12.9 \frac{kcal}{mol}$. Esto quiere decir que existe una pose que puede entrar al sitio activo

Cuadro 3.1.1: Interacciones entre CYP1A1 y Reteno determinadas por el acoplamiento molecular dirigido en el sitio activo de la enzima

CYP1A1	Tipo interacción	Residuo	Distancia (Å)
Reteno	Hidrofóbica	PHE - 123	3.58
		PHE - 224	3.76
		PHE - 258	3.64
		ALA - 317	3.76
		PHE - 319	3.59
		THR - 321	3.72
		ILE - 386	3.52
	Apilamiento en π	PHE - 224	3.75
	PHE - 224	3.68	

de la enzima de forma favorable. Por otra parte, se encontraron interacciones proteína-ligando de tipo hidrofóbicas entre el Reteno y los aminoácidos Fenilalanina, Alanina, Tirosina e Isoleucina. Estos aminoácidos, son parte del sitio activo, y las distancias hacia el Reteno varían en un rango entre 3 Å - 4 Å (Tabla 2). También se encontró una interacción de tipo apilamiento - π entre el aminoácido Fenilalanina-224 y uno de los anillos del antraceno que componen el esqueleto cíclico del Reteno (Tabla 3.1.1). Esta última interacción tiene una distancia de 3.47 Å y 3.68 Å respectivamente. Se puede apreciar gráficamente que el Reteno entra al sitio activo sorteando el espacio inter cadenas que obstaculiza la entrada, a una distancia que le permite establecer interacciones con el sitio activo (Fig.3.1.3).

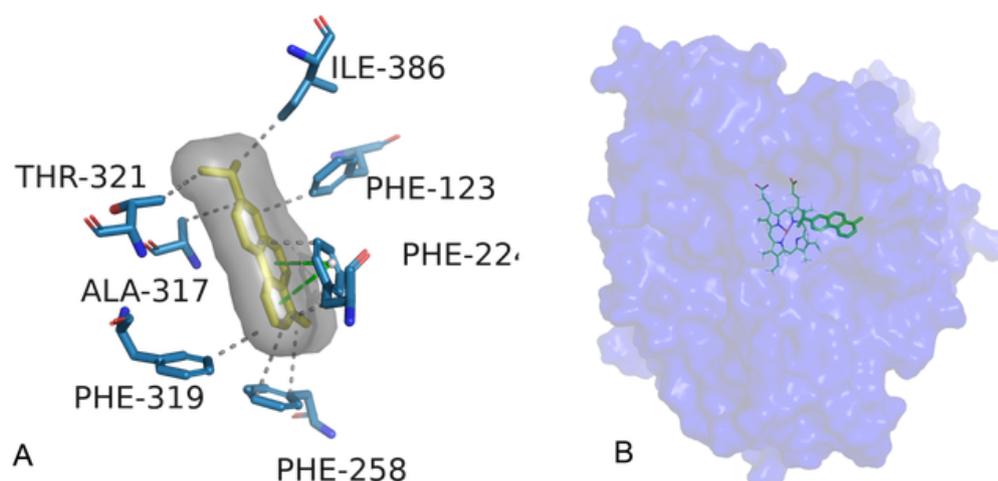


Figura 3.1.3: Representación del Reteno y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1A1. En el panel A) se muestra el Reteno, en color amarillo rodeado de su nube electrostática, acompañado de líneas intermitentes que indican la interacción entre ligando y la proteína. Alrededor del ligando, se sitúan los aminoácidos Tirosina-321, Alanina-327, Isoleucina-386 y las Fenilalaninas-123,-258 y -319; interactuando de forma hidrofóbica, mientras que la Fenilalanina-224 de forma de apilamiento - π . En el panel B), se muestra el renderizado de la superficie de CYP1A1, enfocado en profundidad el sitio activo, el grupo Hemo, y su cercanía al ligando estudiado de color verde.

3.1.1.2. Acoplamiento entre CYP1A1 y B[a]P

El estudio de la interacción entre B[a]P y CYP1A1 tuvo como objetivo obtener un parámetro de cómo se comportaría una molécula de similares características al Reteno, en cuanto a sus efectos en células de mamíferos y estudios *in vivo*. El ligando B[a]P mostró similares interacciones que el Reteno, bajo las mismas condiciones (acoplamiento molecular dirigido al sitio activo). Para estos efectos, los aminoácidos que componen el sitio activo e interaccionan de forma hidrofóbica con B[a]P son Fenilalanina en las posiciones 123, 224 y 258, Asparagina-313, Alanina-317, Isoleucina-386, Leucina-496. Se encontraron apilamiento - π correspondientes a la Fenilalanina-123 y 224 (Fig. 3.1.4) Las distancias entre las interacciones, al igual que las obtenidas con Reteno, van en un rango de 3 Å - 4 Å (Tabla 3.1.2).

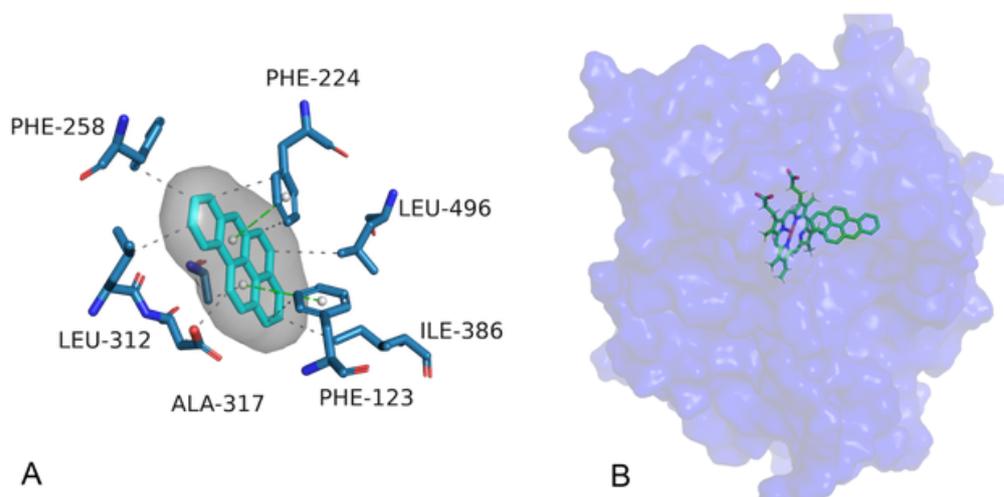


Figura 3.1.4: Representación del B[a]P y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1A1. En el A) se muestra B[a]P, en color verde rodeado de su nube electrostática, acompañado de líneas intermitentes que indican la interacción entre ligando y proteína. Alrededor del ligando se sitúan los aminoácidos Fenilalanina en las posiciones 123, 224 y 258, Asparagina-313, Alanina-317, Isoleucina-386, Leucina-496 interactuando de forma hidrofóbica, mientras que la Fenilalanina-123 y 224 en la forma de apilamiento π . En el panel B), se muestra el renderizado de la superficie de CYP1A1, enfocado en profundidad el sitio activo, el grupo Hemo, y su cercanía al ligando estudiado, es este caso B[a]P representado en color verde.

Cuadro 3.1.2: Interacciones entre CYP1A1 y el compuesto B[a]P determinadas por el acoplamiento molecular dirigido en el sitio activo de la enzima.

CYP1A1	Tipo interacción	Residuo	Distancia (Å)
B[a]P	Hidrofóbica	PHE - 123	4.0
		PHE - 224	3.64
		PHE - 258	3.57
		LEU - 312	3.73
		ASP - 313	3.94
		ALA - 317	3.68
		ILE - 386	3.52
		LEU - 496	3.99
	Apilamiento en π	PHE - 123	4.83
		PHE - 224	3.83

3.1.1.3. Acoplamiento entre CYP1B1 y Reteno

La Isoforma CYP1B1 también se expresa al momento de metabolizar xenobióticos, por esta razón, parece prudente observar si existe alguna relación *in silico* entre la enzima y los ligandos anteriormente utilizados en los ensayos de acoplamiento molecular. La energía de unión determinada fue de $-11.3 \frac{kcal}{mol}$, por lo que la pose encontrada permite favorablemente la entrada al sitio activo de la enzima, situando al Reteno frente al grupo Hemo e interactuando con los aminoácidos circundantes al sitio activo (Fig. 3.1.5). Estas interacciones con dichos aminoácidos sólo fueron del tipo hidrofóbicas (Tabla 3.1.3).

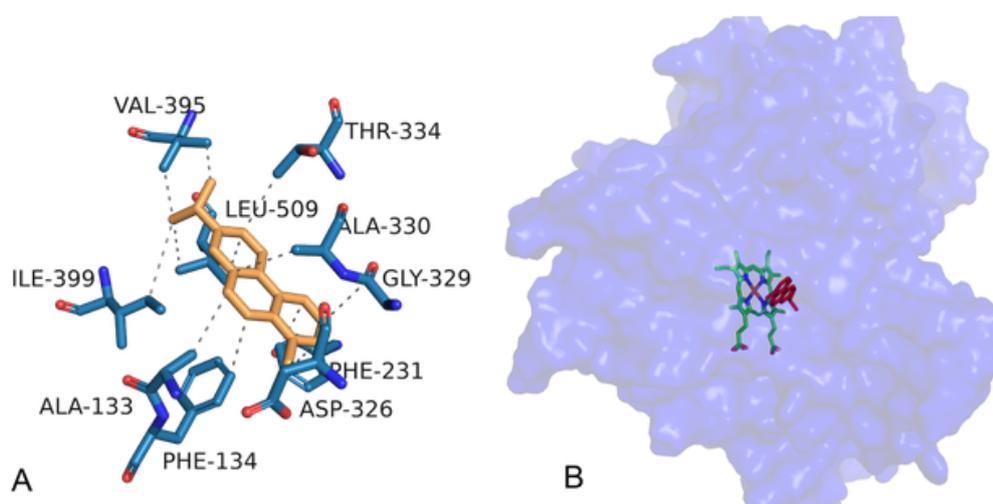


Figura 3.1.5: Representación del Reteno y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1B1. En el panel superior se muestra el Reteno, en color amarillo, acompañado de líneas intermitentes que indican la interacción entre ligando y proteína. Alrededor del ligando se sitúan los aminoácidos Fenilalanina-134, Isoleucina-399, Leucina-509, Asparagina-326, Glicina-329, Tirosina-334 y Valina-395 que interactúan de forma hidrofóbica. En el panel B), se muestra el renderizado de la superficie de CYP1B1, enfocado en profundidad el sitio activo, el grupo Hemo, y su cercanía al ligando estudiado, es este caso Reteno representado en color rojo.

Cuadro 3.1.3: Interacciones entre CYP1B1 y Reteno determinadas por el acoplamiento molecular dirigido en el sitio activo de la enzima.

CYP1B1	Tipo interacción	Residuo	Distancia (Å)
Reteno	Hidrofóbica	ALA - 133	3.79
		PHE - 134	3.31
		PHE - 231	3.55
		ASP - 326	3.22
		GLY - 329	3.50
		ALA - 330	3.81
		THR - 334	3.50
		VAL - 395	3.45
		ILE - 399	3.85
		LEU - 509	3.34

3.1.1.4. Acoplamiento entre CYP1B1 y B[a]P

Finalmente, el acoplamiento molecular entre CYP1B1 y B[a]P arrojó un resultado de $-13.6 \frac{kcal}{mol}$ correspondiente a la energía de unión del compuesto y sitio activo. Esta energía nos indica que la pose que adopta el compuesto y la forma de este, son favorables para entrar al sitio activo y situarse a una distancia que le permita interactuar con los aminoácidos que componen el sitio activo (Fig. 3.1.6). Estas interacciones se presentan de dos tipos: interacciones hidrofóbicas y apilamientos π (Tabla 3.1.4).

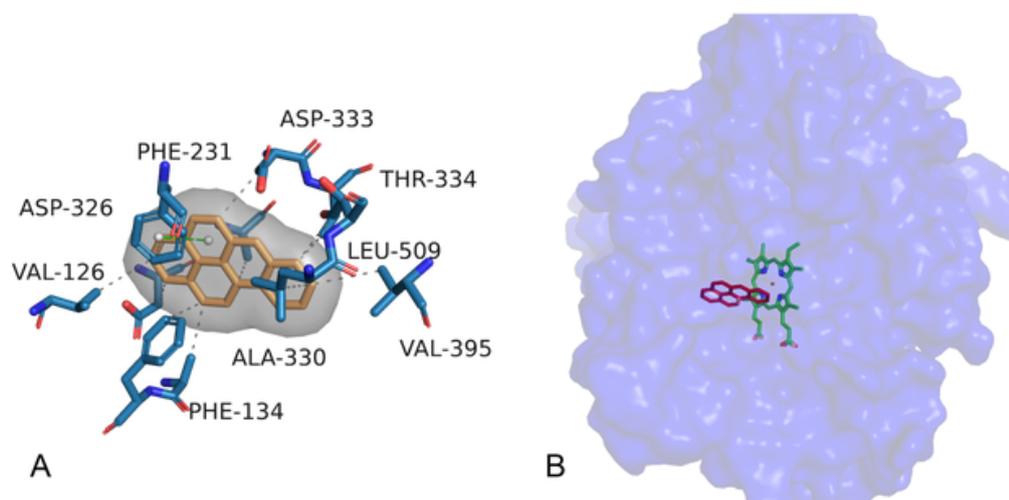


Figura 3.1.6: Representación del B[a]P y sus interacciones con los aminoácidos que componen el sitio activo de CYP1B1. En el panel A) se muestra el B[a]P, en color amarillo rodeado de su nube electrostática, acompañado de líneas intermitentes que indican la interacción entre ligando y proteína. Alrededor del ligando se sitúan los aminoácidos Fenilalanina-134, Valina-126 y 395, Leucina-509, Asparagina-326 y 333, Glicina-329, Tirosina-334 que interactúan de forma hidrofóbica. La interacción de tipo apilamiento - π está determinada por la Fenilalanina-231. En el panel B), se muestra el renderizado de la superficie de CYP1B1, enfocado en profundidad el sitio activo, el grupo Hemo, y su cercanía al ligando estudiado, es este caso B[a]P representado en color rojo y en rojo el grupo Hemo.

Cuadro 3.1.4: Interacciones entre CYP1B1 y B[a]P determinadas por el acoplamiento molecular dirigido en el sitio activo de la enzima

CYP1B1	Tipo interacción	Residuo	Distancia (Å)
B[a]P	Hidrofóbica	VAL - 126	4.00
		ALA - 133	3.28
		PHE - 134	3.29
		PHE - 231	3.83
		ASP - 326	3.70
		ASP - 333	3.55
		THR - 334	3.33
		VAL - 395	3.80
		LEU - 509	3.27
		THR - 510	3.55
	Apilamiento en π	PHE - 231	4.08

Como se esperaba para el control negativo, el ligando Hexabenzocoronene para las interacciones entre las isoformas CYP1A1 y CYP1B1 presentaron energías de unión positivas, $70.7 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ y $101.4 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ respectivamente. Esto se traduce en que el compuesto no adquiere la pose adecuada a no ser que se aplique energía, por tanto, no ocurre espontáneamente. Los valores de energía de unión entre ligandos y enzimas del experimento son resumidos en la Tabla 3.1.5.

Cuadro 3.1.5: Valores de afinidad obtenidos desde los experimentos *in silico* de acoplamiento moleculares entre las moléculas receptoras y los ligandos estudiados.

Ligando/Gen	CYP1A1 [kcal/mol]	CYP1B1 [kcal/mol]
Reteno	-12.9	-11.3
B[a]P	-14.6	-13.6
HBC	70.7	101.4

3.1.1.5. Dinámica Molecular CYP1A1 y CYP1B1

El experimento *in silico* de Dinámica Molecular tuvo por objetivo conocer si existían cambios en los esqueletos de las proteínas al interactuar en una simulación con un ligando como el Reteno. Para conocer esta interacción, se calculó la raíz de la desviación cuadrática media o RMSD (*root mean square deviation*) entre los átomos que componen el esqueleto de las proteínas. Este cálculo está representado por la fórmula 3.1.1 donde t representa el tiempo y “ x ” la posición del átomo.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{N} \sum |\mathbf{x}_i(t_2) - \mathbf{x}_i(t_1)|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.1.1)$$

Para llevar a cabo el experimento se aplicó el siguiente código en una terminal:

```

1  $!/bin/bash
2  # Código para la Dinámica Molecular CYP1A1 - Reteno #####
3  # Convertir formato de pdb a mol #####
4  obabel -isdf retene.sdf -omol -O retene.mol -h
5  # Comando para generar el complejo en formato psf #####
6  vmd dispdev text -e protein_1a1.tlc
7  # Código del script utilizado en protein_1a1.tlc
8  # Paso 1: construir proteína - CYP1A1

```

```
9 package require psfgen
10 # Usar archivo de topología específico CHARMM36
11 topology /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/top_all36_prot.rtf
12 topology
13 ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/stream/prot/toppar_all36_prot_heme.str
14 topology /home/eulogy/Escritorio/AGGg/ligandos/retene/retene.rtf
15 pdbalias residue HIS HSD
16 pdbalias atom ILE CD1 CD
17 alias residue HEM HEME
18 #pdbalias atom HOH O OH2
19 #pdbalias residue HOH TIP3
20 segment P {pdb 4i8v_H_SW.pdb}
21 coordpdb 4i8v_H_SW.pdb P
22 regenerate angles dihedrals
23 segment H {pdb heme.pdb}
24 coordpdb heme.pdb H
25 patch PSUL P:457 H:601
26 segment L {pdb retene_dock_solo.pdb}
27 coordpdb retene_dock_solo.pdb L
28 guesscoord
29 writepdb 1a1_heme_ret.pdb
30 writepsf 1a1_heme_ret.psf
31 mol load psf 1a1_heme_ret.psf pdb 1a1_heme_ret.pdb
32 quit
33 #exit
34 # Código para solvatar la proteína #####
35 vmd dispdev text -e solvate_1a1.tlc
36 #####
37 # PASO 2: Solvatar proteína
38 package require solvate
39 solvate protein_heme.psf protein_heme.pdb -t 10 -o solvated
40 quit
41 # Código para ionizar la proteína ###
42 vmd dispdev text -e ionize_1a1.tlc
43 #####
44 # PASO 3: Ionización de proteína
45 package require autoionize
46 autoionize -psf solvated.psf -pdb solvated.pdb -is 0.1
47 quit
48 # Minimización del complejo #####
49 namd2 +p 8 min.namd > min.out
50 # Código de configuración de NAMD para la minimización # #####
51 # minimización para 2000 pasos
52 # minimización para 2000 pasos
53 coordinates ionized.pdb
54 structure ionized.psf
```

```

54 first time step    0
55 temperature       0
56 minimization     on
57 numsteps          2000
58 # force field
59 paratypecharmm    on
60 parameters        test.prm
61 #parameters
62 ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/par_all36_prot.prm
63 parameters /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/stream/prot/ \\
64 toppar_all36_prot_heme.str
65 #mergeCrossterms yes
66 #parameters
67 ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/par_all36_lipid.prm
68 #parameters
69 ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/par_all36_carb.prm
70 #parameters
71 ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/par_all36_cgenff.prm
72 #parameters
73 ↪ /home/eulogy/Escritorio/AGGg/scripts/charmm_36/toppar_water_ions_namd.str
74 exclude          scaled1-4
75 1-4scaling        1.0
76 switching         on
77 switchdist        8.5
78 cutoff            10
79 pairlistdist      12
80 #PME stuf
81 cellOrigin        57.56 77.37 10.48
82 cellBasisVector1  64.70 00.00 00.00
83 cellBasisVector2  00.00 93.59 00.00
84 cellBasisVector3  00.00 00.00 82.47
85 PME              on
86 PmeGridsizeX      64
87 PmeGridsizeY      96
88 PmeGridsizeZ      81
89 margin            5
90 # output
91 outputname        min
92 outputenergies    1000
93 outputtiming       1000
94 restartname       min_restart
95 restartfreq       1000
96 restartsave       no
97 # Comando para ejecutar la Dinámica #####
98 nohup ./NAMD_2.14_Linux-x86_64-multicore/namd2 +p 8 md.namd > md.out
99 # Descripción del sistema molecular en archivo de configuración ##

```

```
95 coordinates    ionized.pdb
96 structure      ionized.psf
97 bincoordinates  min_restart.coor
98 binvelocities  min_restart.vel
99 extendedSystem min_restart.xsc
100 firsttimestep  0
101 numsteps       1000000
102 # force field
103 paratypecharmm on
104 parameters     test.prm
105 parameters     /home/eulogy/Escriptorio/AGGg/scripts/charmm_36/stream/prot/\\
106 toppar_all36_prot_heme.str
107 exclude        scaled1-4
108 1-4scaling     1.0
109 switching      on
110 switchdist     8.5
111 cutoff         10
112 pairlistdist   12
113 # integrator
114 timestep       1.0
115 stepspercycle  20
116 nonbondedFreq  1
117 #PME stuff
118 cellOrigin     57.56 77.37 10.48
119 cellBasisVector1 64.70 00.00 00.00
120 cellBasisVector2 00.00 93.59 00.00
121 cellBasisVector3 00.00 00.00 82.47
122 PME            on
123 PmeGridsizeX   64
124 PmeGridsizeY   96
125 PmeGridsizeZ   81
126 margin         5
127 # output
128 outputname     md
129 outputenergies 1000
130 outputtiming    1000
131 dcdfreq        1000
132 wrapAll        on
133 wrapNearest    on
134 restartname    md_restart
135 restartfreq    1000
136 restartsave    no
137 # Comando para transferir archivos desde cluster ##### rsync -aux
   ↪ --progress umorin@152.74.100.228://home/umorin/1b1/1b1_retено.tar.gz
   ↪ /home/eulogy/Escriptorio/
```

```

1 # Código para el análisis de trayectoria RMSD en R #####
2 #install.packages("MDplot", dependencies = TRUE)
3 library(MDplot)
4 library(gtools)
5 library(gplots)
6 #install.packages("MASS", dependencies = TRUE)
7 #install.packages("gplots", dependencies = TRUE)
8 #install.packages("gtools", dependencies = TRUE)
9 setwd("/home/eulogy/Escritorio/resultados")
10 a <- read.delim("1a1_sola.dat")
11 b <- read.delim("1a1_rete.dat")
12 c <- read.delim("1b1_sola.dat")
13 d <- read.delim("1b1_rete.dat")
14 rmsd(load_rmsd(c("1a1_sola.dat",
15                 "1a1_rete.dat",
16                 "1b1_sola.dat",
17                 "1b1_rete.dat")),
18
19         ↪ printLegend=TRUE,names=c("CYP1A1","CYP1A1-Reteno","CYP1B1","CYP1B1-Reteno"),
20         main="RMSD enzimas CYP1A1 Y CYP1B1")
21 #####

```

El ligando Reteno se encuentra posicionado en la misma pose resultante del experimento de Acoplamiento, por lo que, el experimento de Dinámica Molecular es vinculante. Con respecto al comportamiento de las moléculas en la simulación (Fig. 3.1.7), en el caso de CYP1A1 sin ligando se observa que alcanza el equilibrio prontamente entre los 0 y 0.2 ns y no tiene cambios mayores entre los 0 y 2 nm. A diferencia de CYP1A1 con el Reteno, el cual se aprecia que llegando a los 0.2 ns presenta un aumento en la diferencia entre su configuración del esqueleto entre 2 a 12 nm. Por otro lado, con respecto a CYP1B1 sin ligando esta se comporta de forma contraria, evidenciando un comportamiento oscilante entre la distancia en que se mueven los átomos que componen el esqueleto de la enzima y el tiempo que va transcurriendo en la dinámica molecular. En el caso de CYP1B1 y el ligando Reteno, línea roja, se comporta similar a como lo hace la proteína CYP1A1 sin ligando, mostrando entre los 0 y 0.4 ns, el mayor rango de cambio entre 0 y 2 nm.

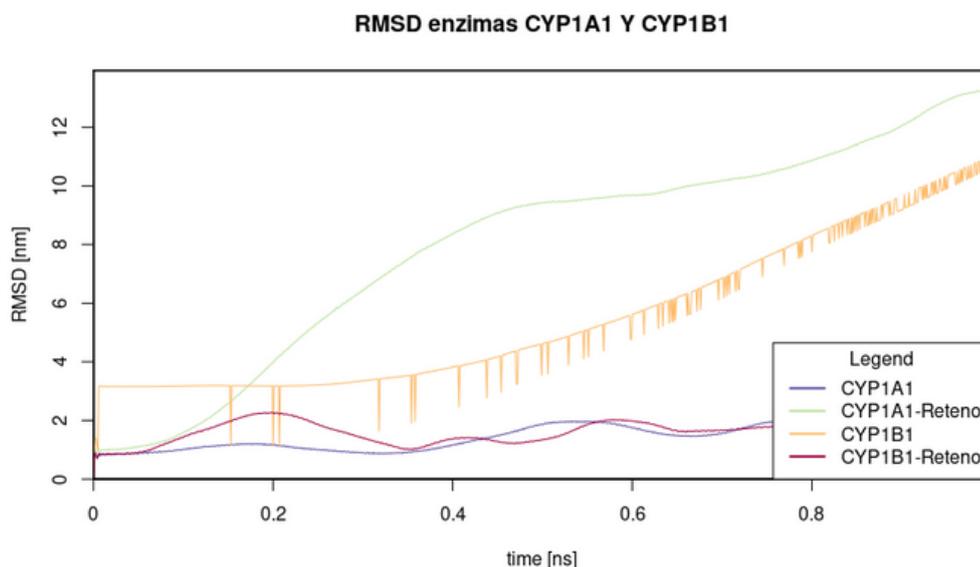


Figura 3.1.7: Gráfico de RMSD de la variación en la posición promedio de los átomos en el tiempo de la dinámica. La línea de color azul representa la proteína CYP1A1 sola, en verde la proteína CYP1A1 y el ligando reteno. En color amarillo la proteína CYP1B1 sola y finalmente la línea de color rojo indica la proteína CYP1B1 y el ligando Reteno.

3.2. Ensayos *in vitro*

3.2.1. Determinar la sensibilidad de células humanas de la línea CDD 841 al reteno

3.2.1.1. Modelo de dosis-respuesta

Para determinar la viabilidad celular de la línea celular CDD 841 de colon, se utilizó un modelo de dosis respuesta definido por la ecuación 3.2.1 :

$$f(d, \Theta) = E_0 + E_1 \left(\exp\left(\frac{d}{\delta}\right) - 1 \right) \quad (3.2.1)$$

Este modelo representa un ajuste exponencial de los datos de viabilidad celular obtenidos desde mediciones de absorbancia, aplicados sobre tratamientos con Reteno a distintas concentraciones, las cuales representan las dosis del modelo. El

siguiente código se empleó para generar el modelo anteriormente descrito en el programa estadístico R:

```

1  # Código para cargar valores de absorbancia de los experimentos #
2  setwd("/home/eulogy/Escriptorio/AGGg/DATOS")
3  data1<-read.table("test3", header = T, sep="\t")
4  is.data.frame(data1)
5  data1
6  #####
7  ## Código para cargar paquetes funcionales #####
8  install.packages("lattice", type = "source")
9  install.packages("mvtnorm", dependencies = TRUE)
10 install.packages("DoseFinding", dependencies = TRUE)
11 paquetes<-c("lattice", "mvtnorm", "DoseFinding")
12 lapply(paquetes, library, character.only = TRUE)
13 #####
14 ## Código para definir la función de Dosis - respuesta #####
15 models<- Mods(linear = NULL, emax = 0.5, quadratic = -0.17,
16               doses = c(0, 10, 20, 30, 40, 50))
17 # Cósido para confeccionar la representación gráfico #####
18 plot(models)
19 test <- MCTtest(dosis, Abs, data1, models=models)
20 #####
21 fitemax <- fitMod(dosis, Abs, data=data1, model="emax",bnds = c(0.01,5))
22 plot(fitemax, CI=TRUE, plotData="meansCI")
23 #####
24 # Obtener el valor Ed50 desde el modelo #####
25 fitmax
26 Dose Response Model
27
28 Model: emax
29 Fit-type: normal
30
31 Coefficients dose-response model
32      e0      eMax      ed50
33  1.8980 -0.7662  5.0000
34
35 Degrees of freedom: 33
36 Residual standard error: 0.4993
37 #####

```

Basado en esto, el valor *ed50* hace alusión al valor asintótico donde se encuentra la mitad, o dicho de otro modo, el 50 por ciento del cambio en el efecto máximo de la

dosis empleada. Para este experimento, este valor es igual a una dosis efectiva de 5 μM de Reteno (Fig. 3.2.1). El valor e_0 representa el promedio de las mediciones del primer tratamiento, por lo que es el valor de mayor absorbancia correspondiente a 1.8980, indicando que en este tratamiento el número de células vivas es el más alto, como es de esperar en un control. Finalmente, el valor e_{Max} alude a la pendiente del modelo, la cual es -0.7662, como se trata de una pendiente negativa, los tratamientos siguientes al control tienen una tendencia a disminuir el valor de absorbancia, por lo tanto un menor número de células vivas.

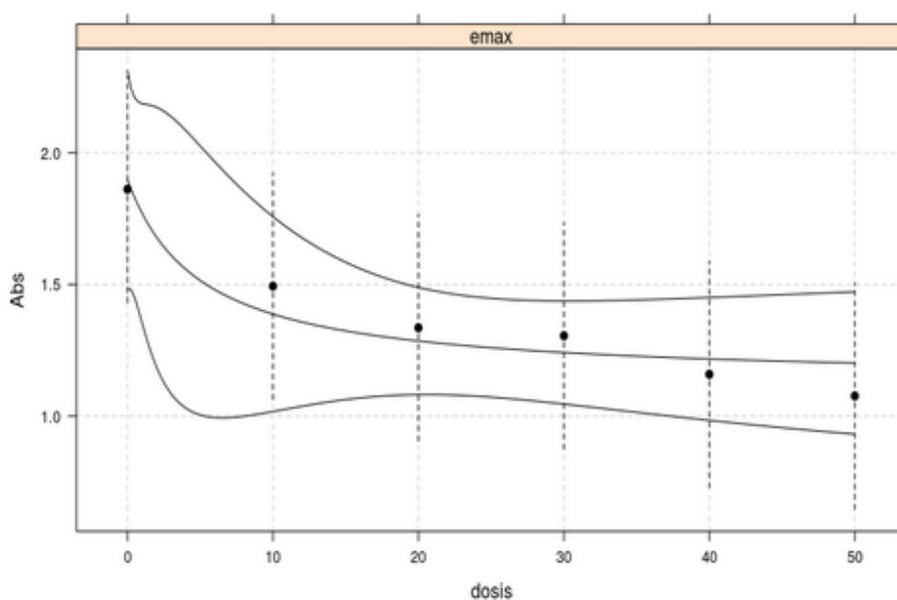


Figura 3.2.1: Modelo exponencial de dosis-respuesta. En el eje Y se encuentran los valores de absorbancia leídos y en el eje X los tratamientos utilizados desde el control, 0 μM al máximo de 50 μM . El efecto negativo del 50 por ciento de la dosis empleada se encuentra a 5 μM , se aprecia una tendencia al decrecimiento en los valores de absorbancia relacionados con el aumento de la concentración del Reteno empleada en los tratamientos.

3.2.2. Determinar la expresión de CYP1A1, CYP1B1 y RHA en células humanas tratadas con Reteno

3.2.2.1. Expresión del gen Receptor de Hidrocarburo de Arilo (RHA)

El objetivo de este experimento fue establecer si el tratamiento con el compuesto Reteno presentaba algún efecto en la expresión del gen RHA, responsable de la síntesis de la proteína receptora de xenobióticos de tipo PHA. Se trataron células CDD 841 con concentraciones de 50 μM y 75 μM de Reteno durante 24 horas, posteriormente el ARN fue extraído para analizar la expresión del gen mediante PCR. Aparte de los tratamientos con Reteno, se utilizó DMSO al 0.1 % como control negativo, ya que es el vehículo de la molécula estudiada, y Doxorubicina como control positivo del efecto sobre RHA. β -Actina se utilizó como control de carga para normalizar los valores de los tratamientos. Los resultados de la expresión de los genes fueron analizados y graficados en R donde su código se encuentra en la sección de Anexos (Anexo 1). Los valores de expresión medidos para el gen RHA con los tratamientos de Reteno fueron entre un 7 % y 10 % menores a los controles con medio de cultivo (DMEM) y el vehículo (DMSO). El tratamiento con Reteno al 50 μM representó un 19.9 % del total de la densidad de píxeles medidos para el experimento, y el tratamiento con 75 μM de Reteno mostró un 22.2 % (Tabla 3.2.1). Por otra parte, las desviaciones estándar de estos datos se encuentran en un rango entre 0.025 y 0.034 (Tabla 3.2.2). En la electroforesis se observó la aparición de los fragmentos amplificados correspondiente a un peso molecular de 198 pb (Fig.3.2.2) y se realizó la correspondiente densitometría representada en un gráfico de barras (Fig.3.2.3). El ensayo cuenta con un $n = 2$, por lo que no es posible evaluar un efecto significativo.

Cuadro 3.2.2: Resumen de las desviaciones estándar que se aplican para los valores de densitometría obtenidos para los genes AHR, CYP1A1 y CYP1B1 normalizados con el control de β -Actina. La expresión de estos genes fue evaluada mediante RT-PCR

Tratamiento	DE (AHR)	DE (CYP1A1)	DE (CYP1B1)
DMEM	0.0254	0.0120	0.0091
DMSO	0.0487	0.0289	0.0134
Doxorubicina 5 μ M	0.0162	0.0127	0.0035
Reteno 50 μ M	0.0417	0.0473	0.0176
Reteno 75 μ M	0.0346	0.0282	0.0113

Cuadro 3.2.1: Datos de densidad de píxeles, normalización con el control de β -Actina y porcentaje relativos desde la densitometría de los genes probados en los experimentos de expresión de genes CYP1A1, CYP1B1 y AHR. Estos datos se obtuvieron cuantificando la densidad de píxeles de las bandas en los geles de agarosa.

Genes	DMEM	DMSO	Doxorubicina 5 μ M	Reteno 50 μ M	Reteno 75 μ M	Total
AHR	14799,823	13423,187	3055,822	9159,924	11884,631	
AHR	15204,598	13004,245	3652,124	9412,871	11102,115	
CYP1A1	9006,267	8191,853	2234,033	5451,296	7705,368	
CYP1A1	9201,551	7951,900	2680,410	5901,359	7102,896	
CYP1B1	1711,083	2627,569	523,920	1148,648	1772,083	
CYP1B1	1855,235	2964,897	642,650	1347,778	1925,569	
B-actina	11195,500	12649,296	10865,217	9846,752	11422,924	
B-actina	11200,700	13105,265	11987,847	9510,892	11199,451	
B-actina / AHR	1,357	1,061	0,281	0,930	1,040	4,671
B-actina / AHR	1,357	0,992	0,305	0,990	0,991	4,635
B-actina / CYP1A1	0,804	0,648	0,206	0,554	0,675	2,886
B-actina / CYP1A1	0,822	0,607	0,224	0,620	0,634	2,907
B-actina / CYP1B1	0,153	0,208	0,048	0,117	0,155	0,681
B-actina / CYP1B1	0,166	0,226	0,054	0,142	0,172	0,759
% relativo AHR	29,064	22,721	6,022	19,917	22,276	100,000
% relativo AHR	29,285	21,407	6,572	21,351	21,386	100,000
% relativo CYP1A1	27,876	22,441	7,125	19,184	23,375	100,000
% relativo CYP1A1	28,264	20,876	7,693	21,348	21,820	100,000
% relativo CYP1B1	22,457	30,522	7,085	17,140	22,795	100,000
% relativo CYP1B1	21,819	29,802	7,062	18,667	22,649	100,000

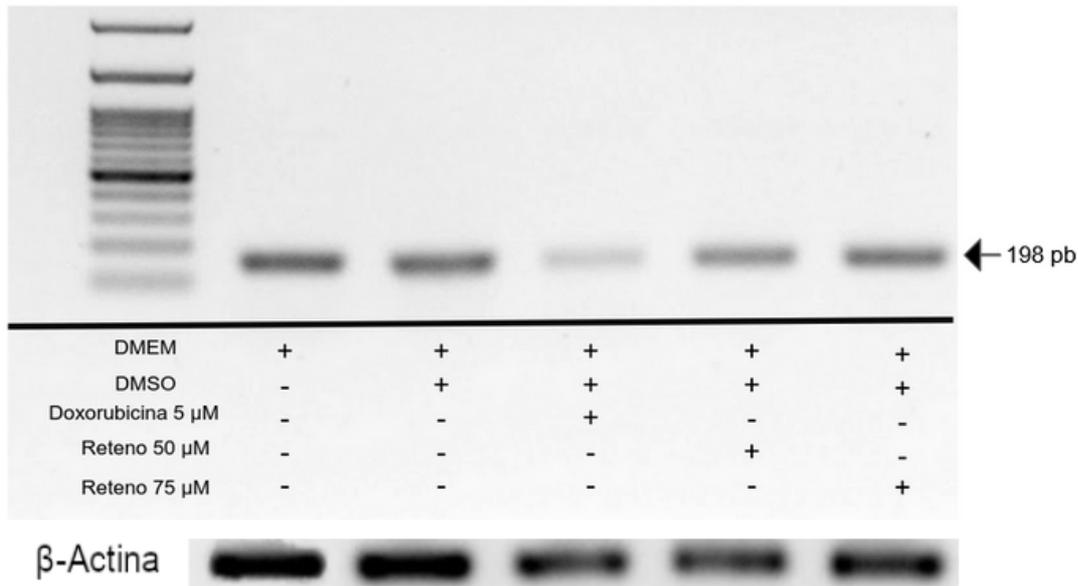


Figura 3.2.2: Análisis de la expresión del gen RHA.. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de la expresión de AHR. La banda obtenida del producto de PCR amplificado corresponde a un fragmento de 198 pb. Con signos (+) se presenta el tratamiento presente y con (-) el tratamiento ausente en cada banda.

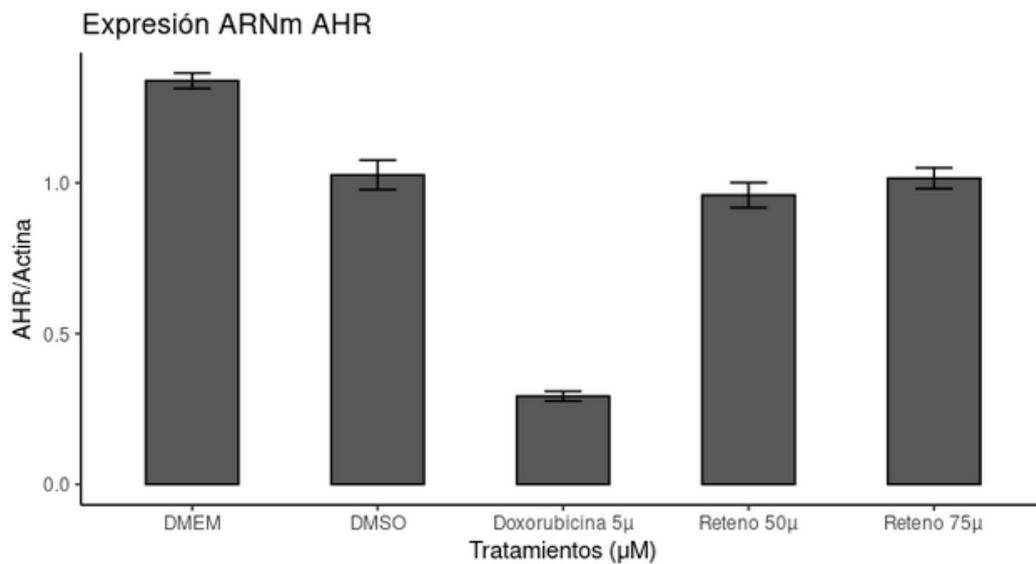


Figura 3.2.3: Gráfico de las densitometrías realizadas a partir de la expresión de RHA. Se normalizaron los valores con respecto al control de β -Actina con un n=2.

3.2.2.2. Expresión del gen CYP1A1

Los valores de expresión medidos para el gen CYP1A1, luego de tratar células CCD 841 con Reteno, fueron entre un 1% y 8% menores a los controles con medio de cultivo (DMEM) y el vehículo (DMSO). El tratamiento con Reteno al 50 μM representó un 20.6% del total de la densidad de píxeles medidos para el experimento, y el tratamiento con 75 μM de Reteno mostró un 22.6% (Tabla 3.2.1). Por otra parte, las desviaciones estándar de estos datos se encuentran en un rango entre 0.012 y 0.047 (Tabla 3.2.2). En la electroforesis se observó la aparición de los fragmentos amplificados correspondiente a un peso molecular de 302 pb (Fig. 3.2.4) y se realizó la correspondiente densitometría representada en un gráfico de barras (Fig.3.2.5). El ensayo cuenta con un $n = 2$, por lo que no es posible evaluar un efecto significativo.

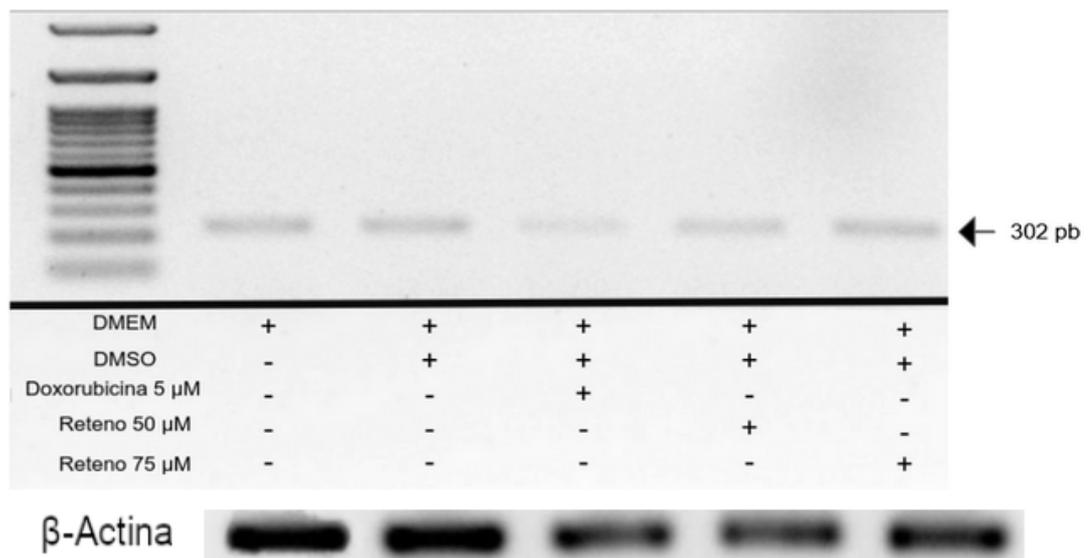


Figura 3.2.4: Análisis de la expresión del gen CYP1A1. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de la expresión de CYP1A1. La banda obtenida del producto de PCR amplificado corresponde a un fragmento de 302 pb. Con signos (+) se presenta el tratamiento presente y con (-) el tratamiento ausente en cada banda.

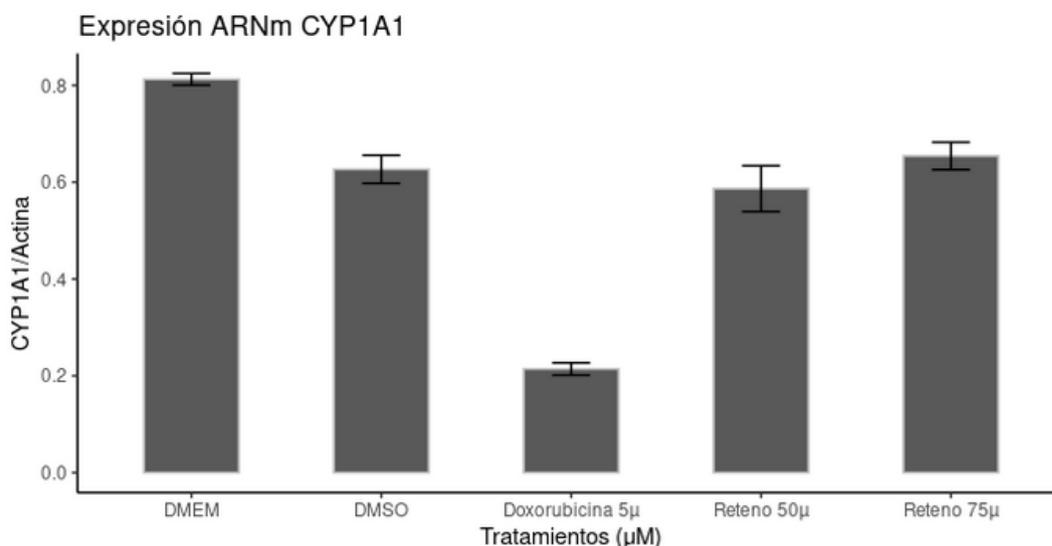


Figura 3.2.5: Gráfico de las densitometrías realizado a partir de la expresión de CYP1A1. Se normalizaron los valores con respecto al control de β -Actina con un $n=2$.

3.2.2.3. Expresión del gen CYP1B1

Los valores de expresión obtenidos para el gen CYP1B1 luego de tratar células normales de colon con Reteno, fueron entre un 6 % y 0 % menores a los controles con medio de cultivo (DMEM) y el vehículo (DMSO). El tratamiento con Reteno al 50 μM representó un promedio de 17.9 % del total de la densidad de píxeles medidos para el experimento, y el tratamiento con 75 μM de Reteno mostró un promedio de 22.7 % (Tabla 3.2.1). Por otra parte, las desviaciones estándar de estos datos se encuentran en un rango entre 0.009 y 0.017 (Tabla 3.2.2). En la electroforesis se observó la aparición de los fragmentos amplificados correspondiente a un peso molecular de 224 pb (Fig.3.2.6) y se realizó la correspondiente densitometría representada en un gráfico de barras (Fig. 3.2.7). El ensayo cuenta con un $n = 2$, por lo que no es posible evaluar un efecto significativo.

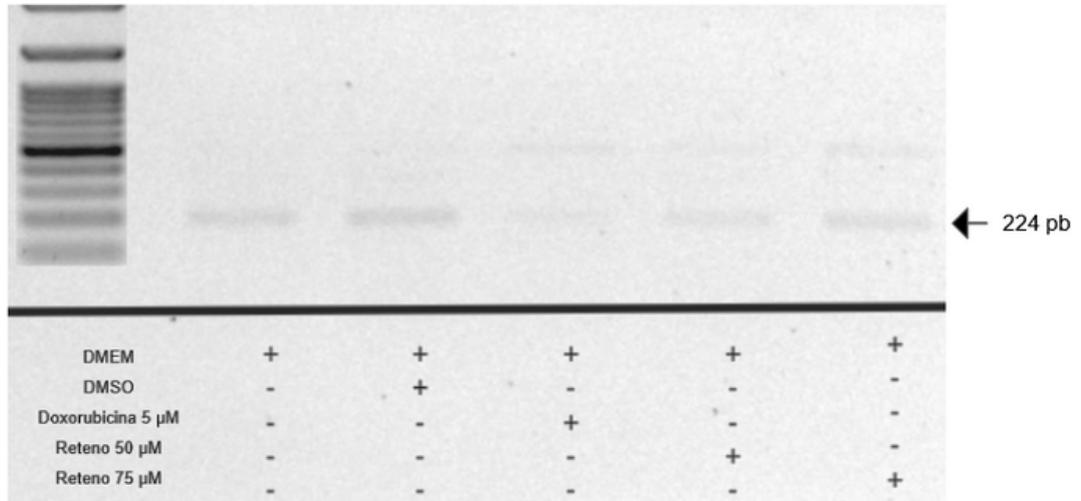


Figura 3.2.6: Análisis de la expresión del gen CYP1B1. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de la expresión de CYP1B1. La banda obtenida del producto de PCR amplificado corresponde a un fragmento de 224 pb. Con signos (+) se presenta el tratamiento presente y con (-) el tratamiento ausente en cada banda.

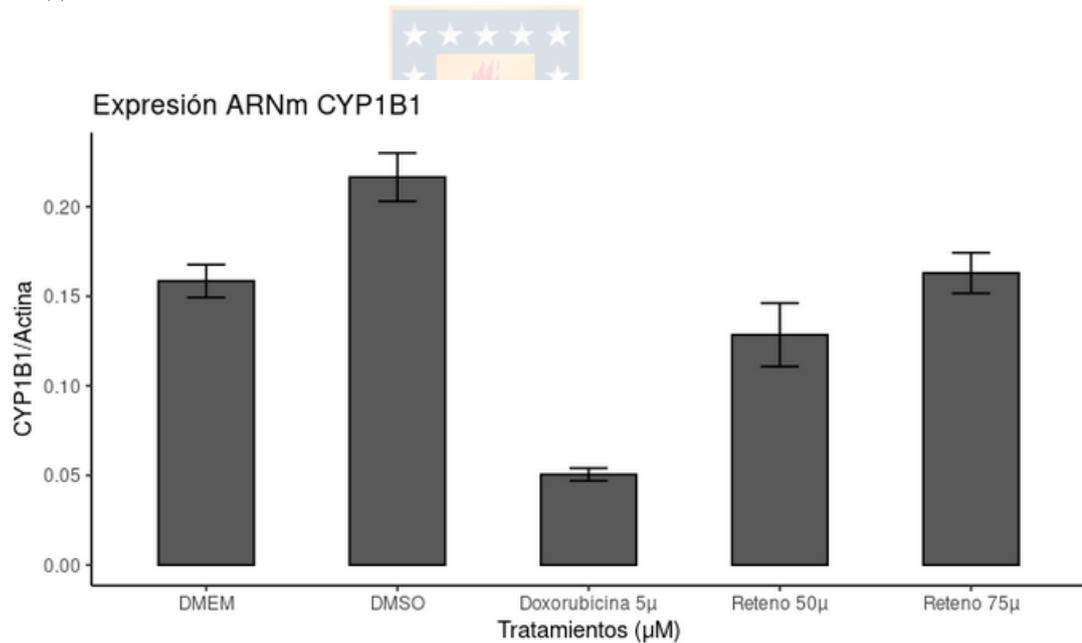


Figura 3.2.7: Gráfico de las densitometrías realizado a partir de la expresión de CYP1B1. Se normalizaron los valores con respecto al control de β -Actina con un n=2.

Capítulo 4

Discusión

El problema de los efectos que pueden generar los xenobióticos de tipo PHA expuesto en el marco teórico de esta tesis. Estos abarcan una serie de efectos negativos tales como alteraciones endocrinas, mutagénesis y la formación de aductos. Esta tesis se centró en el Reteno, un PHA del cual poco se ha explorado en Chile. Este compuesto solo se ha detectado en muestras de sedimento aguas abajo de las descargas de plantas de celulosa en el río Biobío, mediante espectrometría de masa acoplado a cromatografía de gas (GCxGC-ToF-MS)(Chamorro et al., 2013), pero no existen investigaciones asociadas a la cuantificación de este compuesto en los sedimentos. Este punto es de vital importancia, ya que cuantificar la concentración del Reteno aguas arriba y aguas abajo de las descargas de efluentes podría dar señales de concentraciones anormales de origen antropogénico. Por otro lado, tampoco existe registro o asociación de patologías en las poblaciones aledañas a las industrias de celulosa, como por ejemplo la incidencia de algunos tipos de cáncer producto de la bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación de los xenobióticos de origen antropogénico, como el Reteno y otros HAPs. En este estudio, se evaluó el Reteno dada la escasa evidencia que existe y que muestra que este compuesto puede causar efectos negativos debido a su estructura donde los anillos de benceno que forman su esqueleto de fenantreno pueden ser alquilados u

oxigenados por acción de CYP1A1 (Huang et al., 2017). Con respecto al estudio bioinformático propuesto en esta tesis, se estableció una metodología de trabajo que puede aplicarse a cualquier compuesto del cual se sospeche una actividad tóxica en los organismos. Esto mediante el análisis proteína - ligando, en este caso de la proteína CYP, la cual es un biomarcador de contaminación ambiental por su participación en el metabolismo de xenobióticos orgánicos. Como se esperaba, el Reteno puede acceder al sitio activo de las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 debido a que su acople es energéticamente favorable con valores negativos de ΔG ($\frac{kcal}{mol}$). El reteno al ser una molécula plana, como su par B[a]P pueden posicionarse en el sitio activo y girar en 180° , y las diferencias entre los valores de ΔG entre CYP1A1 y CYP1B1 podrían estar dados por los volúmenes de la cavidad del sitio activo que en CYP1A1 son del orden de 524 \AA^3 y para CYP1B1 de 441 \AA^3 provocando que CYP1A1 sea más afín con el Reteno que CYP1B1 (Walsh et al., 2013). Se han desarrollado protocolos bioinformáticos para determinar la activación de las rutas de metabolización de xenobióticos en base a HAPs como el B[a]P, donde los valores de energía de unión son similares a los obtenidos en esta tesis, pero no abordan compuestos como el Reteno (Khan et al., 2018). Estos resultados validan el uso de B[a]P como control positivo, por tanto, el reteno establece una interacción fuerte con el sitio activo de CYP1A1 y CYP1B1, las principales isoformas de CYP en la metabolización de xenobióticos. Las interacciones hidrofóbicas y apilamientos en π encontradas entre los aminoácidos que componen el sitio activo y el Reteno permitirían la estabilización del complejo formado entre la enzima y el ligando (Joshi et al., 2017; Khan et al., 2018). Para apoyar los resultados encontrados en los experimentos de Acoplamiento Molecular, se realizaron Dinámicas Moleculares. Por una parte, a partir de estos ensayos se puede deducir que CYP1A1 es más estable que el complejo CYP1A1-Reteno. Por otro lado, el complejo CYP1B1-Reteno es más estable que CYP1B1. Esto puede deberse en mayor medida al tiempo de simulación, ya que, debido a la capacidad de cómputo y la optimización

del tiempo de trabajo, las Dinámicas Moleculares fueron realizadas por un tiempo de 1 ns. Eventualmente se podría repetir este experimento, en un cluster más potente con el propósito aumentar este tiempo de simulación a 10 ns o 20 ns, así aumentaremos la resolución de los resultados, conociendo con mayor exactitud el tiempo en donde se estabilizará el complejo CYP1B1-Reteno y CYP1B1 (Joshi et al., 2017; Khan et al., 2018). La formación estable de los complejos CYP1A1 y CYP1B1 con el Reteno podría originar la formación de un epóxido de xenobiótico, el cual tendría consecuencias directas en la formación de aductos y daño en el material genético. Esta probable formación del epóxido desde el Reteno debido a la acción de CYP en la fase II de la metabolización induce a la enzima Aldo-Ceto reductasa, la cual forma θ -quinonas a partir de los epóxidos de HAPs, generando daño por estrés oxidativos y formación de aductos (Burczynski & Penning, 2000; Huang et al., 2017). En consecuencia, la ruta de metabolización de los HAPs, debería comenzar por la unión del ligando a RHA (Fig.1.4.1), del cual se desconoce si se une al Reteno en *Homo sapiens*. Si existe evidencia de la relación Reteno - RHA en *Danio rerio* (Teleosteo) mediante técnicas de inhibición enzimática, expresando la proteína y generando Knock-out a través de morfolinós (Billiard et al., 2002, 2006). Esta evidencia podría ser un indicio de resultados positivos en la interacción entre el Reteno y RHA humana, la cual podría evaluarse siguiendo el protocolo establecido en esta tesis. Subsecuentemente, el estudio de viabilidad celular realizado mediante la técnica colorimétrica MTT y analizada bajo un modelo de dosis respuesta, muestra una disminución en la sobrevivencia de las células. Una disminución en la viabilidad celular se ha observado en células hepáticas HepG2 y A549 tratadas con B[a]P utilizando la misma técnica de análisis (Wang et al., 2015, 2018). Adicionalmente la viabilidad celular podría evaluarse con técnicas de mayor resolución como Citometría de Flujo, con el fin de cuantificar las células viables y no viables mediante la aplicación de tinciones de exclusión como el Ioduro de propidio (Kamiloglu et al., 2020; Paul et al., 2020), así el modelo de

dosis respuesta aplicado podría representar de mejor manera la población celular a medir y reducir la dispersión de los mismos, ya que es un método cuantitativo diferencial.

En lo que respecta al análisis de expresión de los genes RHA, CYP1A1 y CYP1B1, se determinó que existen diferencias en la expresión de estos. En el caso del gen RHA, la diferencia entre los tratamientos 50 μM y 75 μM fue de un 2.3 %. Esta leve tendencia puede deberse a que el receptor RHA no solo tiene la función de ser factor de transcripción de los genes CYP, sino que también participa en varios procesos celulares como motilidad, migración, proliferación y diferenciación celular (Panchanathan et al., 2015). Por tanto, RHA podría mostrar una expresión basal constitutiva, por lo que al aplicar el tratamiento, no afectaría significativamente la expresión de este gen. Esto último resultaría óptimo desde un punto de vista de la respuesta celular, ya que al entrar el xenobiótico al citosol, este podría formar inmediatamente el complejo RHA-Reteno, para luego promover la transcripción de los genes de la familia CYP (Panchanathan et al., 2015). Para el caso de la expresión de los genes CYP1A1 y CYP1B1, ambos evidenciaron una relación de aumento en la expresión con la dosis de Reteno aplicada. Por una parte, la expresión CYP1A1, en cuanto a la intensidad de las bandas observadas, fue en promedio 4.0138 veces más que CYP1B1. Estos resultados fueron obtenidos al determinar la densidad de píxeles calculada en la densitometría. Este resultado podría indicar que, luego que RHA forma un complejo con el Reteno, éste actúa preferentemente como factor de transcripción del gen CYP1A1 promoviendo su expresión, a diferencia de CYP1B1. El esquema general propuesto a partir de los ensayos realizados en esta tesis sobre el efecto del Reteno en células humanas de colon CCD 841, podría estar dado por la expresión basal de RHA. El Reteno al ser una molécula de tipo HAP plana, podría unirse fuertemente a RHA permitiendo la formación de un complejo estable. Posteriormente el complejo podría ser trasladado al núcleo por TNRHA para comportarse como factor de transcripción, uniéndose

a Elementos de Respuesta a Dioxinas en la región promotora de genes CYP. Esta sería la ruta clásica de metabolización de xenobióticos, donde se promueve la expresión de CYP1A1 por sobre CYP1B1 de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos *in silico* e *in vitro*. Finalmente, la metabolización del Reteno producto de la actividad epóxica de CYP1A1 podría formar θ -quinona, las cuales se conoce, son responsables de la formación de enlaces covalentes en el ADN conocidos como aductos, teniendo consecuencias mutagénicas (Fig. 4.0.1).

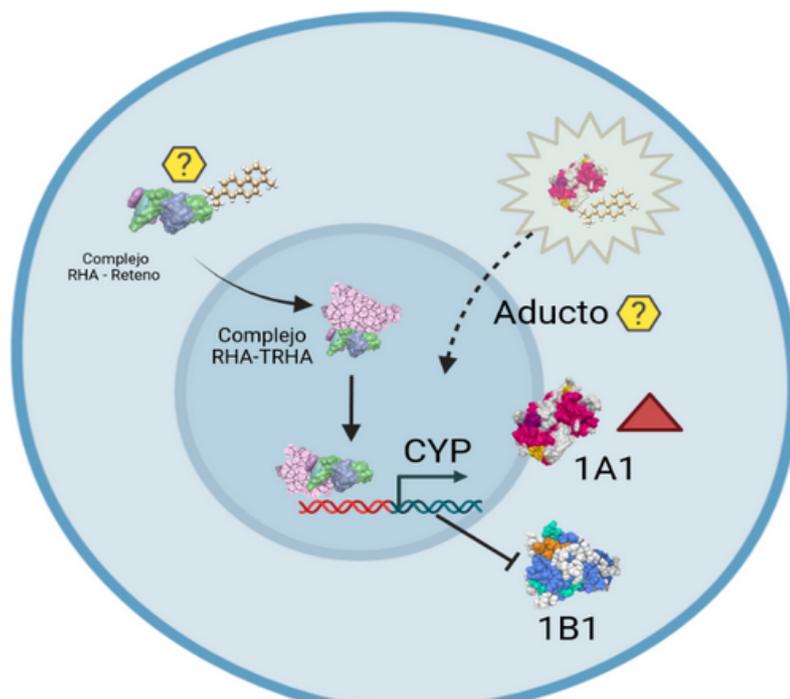


Figura 4.0.1: Esquema del efecto del Reteno en células CDD 841 de colon normal.. El Reteno se une al Receptor de Hidrocarburo de Arilo (RHA) siendo traslocado al núcleo de la célula para promover la expresión de enzimas metabólicas de PHA de la familia CYP. CYP1A1 metaboliza el Reteno, pudiendo formar especies químicas con implicancia en la formación de aductos en el ADN. Imagen de elaboración propia.

Para concluir, la producción de un protocolo bioinformático validado por ensayos bioquímicos para evaluar la interacción de xenobióticos producido por la industria de la celulosa, podría automatizarse para evaluar cualquier compuesto, generando una herramienta de bajo costo, rápida y efectiva para el estudio de toxicología con aplicaciones en salud pública.

Bibliografía

- Acun, B., Hardy, D. J., Kale, L. V., Li, K., Phillips, J. C., & Stone, J. E. (2018). Scalable molecular dynamics with namd on the summit system. *IBM journal of research and development*, 62(6):4–1.
- Ali, M. & Sreekrishnan, T. (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in environmental research*, 5(2):175–196.
- Anway, M. D. & Skinner, M. K. (2006). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*, 147(6):s43–s49.
- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and dna damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5):1213–1224.
- Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., & Perdew, G. H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 18(3).
- Bersten, D. C., Sullivan, A. E., Peet, D. J., & Whitelaw, M. L. (2013). bhlh–pas proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(12):827–841.
- Billiard, S. M., Hahn, M. E., Franks, D. G., Peterson, R. E., Bols, N. C., & Hodson, P. V. (2002). Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (ahrs). *Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology*, 133(1):55–68.
- Billiard, S. M., Querbach, K., & Hodson, P. V. (1999). Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(9):2070–2077.
- Billiard, S. M., Timme-Laragy, A. R., Wassenberg, D. M., Cockman, C., & Di Giulio, R. T. (2006). The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicological Sciences*, 92(2):526–536.
- Birkett, J. W. & Lester, J. N. (2002). *Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes*. IWA Publishing.
- Buratti, F. M., Volpe, M. T., Meneguz, A., Vittozzi, L., & Testai, E. (2003).

- Cyp-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and applied pharmacology*, 186(3):143–154.
- Burczynski, M. E. & Penning, T. M. (2000). Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce cyp1a1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer research*, 60(4):908–915.
- Camus, P. & Solari, M. E. (2008). La invención de la selva austral: Bosques y tierras despejadas en la cuenca del río valdivia (siglos xvi-xix). *Revista de Geografía Norte Grande*, (40):5–22.
- Casals-Casas, C. & Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73:135–162.
- Chamorro, S., Hernández, V., Matamoros, V., Domínguez, C., Becerra, J., Vidal, G., Piña, B., & Bayona, J. (2013). Chemical characterization of organic microcontaminant sources and biological effects in riverine sediments impacted by urban sewage and pulp mill discharges. *Chemosphere*, 90(2):611–619.
- Chiang, G., Barra, R., Díaz-Jaramillo, M., Rivas, M., Bahamonde, P., & Munkittrick, K. R. (2015). Estrogenicity and intersex in juvenile rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) exposed to pine/eucalyptus pulp and paper production effluent in chile. *Aquatic Toxicology*, 164:126–134.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1):156–159.
- Darbre, P. D. (2017). Endocrine disruptors and obesity. *Current obesity reports*, 6(1):18–27.
- de Oliveira Alves, N., Vessoni, A. T., Quinet, A., Fortunato, R. S., Kajitani, G. S., Peixoto, M. S., de Souza Hacon, S., Artaxo, P., Saldiva, P., Menck, C. F. M., et al. (2017). Biomass burning in the amazon region causes dna damage and cell death in human lung cells. *Scientific reports*, 7(1):1–13.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M.-s., & Pfeifer, G. P. (1996). Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science*, 274(5286):430–432.
- Díaz, M. E., Figueroa, R., Alonso, M. L. S., & Vidal-Abarca, M. R. (2018). Exploring the complex relations between water resources and social indicators: the biobío basin (chile). *Ecosystem Services*, 31:84–92.
- Diniz, M., Peres, I., Castro, L., Freitas, A., Rocha-Santos, T., Pereira, R., & Duarte, A. (2010). Impact of a secondary treated bleached kraft pulp mill effluent in both sexes of goldfish (*carassius auratus* l.). *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 45(14):1858–1865.

- Donoso, P. J. & Otero, L. A. (2005). Hacia una definición de país forestal:¿ dónde se sitúa Chile?. *Bosque (Valdivia)*, 26(3):5–18.
- Ehrnström-Fuentes, M. (2015). Production of absence through media representation: A case study on legitimacy and deliberation of a pulp mill dispute in southern Chile. *Geoforum*, 59:51–62.
- Ehrnström-Fuentes, M. & Kröger, M. (2017). In the shadows of social licence to operate: Untold investment grievances in Latin America. *Journal of Cleaner Production*, 141:346–358.
- Essigmann, J., Croy, R., Nadzan, A., Busby, W., Reinhold, V., Büchi, G., & Wogan, G. (1977). Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(5):1870–1874.
- Estévez, J., Vilanova, E., & Sogorb, M. A. (2019). Biomarkers for testing toxicity and monitoring exposure to xenobiotics. In *Biomarkers in Toxicology*, pages 1165–1174. Elsevier.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the Autodock Suite. *Nature Protocols*, 11(5):905–919.
- Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1):311–317.
- Fujita, S., Chiba, I., Ishizuka, M., Hoshi, H., Iwata, H., Sakakibara, A., Tanabe, S., Kazusaka, A., Masuda, M., Masuda, Y., et al. (2001). P450 in wild animals as a biomarker of environmental impact. *Biomarkers*, 6(1):19–25.
- Gaete, H., Larrain, A., Bay-Schmith, E., Baeza, J., & Rodríguez, J. (2000). Ecotoxicological assessment of two pulp mill effluents, Biobío river basin, Chile. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(2):183–189.
- Gaete, H. & Paredes, K. (1996). Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 12(1):23–28.
- Gelboin, H. V. (1980). Benzo [a] pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological Reviews*, 60(4):1107–1166.
- Gomes, J., Al Zayadi, A., & Guzman, A. (2011). Occupational and environmental risk factors of adult primary brain cancers: a systematic review.
- Gysling, C., Janina, A., González, V., Soto Aguirre, D. A., Pardo, V., Poblete, P., et al. (2019). Anuario forestal 2018.
- Häkkinen, J., Vehniäinen, E., & Oikari, A. (2004). High sensitivity of northern pike

- larvae to uv-b but no uv-photoinduced toxicity of retene. *Aquatic Toxicology*, 66(4):393–404.
- Hawliczek, A., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R., Winkens, K., Hollert, H., Segner, H., & Legler, J. (2012). Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo [b] fluorene and retene in the zebrafish danio rerio. *Reproductive toxicology*, 33(2):213–223.
- Hecht, S. S. (1999). Dna adduct formation from tobacco-specific n-nitrosamines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2):127–142.
- Hernández, V., Eberlin, M., Chamorro, S., Becerra, J., & Silva, M. (2013). Steroidal metabolites in chilean river sediments influenced by pulp mill effluents. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(4):2035–2037.
- Hong, J.-Y. & Yang, C. S. (1997). Genetic polymorphism of cytochrome p450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environmental health perspectives*, 105(suppl 4):759–762.
- Huang, M., Mesaros, C., Hackfeld, L. C., Hodge, R. P., Zang, T., Blair, I. A., & Penning, T. M. (2017). Potential metabolic activation of a representative c4-alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon retene (1-methyl-7-isopropyl-phenanthrene) associated with the deepwater horizon oil spill in human hepatoma (hepg2) cells. *Chemical research in toxicology*, 30(4):1093–1101.
- Itriago, G. L., Silva, I. N., & Cortes, F. G. (2013). Cáncer en Chile y el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4):531–552.
- Jarvis, I. W., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., & Stenius, U. (2014). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*, 321:27–39.
- Joshi, P., McCann, G. J., Sonawane, V. R., Vishwakarma, R. A., Chaudhuri, B., & Bharate, S. B. (2017). Identification of potent and selective cyp1a1 inhibitors via combined ligand and structure-based virtual screening and their in vitro validation in sacchrosomes and live human cells. *Journal of chemical information and modeling*, 57(6):1309–1320.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3):332–349.
- Kesharwani, S. S., Nandekar, P. P., Pragyana, P., Rathod, V., & Sangamwar, A. T. (2016). Characterization of differences in substrate specificity among cyp1a1, cyp1a2 and cyp1b1: an integrated approach employing molecular docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Recognition*, 29(8):370–390.
- Khan, M. K. A., Akhtar, S., & Arif, J. M. (2018). Development of in silico protocols to predict structural insights into the metabolic activation pathways of

- xenobiotics. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 10(2):329–345.
- Kuzhandaivelu, N., Cong, Y.-S., Inouye, C., Yang, W.-M., & Seto, E. (1996). Xap2, a novel hepatitis b virus x-associated protein that inhibits x transactivation. *Nucleic acids research*, 24(23):4741–4750.
- Lahdelma, I. & Oikari, A. (2005). Resin acids and retene in sediments adjacent to pulp and paper industries (8 pp). *Journal of Soils and Sediments*, 5(2):74–81.
- Li, S., Pei, X., Zhang, W., Xie, H. Q., & Zhao, B. (2014). Functional analysis of the dioxin response elements (dres) of the murine cyp1a1 gene promoter: beyond the core dre sequence. *International journal of molecular sciences*, 15(4):6475–6487.
- Manikandan, P. & Nagini, S. (2018). Cytochrome p450 structure, function and clinical significance: a review. *Current drug targets*, 19(1):38–54.
- Marchand-Geneste, N. & Carpy, A. (2003). Theoretical study of the thermal degradation pathways of abietane skeleton diterpenoids: aromatization to retene. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 635(1-3):55–82.
- Massion, P. P., Sequist, L. V., & Pao, W. (2016). Biology of lung cancer. In *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*, pages 912–926. Elsevier.
- MINSAL (2011). Indicadores básicos de salud chile. *Departamento de Estadísticas e Información en Salud*.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2):55–63.
- Murray, I. A., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, 14(12):801–814.
- Oikari, A., Fragoso, N., Leppänen, H., Chan, T., & Hodson, P. V. (2002). Bioavailability to juvenile rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) of retene and other mixed-function oxygenase-active compounds from sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(1):121–128.
- Orrego, R., Burgos, A., Moraga-Cid, G., Inzunza, B., Gonzalez, M., Valenzuela, A., Barra, R., & Gavilán, J. F. (2006). Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the biobio river, chile. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(9):2280–2287.
- Panchanathan, R., Liu, H., & Choubey, D. (2015). Activation of p53 in human and murine cells by dna-damaging agents differentially regulates aryl hydrocarbon receptor levels. *International journal of toxicology*, 34(3):242–249.

- Paul, P., Iyer, S., Nadella, R. K., Nayak, R., Chellappa, A. S., Ambardar, S., Sud, R., Sukumaran, S. K., Purushottam, M., Jain, S., et al. (2020). Lithium response in bipolar disorder correlates with improved cell viability of patient derived cell lines. *Scientific reports*, 10(1):1–10.
- Peixoto, M. S., da Silva Junior, F. C., de Oliveira Galvão, M. F., Roubicek, D. A., de Oliveira Alves, N., & de Medeiros, S. R. B. (2019). Oxidative stress, mutagenic effects, and cell death induced by retene. *Chemosphere*, 231:518–527.
- Plant, A. L., Knapp, R., & Smith, L. (1987). Mechanism and rate of permeation of cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Biological Chemistry*, 262(6):2514–2519.
- Poirier, M. C. (2016). Linking dna adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 57(7):499–507.
- Ramdahl, T. (1983). Retene a molecular marker of wood combustion in ambient air. *Nature*, 306(5943):580–582.
- Räsänen, K., Arsiola, T., & Oikari, A. (2012). Fast genomic biomarker responses of retene and pyrene in liver of juvenile rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(4):733–738.
- Raudoniute, J., Stasiulaitiene, I., Kulvinskiene, I., Bagdonas, E., Garbaras, A., Krugly, E., Martuzevicius, D., Bironaite, D., & Aldonyte, R. (2018). Pro-inflammatory effects of extracted urban fine particulate matter on human bronchial epithelial cells beas-2b. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32):32277–32291.
- Regnault, C., Usal, M., Veyrenc, S., Couturier, K., Batandier, C., Bulteau, A.-L., Lejon, D., Sapin, A., Combourieu, B., Chetiveaux, M., et al. (2018). Unexpected metabolic disorders induced by endocrine disruptors in *xenopus tropicalis* provide new lead for understanding amphibian decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19):E4416–E4425.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: Imagej for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*, 18(1):1–26.
- Salas, C., Donoso, P. J., Vargas, R., Arriagada, C. A., Pedraza, R., & Soto, D. P. (2016). The forest sector in chile: an overview and current challenges. *Journal of Forestry*, 114(5):562–571.
- Sarma, S. N., Blais, J. M., & Chan, H. M. (2017). Neurotoxicity of alkylated polycyclic aromatic compounds in human neuroblastoma cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(5):285–300.
- Simão, L., Hotza, D., Raupp-Pereira, F., Labrincha, J., & Montedo, O. R. K. (2018). Wastes from pulp and paper mills-a review of generation and recycling alternatives. *Cerâmica*, 64:443–453.

- Singh, A. K. & Chandra, R. (2019). Pollutants released from the pulp paper industry: Aquatic toxicity and their health hazards. *Aquatic toxicology*, 211:202–216.
- Soskolne, C. L. & Sieswerd, L. E. (2010). Cancer risk associated with pulp and paper mills: a review of occupational and community epidemiology. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*, 29.
- Szeliga, J. & Dipple, A. (1998). Dna adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chemical research in toxicology*, 11(1):1–11.
- Takano, H., Yanagisawa, R., Ichinose, T., Sadakane, K., Inoue, K.-i., Yoshida, S.-i., Takeda, K., Yoshino, S., Yoshikawa, T., & Morita, M. (2002). Lung expression of cytochrome p450 1a1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Archives of toxicology*, 76(3):146–151.
- Tarantini, A., Maître, A., Lefèbvre, E., Marques, M., Rajhi, A., & Douki, T. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo [a] pyrene to form dna adducts in human cells. *Toxicology*, 279(1-3):36–44.
- Team, R. C. et al. (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- Top, E. M. & Springael, D. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current opinion in biotechnology*, 14(3):262–269.
- Torén, K., Persson, B., & Wingren, G. (1996). Health effects of working in pulp and paper mills: malignant diseases. *American journal of industrial medicine*, 29(2):123–130.
- Uğurlu, M., Gürses, A., Doğar, Ç., & Yalçın, M. (2008). The removal of lignin and phenol from paper mill effluents by electrocoagulation. *Journal of environmental management*, 87(3):420–428.
- Vähäkangas, K., Loikkanen, J., Sahlman, H., Karttunen, V., Repo, J., Sieppi, E., Kumm, M., Huuskonen, P., Myöhänen, K., Storvik, M., et al. (2019). Biomarkers of toxicity in human placenta. In *Biomarkers in Toxicology*, pages 303–339. Elsevier.
- van Rensburg, G. J., Bervoets, L., Smit, N. J., Wepener, V., & Van Vuren, J. (2020). Biomarker responses in the freshwater shrimp *caridina nilotica* as indicators of persistent pollutant exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 104(2):193–199.
- Vázquez-Gómez, G., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sosa, M., Petrosyan, P., & Rubio-Lightbourn, J. (2018). Benzo [a] pyrene activates an ahr/src/erk axis that contributes to cyp1a1 induction and stable dna adducts formation in lung cells. *Toxicology letters*, 289:54–62.

- Videla, S. & Diez, C. (1997). Experiences of wastewater treatment in Chilean forest industry. *Water Science and Technology*, 35(2-3):221–226.
- Vineis, P. & Perera, F. (2000). Dna adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. *International journal of cancer*, 88(3):325–328.
- Walsh, A. A., Szklarz, G. D., & Scott, E. E. (2013). Human cytochrome p450 1a1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18):12932–12943.
- Wang, Y., Pan, T., Li, L., Wang, H., Zhang, D., & Yang, H. (2018). Benzo (a) pyrene promotes hep-g2 cell migration and invasion by upregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression. *Oncology letters*, 15(6):8325–8332.
- Wang, Y., Zhai, W., Wang, H., Xia, X., & Zhang, C. (2015). Benzo (a) pyrene promotes a549 cell migration and invasion through up-regulating twist. *Archives of toxicology*, 89(3):451–458.
- Zender, J., Stuthridge, T., Langdon, A., Wilkins, A., Mackie, K., & McFarlane, P. (1994). Removal and transformation of resin acids during secondary treatment at a New Zealand bleached kraft pulp and paper mill. *Water Science and Technology*, 29(5-6):105–121.

