



FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA

Evaluación de genotoxicidad de nanopartículas de carbón usando células V79

Presenta:

Julian David Rodríguez Tapia

Tutor:

PhD. Grethel León Mejía

Cotutor

MsC. Álvaro Miranda Guevara

Trabajo de investigación

30/10/23

BARRANQUILLA, ATLÁNTICO

COLOMBIA



RESUMEN

La exposición crónica al material particulado derivado de la actividad minera se asocia con graves consecuencias clínicas. Los estudios han vinculado esta exposición con neumoconiosis, bronquitis crónica, enfisema, fibrosis y cáncer pulmonar en mineros de carbón, además de alteraciones en parámetros biológicos en las poblaciones aledañas. Sin embargo, establecer una causalidad directa es complejo debido a múltiples variables características de los modelos de exposición crónica. En orden de explorar los efectos de la exposición a nanopartículas de carbón proveniente de una de las minas cercanas a La Loma-Cesar, el presente trabajo buscó caracterizar el contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) de las nanopartículas (NP) usando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) y se evaluaron los efectos de la exposición *in vitro* a diferentes concentraciones de NP en células de fibroblastos de pulmón de hámster chino (V79) usando el ensayo cometa alcalino y modificado con enzimas EndoIII y FPG. Dentro de los resultados obtenidos se destaca la presencia de HAPs en las NP tales como fluoranteno, naftaleno, antraceno, 7H-benzo[c]fluoreno, fenantreno, pireno, benceno[a]antraceno, criseno y algunos derivados alquilados. En el análisis de genotoxicidad de las NP sobre células V79 se encontró un efecto dosis-respuesta ante las concentraciones usadas. Estos datos respaldan la hipótesis de que las nanopartículas de carbón derivadas de la actividad minera tienen un impacto en la integridad genética y pueden llevar a muerte celular programada. Estos resultados pueden direccionar futuras investigaciones y estudios adicionales para profundizar en la comprensión de los efectos, los cuales sean punto de apoyo para explorar estrategias de mitigación o de reducción de los riesgos asociados con la exposición a nanopartículas de carbón.

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas de carbón, genotoxicidad, estrés oxidativo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, células V79.



ABSTRACT

Chronic exposure to particulate matter derived from mining activity is associated with serious clinical consequences. Studies have linked this exposure to pneumoconiosis, chronic bronchitis, emphysema, fibrosis, and lung cancer in coal miners, in addition to alterations in biological parameters in surrounding populations. However, establishing direct causality is complex due to multiple variables characteristic of chronic exposure models. In order to explore the effects of exposure to carbon nanoparticles from one of the mines near La Loma-Cesar, the present work sought to characterize the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of the nanoparticles (NP) using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) and the effects of in vitro exposure to different concentrations of NP in Chinese hamster lung fibroblast cells (V79) were evaluated using the alkaline comet assay and modified with EndoIII and FPG enzymes. Among the results obtained, the presence of PAHs in the NPs stands out, such as fluoranthene, naphthalene, anthracene, 7H-benzo[c]fluorene, phenanthrene, pyrene, benzene[a]anthracene, chrysene and some alkylated derivatives. In the genotoxicity analysis of the NPs on V79 cells, a dose-response effect was found with the concentrations used. These data support the hypothesis that carbon nanoparticles derived from mining activity have an impact on genetic integrity and can lead to programmed cell death. These results can direct future research and additional studies to deepen the understanding of the effects, which can serve as a basis for exploring mitigation or reduction strategies for the risks associated with exposure to carbon nanoparticles.

KEYWORDS: Carbon nanoparticles, genetic damage, oxidative stress, polycyclic aromatic hydrocarbons, mining activity, V79.

INTRODUCCIÓN

El carbón es un recurso natural no renovable muy importante en la economía mundial. De él se obtiene calor mediante combustión, lo que permite, entre otras cosas, generar electricidad y dar sustento a múltiples industrias a lo largo del mundo (1). Para extraer este mineral del suelo se han desarrollado múltiples técnicas, pero con impactos negativos en los recursos naturales. Entre estas técnicas, la minería a cielo abierto destaca por ser una de las más agresivas para el medio ambiente (2). En ella, los procesos de explotación, extracción y transporte del carbón se producen grandes cantidades de material particulado que luego es arrastrado por el viento, recorriendo largas distancias en el proceso (3). Este es un fenómeno complejo, cuya significancia yace en la concentración de partículas que se mantienen suspendidas en el aire y las reacciones fotoquímicas que tienen lugar en él. Ello depende tanto de las características fisicoquímicas de la partícula *per se* cómo de las condiciones atmosféricas del área en cuestión, que incluyen la velocidad y dirección del viento, humedad, cantidad de precipitaciones (lluvia), entre otros aspectos (4). En cualquier caso, una vez levantadas, las partículas más pesadas pueden caer en el suelo, sobre fuentes de agua y vegetación en áreas alejadas de su punto de origen, mientras que las más pequeñas pueden permanecer suspendidas en el aire, en donde terminan siendo respiradas por la fauna y los habitantes de áreas circundantes [11] (5) (6).

Los efectos de estas partículas dependen de dos aspectos: el tamaño de la partícula y la estructura química. El tamaño está relacionado con el radio medio de las partículas en una suspensión (medido en micrómetros), aspecto que no solo condiciona su capacidad para transportarse a través del viento, sino que también juega un papel crucial en la deposición de la partícula en el sistema respiratorio. Así, aunque existan partículas de tamaños variables suspendidas en el aire, se consideran de importancia clínica y ambiental aquellas con PM_{10} , $PM_{2.5-10}$ (denominadas “gruesas”), $PM_{<2.5}$ (denominadas “finas”), y nanopartículas (o ultrafinas, con $PM_{<0.1}$, es decir, <100 nm) (7)(8). Las $PM_{2.5-10}$ tras ser inhaladas tienden a depositarse en las vías aéreas superiores; algunas de éstas pueden ser removidas por procesos mecánicos como tos o estornudo, y otras pueden provocar obstrucción respiratoria. Las partículas finas pueden alojarse en las vías aéreas inferiores y los alveolos (9). Las nanopartículas por su parte son especialmente peligrosas debido a que el conocimiento de su efecto en el ser humano aún es escaso. Aun con ello, la preocupación por los posibles efectos adversos para la salud por el contacto con los nanomateriales se ha elevado en los últimos 10 años (10), debido a que diferentes estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo* en animales y cultivos celulares han evidenciado que estos presentan, a esa escala, propiedades biológicas diferentes que a escala micrométrica, entre estas se encuentran que son más fáciles de ser translocadas hacia órganos secundarios (11) (12) (13), inadecuada eliminación por parte de los macrófagos (14), pueden ser transportadas a través de los axones de las neuronas sensoriales (15) y,

además, que pueden acceder a las estructuras intracelulares tales como las mitocondrias y núcleos (16).

Ahora bien, la estructura y composición química del material particulado depende en gran medida de las características del yacimiento carbonífero. Múltiples estudios en varios yacimientos han encontrado los siguientes componentes en común: carbono, oxígeno, potasio, silicio, sulfuro, y cloro como los principales (17), estructuras hechas de carbono orgánico en configuraciones irregulares altamente heterogéneas, con contenido de HAPs, (18) (19) (20), además de metales como el hierro, zinc, níquel, plomo, cadmio, cobre, magnesio, aluminio, titanio, entre otros (21) (22) (23) (24). Analizando específicamente cada uno de los componentes, los HAPs están conformados químicamente por 2 o más anillos aromáticos, y pueden originarse directamente de yacimientos de carbón, o bien a partir de la combustión incompleta de combustibles fósiles (25) (26). Además de los anillos de carbono, los HAPs también pueden contener hidrógeno y, en algunos casos, átomos de oxígeno, nitrógeno y otros elementos. Los HAPs pueden tener una amplia gama de tamaños y estructuras, y se clasifican en base a la cantidad de anillos de carbono en su estructura. Los HAPs son considerados contaminantes de gran interés ambiental y clínico debido a la fuerte relación que existe entre la exposición a ellos y el riesgo de cáncer en humanos. Tal es la evidencia científica y clínica, que la Agencia de Protección Ambiental estadounidense (EPA) ha enlistado 16 de ellos como contaminantes de gran prioridad debido a su toxicidad para organismos vivos, y su alta estabilidad y persistencia en el medio ambiente. Entre estos están: naftaleno (NAP), acenaftileno (ACY), acenafteno (ACE), fluoreno (FLU), fenantreno (PHEN), antraceno (ANTH), fluoranteno (FLTH), pireno (PYR), benzo[a]antraceno (B[a]A), criseno (CHRY), benzo[b]fluoranteno (B[b]F), benzo[k]fluoranteno (B[k]F), benzo[a]pireno (B[a]P), benzo[g,h,i]perileno (B[ghi]P), indeno[1,2,3-c,d]pireno (IND) y dibenzo[a,h]antraceno (D[ah]A). Según la Agencia Internacional de Investigación sobre cáncer (IARC), de los anteriores, el benzo[a]pireno se clasifica como carcinógeno para humanos (grupo 1), mientras que el naftaleno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-c,d]pireno se consideran como posibles carcinógenos para humanos (grupo 2B) [12].

Este potencial carcinogénico no es igual para todos los HAPs mencionados debido a que está dado por la forma en la que la molécula interactúa con el organismo expuesto a nivel celular, aunque por norma general, requiere interacciones enzimáticas que producen metabolitos activos capaces de interactuar con el ADN directamente (27). Una vez se han producido los metabolitos activos del HAP, estos pueden interactuar con el ADN de diversas maneras: a través de unión covalente directa (formando un aducto) (28); a través de la interrupción de mecanismos necesarios para la reparación; alterando indirectamente al ADN en formas que afectan la transcripción (29); induciendo la producción de aberraciones cromosómicas, hecho que puede ocurrir bien con la alteración de la maquinaria de microtúbulos responsables de la distribución equitativa de cromosomas (agentes aneugénicos), o a través de la ruptura y/o delección de material genético (agentes clastogénicos) (30), entre muchos otros. El Benzo[a]pireno, por ejemplo, debe su gran carcinogenicidad a la capacidad de los epóxidos de benzo[a]pirenodiol derivados de su

procesamiento enzimático para formar aductos con el ADN. Este fenómeno provoca mutaciones que terminan por causar fallas en la transcripción de proteínas importantes para la supresión de tumores (principalmente TP53), así como en proto-oncogenes que a la larga inducen la interrupción de la maquinaria de reparación del ADN, lo que termina con la aparición de células cancerosas (31). Por otro lado, los metales son capaces de dañar las células catalizando la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en solución acuosa, a través de las reacciones de Fenton y Haber Weiss (32). Estas ERO (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ion hidroxilo) tienen una naturaleza altamente reactiva, lo que los lleva a buscar estabilidad tomando electrones de cualquier compuesto químico circundante. En conjunto, los componentes del material particulado derivado de la actividad minera tienen el potencial de inducir daños considerables a células y tejidos vivos.

Con lo anterior en consideración, es razonable que la exposición crónica al material particulado derivado de la actividad minera pueda llevar a consecuencias clínicas importantes en los individuos afectados. En efecto, múltiples estudios han asociado la exposición a material particulado proveniente de minería a cielo abierto con afecciones clínicas complejas: la exposición ocupacional se considera como causal del desarrollo de neumoconiosis, bronquitis crónica, enfisema, fibrosis y cáncer pulmonar en mineros de carbón (33)(34)(35).

Ahora bien, estudios en áreas aledañas a zonas de extracción minera han reportado la alteración de parámetros biológicos en poblaciones humanas: Buttling et al (2021) y Ruktanonchai (2022) encontraron que la residencia de mujeres embarazadas cerca de una mina a cielo abierto activa ubicada en la región de los Apalaches centrales durante la gestación aumentó la posibilidad de parto prematuro (PTB) y bajo peso al nacer (LBW) debido, al menos parcialmente, a la exposición a material particulado derivado de la actividad minera (36) (37). Hendryx, M & Entwistle (2015) reportaron que residentes que vivían cerca de una mina a cielo abierto ubicada en el este de los Estados Unidos tenían valores de proteína C reactiva significativamente elevados en comparación con controles (con media ajustada = 4,9 mg/L en el grupo expuesto y 0,9 mg/L en el grupo control, $p < 0,03$). Los residentes expuestos también reportaron significativamente más enfermedades cardiopulmonares y más síntomas de enfermedad. Además, cuando se analizó los recuentos de partículas en rango respirable ($0.5\mu\text{m} - 5.0\mu\text{m}$), se encontró una cantidad significativamente mayor tanto dentro de los hogares como al aire libre en las ubicaciones cerca de minas (38). León-Mejía et al (2011, 2014) encontraron una relación significativa entre la exposición a material particulado proveniente de la explotación minera y biomarcadores de daño al ADN en trabajadores mineros de La Guajira, Colombia (39) (40). Ávila Júnior et al (2009) realizaron un estudio en Lauro Müller, un municipio brasileño del estado de Santa Catarina. En este, evaluaron la actividad de múltiples marcadores de estrés oxidativo, entre ellos TBARS, marcadores de peroxidación lipídica; TG, glutatión total; GSH, glutatión reducido; y GST, glutatión s-transferasa, en trabajadores de la mina, residentes de áreas aledañas a esta y controles no expuestos. Entre sus resultados más reveladores, encontraron que los trabajadores directa e indirectamente expuestos, así

como los sujetos que vivían en las proximidades de la planta minera de carbón, tenían niveles elevados de TBARS en plasma y niveles reducidos de TG y GSH en sangre total en comparación con los controles, lo que soporta la conclusión de que la exposición a material particulado de la minería de carbón conlleva a estrés oxidativo en el organismo (41).

En Colombia, las actividades de extracción de carbón a cielo abierto son especialmente prominentes en la Guajira y el Cesar (42). En este último departamento, varias comunidades habitan cerca a esas zonas, generando un ambiente económico y social que gira en torno a esta práctica. Entre estas comunidades se encuentra La loma, un corregimiento del Paso-Cesar. Este corregimiento se encuentra ubicado en las inmediaciones de un área de explotación minera de carbón a cielo abierto con gran importancia económica en la región, que lleva operando desde el año 1990 bajo la administración de la empresa Drummond LTD (43). En lo corrido de los últimos años, estudios en la comunidad han evidenciado alteraciones de parámetros biológicos en seres vivos que habitan la zona; como por ejemplo Guerrero-castilla et al, (2014) hallaron altas concentraciones hepáticas de cobre y Zinc, así como el aumento de la transcripción de genes asociados con el estrés oxidativo y el daño genético en ratones obtenidos de casas ubicadas en el área minera (44). En humanos, investigaciones han observado alteraciones diferentes biomarcadores de los habitantes de la zona; como lo descrito en el estudio de León Mejía et al (2023) en el que se analizó el citoma de micronúcleo con bloqueo de citocinesis (CBMN-Cyt) y el citoma de micronúcleo bucal (BM-Cyt), encontrando diferencias significativas asociadas a cito y genotoxicidad entre el grupo de individuos expuestos de la Loma- Cesar y el grupo control (sin exposición a carbón). De manera adicional, reportaron un incremento significativo en la concentración de bases de ADN/ARN, creatinina, polisacáridos y ácidos grasos en la orina (45). En otro estudio, León-Mejía et al (2023) reportaron que individuos expuestos en el área minera tenían concentraciones significativas de aluminio, azufre, cromo, hierro y cobre en la sangre, así como hipopotasemia (46). Finalmente, Miranda-Guevara et al (2023) realizaron un estudio en el que reportaron que individuos expuestos al material particulado del área durante más de 10 años evidenciaron telómeros significativamente más cortos y niveles significativamente más altos de daño directo al ADN y daño generado por estrés oxidativo comparado con los controles. De manera adicional, al analizar muestras de orina de los individuos expuestos, los autores detectaron concentraciones significativamente mayores de sodio (Na), fósforo (P), azufre (S), cloro (Cl), potasio (K), hierro (Fe), zinc (Zn) y bromo (Br) en comparación con el grupo de control (47).

A pesar de que la evidencia mencionada sugiera una correlación innegable, aún resulta difícil apuntar directamente al material particulado derivado de la actividad minera como agente causal de las anomalías genéticas reportadas en la Loma-Cesar, debido a la cantidad de variables y complejidad que involucran los estudios con seres vivos. Por este motivo, los estudios *in vitro* ofrecen la posibilidad de aportar datos fiables sobre los efectos de la exposición a agentes químicos en las células bajo condiciones de tiempo y concentraciones controladas (48). Para lograrlo en las condiciones particulares planteadas, múltiples parámetros deben ser estudiados: en primera instancia, es

necesario aislar nanopartículas derivadas del carbón de la mina alemana a la zona de estudio. Estas nanopartículas deben ser un reflejo de aquellas producidas de forma natural, a las que se expone las poblaciones humanas estudiadas. En segundo lugar, es necesario caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas extraídas: su contenido en metales, HAP y PM, dado que estas variables condicionan directamente el daño que pueden ser capaces de provocarle a organismos vivos.

Con estos datos, el siguiente paso es probar su toxicidad en ambientes controlados. Esto es posible a través del uso de linajes celulares estandarizados y medios de cultivo especiales que inducen su proliferación y estabilidad celular. De entre los linajes celulares disponibles en investigación, las células de fibroblastos de pulmón de hámster chino (V79) son de las más utilizadas. Estas células son ideales para su uso en estudios de exposición debido a su relativa facilidad de cultivo, poseer un cariotipo estable y una alta tasa de proliferación, lo que permite ensayos rápidos y confiables. Respecto a esto, investigaciones previas ya han hecho uso satisfactorio de este linaje en el estudio de daño cito y genotóxico de múltiples agentes, entre ellos, el material particulado proveniente de minas de carbón (47)(49)(50)(51)(52).

Para poder establecer correlaciones significativas entre la exposición a un agente y el daño derivado de dicha exposición en sistemas biológicos, se hace uso de biomarcadores que permitan evaluar alteraciones en la actividad biológica de los individuos expuestos a agentes particulares con relación a individuos control. La naturaleza de estas técnicas determina el parámetro biológico a evaluar, así como las conclusiones que se pueden obtener de ellos. El ensayo cometa (también conocido como electroforesis de células individuales) es una técnica que permite la evaluación cuantitativa de las rupturas de hebra simple o de doble cadena en el ADN a través de la migración de fragmentos que se logra por una electroforesis y la posterior observación por microscopia de fluorescencia (53). Estas rupturas pueden ser causadas por agentes genotóxicos como productos químicos, radiación ultravioleta, estrés oxidativo, agentes genotóxicos, entre otros (54) (55). Cuando el ADN sufre dichas rupturas pierde su integridad, afectando la información que codifica. Esto desencadena que la maquinaria celular realice la reparación del daño o que conlleve a procesos de muerte celular programada (apoptosis), o a mutaciones peligrosas que al acumularse terminan por producir células cancerosas (56). Sin embargo, otros tipos de daño son menos evidentes: el daño oxidativo, por ejemplo, es resultado del ataque al ADN de moléculas altamente reactivas de entre las que destacan las ERO. Estas moléculas son capaces de oxidar componentes del ADN, afectando su integridad. La 8-oxoguanina es uno de los productos principales de la oxidación de las purinas, junto con las formamidopirimidinas, mientras que el 5-Hydroxyuracil representa el principal daño dirigido a las pirimidinas (57). El daño oxidativo es igual de preocupante que las rupturas dobles dado que puede inducir mutaciones y fallas de expresión de la información contenida en el ADN, hecho que, si no se repara correctamente termina por desencadenar mutaciones peligrosas capaces de inducir procesos de carcinogénesis (58). Para permitir la detección de este tipo de daño a través del ensayo cometa es necesario el uso de enzimas específicas (59). Estas enzimas son la endonucleasa III (ENDOIII) y



formamidopirimidina [fapy]-ADN glicosilasa (FPG), capaces de interactuar con pirimidinas y purinas oxidadas respectivamente.

La forma de explorar más a fondo las observaciones realizadas por el equipo de trabajo en la Loma-Cesar, se propuso utilizar las nanopartículas aisladas del carbón mineral de la zona minera para estudiar los efectos de la exposición en el linaje V79 a través del ensayo cometa alcalino y con enzimas ENDOIII y FPG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Células pertenecientes al linaje V79 se cultivaron como monocapa en cultivo continuo en botellas de cultivo celular de 25 cm² en medio DMEM suplementado con 5% suero fetal bovino termo-inactivado (SFB), y penicilina/estreptomicina 100 µg/ml. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Para realizar pase de células, se realizó retiro aséptico del medio de cultivo, con lavado posterior con ½ del volumen del medio en buffer fosfato salino estéril a 37°C. Posteriormente se añadió 1/10 del volumen del medio en tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) y se permitió actuar a la enzima durante 5 minutos a 37°C. Tras la tripsinización, se neutralizó con ½ del volumen final de medio en medio completo (DMEM+SFB+antibiótico) y se realizaron pasajes del volumen de medio con células desprendidas a matraces de cultivo, momento en el cual se completó con el otro ½ de volumen final de medio en medio completo.

Aislamiento, caracterización y suspensión de nanopartículas de carbón

Se siguieron los lineamientos de extracción por ácido nítrico planteados por Huang et al (2019) (60). Brevemente, 5 gramos de carbón mineral proveniente de la Loma-Cesar, fueron resuspendidos en ácido nítrico y dejados en agitación durante 24 horas. Posterior a esto, se centrifugó a 4300 revoluciones por minuto (RPM) durante 40 minutos y se recuperó el sobrenadante. Este sobrenadante fue centrifugado a 15000 RPM durante 1 hora. Luego, se recuperó el sobrenadante y se calentó a 100°C durante 24 horas. Las nanopartículas obtenidas (NP) fueron solubilizadas en medio DMEM + antibiótico sin suero fetal bovino con relación 2mg/1mL. Para controlar la esterilidad, la suspensión fue dejada bajo luz UV durante 30 minutos. El producto de este proceso fue utilizado en experimentos posteriores (47).

Siembra, exposición y aplicación del ensayo cometa

El ensayo del cometa alcalino se realizó según lo descrito por Singh et al. (1988) (61) con modificaciones planteadas por León mejía et al (2016) (49). Brevemente, se sembraron 3 x 10⁵ células V79 en cada pocillo de placas de 6 pocillos. Después de 24 h, cada pozo se preparó así: pozo 1, control negativo tratado con medio completo suplementado; pozo 2, células expuestas a 50 µg/mL de NP; Pozo 3, células expuestas a 100 µg/mL de NP; pozo 4, células expuestas a 300 µg/mL de NP; pozo 5, control positivo; pozo 6, control no

inoculado, solo con medio completo para vigilar esterilidad. Los pozos se incubaron durante 48 horas a condiciones descritas con anterioridad. Previo al final del tiempo de incubación, se trató el pozo 5 con 150 μ M H₂O₂ durante 1 h.

Después del tratamiento, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en el mismo medio completo usado durante la exposición. De esta suspensión, se mezclaron 20 μ l con 80 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0,75 %. Esta mezcla se colocó en un portaobjetos previamente recubierto con 1,5 % de agarosa de punto de fusión normal (NMA) procesada a 60 °C. Las capas de agarosa se cubrieron con un cubreobjetos y, después de solidificarse el gel, se retiraron los cubreobjetos. Los portaobjetos se sumergieron durante la noche en una solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, pH 10,0-10,5, 1 % con Triton X-100 al 1 % y DMSO al 10 % añadido en fresco) a 4 °C en la oscuridad. Posteriormente, los portaobjetos se colocaron durante 30 min en tampón alcalino a 4 °C (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM, pH >13) para desenrollar el ADN. La electroforesis alcalina se realizó durante 30 min a 25 V y 300 mA. Los geles fueron neutralizados con Tris 0,4 M (pH 7,5) con tres lavados de 5 min cada uno. Los geles se secaron a temperatura ambiente. Luego se enjuagaron los portaobjetos y se tiñeron con 20 μ l de tinte fluorescente SYBR safe (2 μ l/ml).

Los análisis de portaobjetos se realizaron mediante el uso de OpenComet version 3.0 (GPLv3). Se midió la genotoxicidad de 100 células (50 células de cada uno de los dos portaobjetos replicados por concentración) a través del porcentaje (%) de DNA en la cola, longitud de la cola y momento de Olive, parámetros que son ampliamente utilizados en el análisis estadístico del ensayo cometa dado que permiten cuantificar el daño: el %ADN en cola refiere a la proporción de ADN que migra desde el núcleo de la célula hacia la cola del cometa durante el ensayo, interpretado como la frecuencia de los cortes de doble cadena; el largo de cola representa la distancia que recorre el ADN en la cola del cometa, interpretable como el tamaño de los fragmentos producidos después del corte; y el momento olive, por su parte, es una medida que combina tanto el porcentaje de ADN en cola como el largo de la cola. Cuanto mayor sea el momento Olive, mayor será el daño genético. Este valor resulta considerablemente útil debido a que permite valorar tanto colas cortas con fracciones altas de ADN, como colas largas con fracciones bajas de ADN (62) (63).

Ensayo cometa modificado con EndoIII y FPG

El ensayo del cometa modificado siguió las modificaciones realizadas por León mejía et al (2016) (49). Brevemente, se incluyeron los mismos pasos del ensayo del cometa estándar hasta el paso de lisis celular. Después de este paso, los portaobjetos se retiraron de la solución de lisis y se lavaron tres veces con tampón de enzimas (HEPES 40 mM, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM, albúmina sérica bovina 0,2 mg/ml, pH 8,0), se escurrieron y se incubaron a 37°C en tampón enzimático suplementado con 60 μ L de FPG (solución de 1 μ g/mL) durante 45 min, EndoIII (solución de 1 μ g/mL) durante 30 min, y solución tampón de enzimas durante 30 min, a modo de control.

Cromatografía de gases y espectrometría de masas

La muestra de partículas de carbón (5 g) se sometió a una extracción Soxhlet con éter de petróleo/cloruro de metileno (1:1) durante 24 horas, según lo descrito en el método EPA 3540C (EPA 1996). El extracto se concentró, se fraccionó utilizando una columna de SiO₂ y se analizó mediante cromatografía de gases (utilizando una columna RTX-1MS de Restek) y espectrometría de masas (con 70 eV y un rango de m/z de 50-450 en modos de exploración completa/SIM). Las dimensiones de la columna capilar fueron de 30 m x 0.25 mm (ID) x 0.5 µm (df). El tamaño de grano de SiO₂ fue de 0.2-0.5 mm, con una temperatura de activación y tiempo de 100 °C y 24 horas. Los datos cromatográficos y espectroscópicos se procesaron utilizando el software Thermo Xcalibur™ (Versión 2.2 SP1.48, Thermo Fisher Scientific, Inc.) y AMDIS (Sistema de Desconvolución e Identificación Espectral Masiva Automatizada, Build 130.53, Versión 2.70). Las fracciones saturadas y aromáticas se separaron utilizando hexano y cloruro de metileno, respectivamente. La programación de la temperatura del horno del cromatógrafo de gases fue de 85 °C (1 minuto) a 310 °C (5 minutos) a una velocidad de 4 °C/minuto; relación de división: 5:1; temperatura del inyector: 250 °C. Se utilizó helio (99.999%) como gas portador, con una velocidad de flujo constante de 1.0 mL/minuto.

Los constituyentes orgánicos se identificaron y confirmaron comparando sus espectros de masas con los disponibles en bibliotecas espectrales y bases de datos como NIST11, NIST Retention Index y Wiley9. Además, se utilizaron mezclas estándar certificadas que incluían alcanos de C10 a C40 (ref. # 68281, Sigma Aldrich) y una mezcla de calibración de PHA (Mezcla de Calibración SV # 6/610 de PAHs, cat. # 31011, Restek) para fines de comparación y verificación. Además, se calcularon los índices de retención (RI) lineales de temperatura programada para cada componente y se utilizaron con fines de comparación con los RI reportados en la literatura existente (64), **(Datos in press)**.

RESULTADOS

Aislamiento de nanopartículas de carbón derivadas de material extraído de la mina

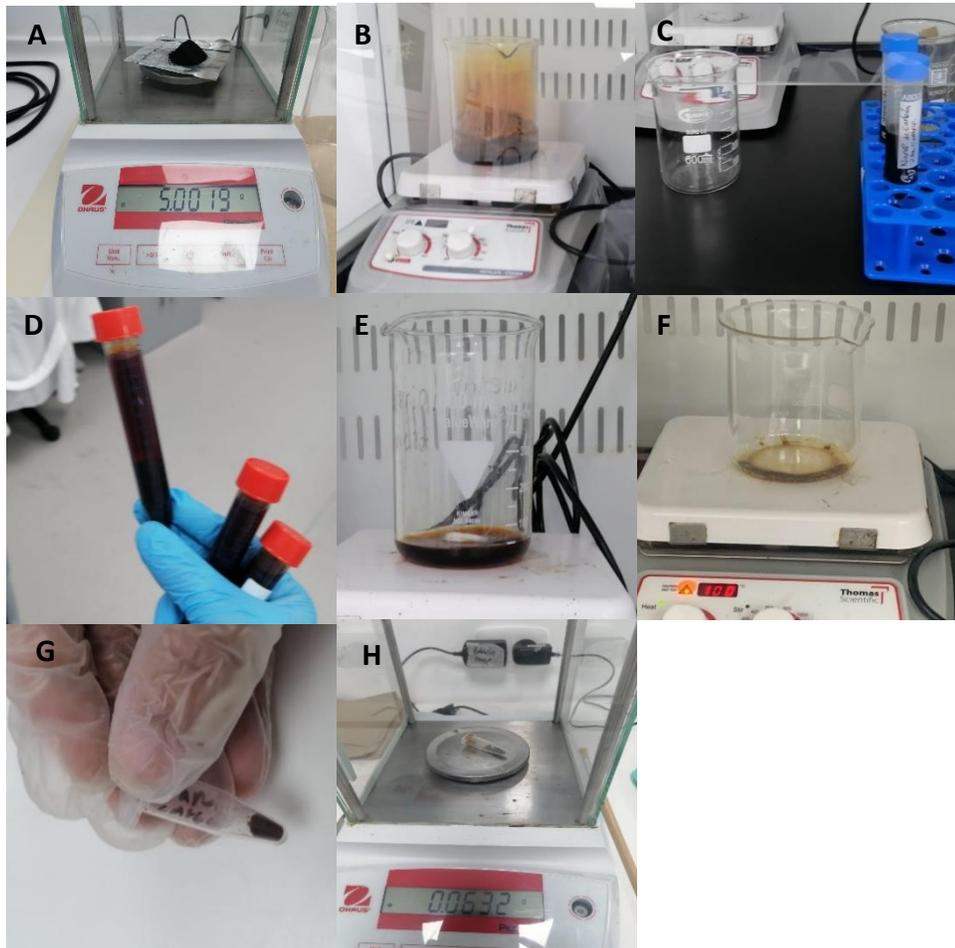


Figura 1: Mosaico que muestra el procesamiento y obtención de NP de carbón

A, pesaje del carbón; B, suspensión y homogenizado en ácido nítrico; C, resultado de primera centrifugación; D, resultado de segunda centrifugación; E, recuperación de sobrenadante de segunda centrifugación en beaker; F, resultado de calentado de sobrenadante a 100°C durante 24 horas; G, recuperación de nanopartículas total; H, pesado de nanopartículas obtenidas.

Evaluación del daño genotóxico en linaje V79 mediante el ensayo cometa alcalino y modificado

Los resultados obtenidos del ensayo cometa estándar y modificado con EndoIII y FPG mostraron un aumento concentración-dependiente de todos los parámetros evaluados,

destacando a la concentración de 300 ug/mL como la más genotóxica para el linaje celular pasadas 48 horas de exposición, con valores similarmente genotóxicos a los obtenidos en el control positivo con H₂O₂ (Figura 2).

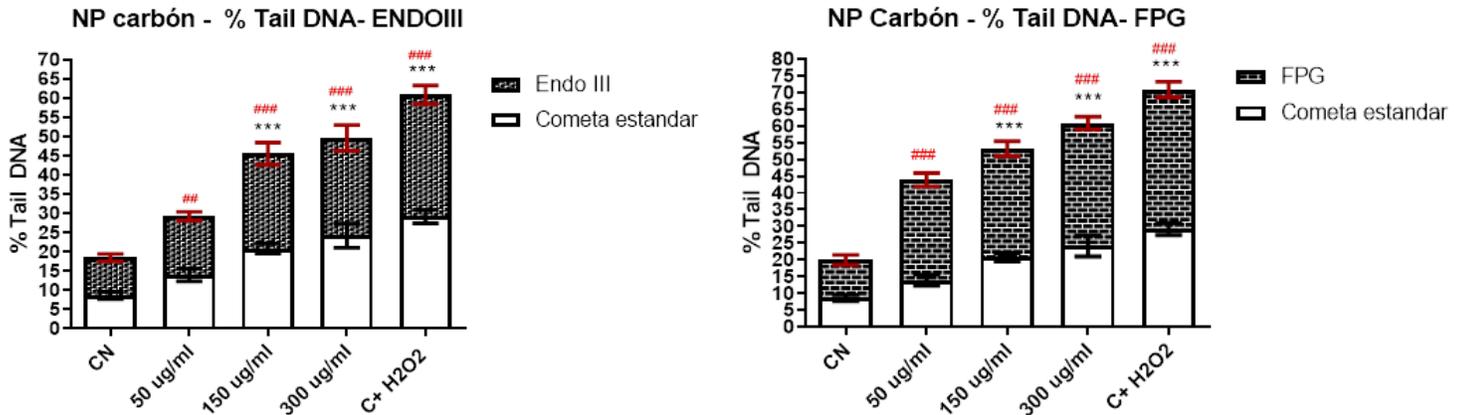


Figura 2. Porcentaje de DNA en la cola de los ensayos ENDOIII (derecha) y FPG (izquierda) comparados con el ensayo cometa alcalino estándar (en blanco). *Diferencia estadísticamente significativa con relación al control negativo (CN) ($P < 0,05$). # Diferencia significativa del aumento del daño oxidativo con relación al control negativo con EndoIII y FPG ($P < 0,05$). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar.

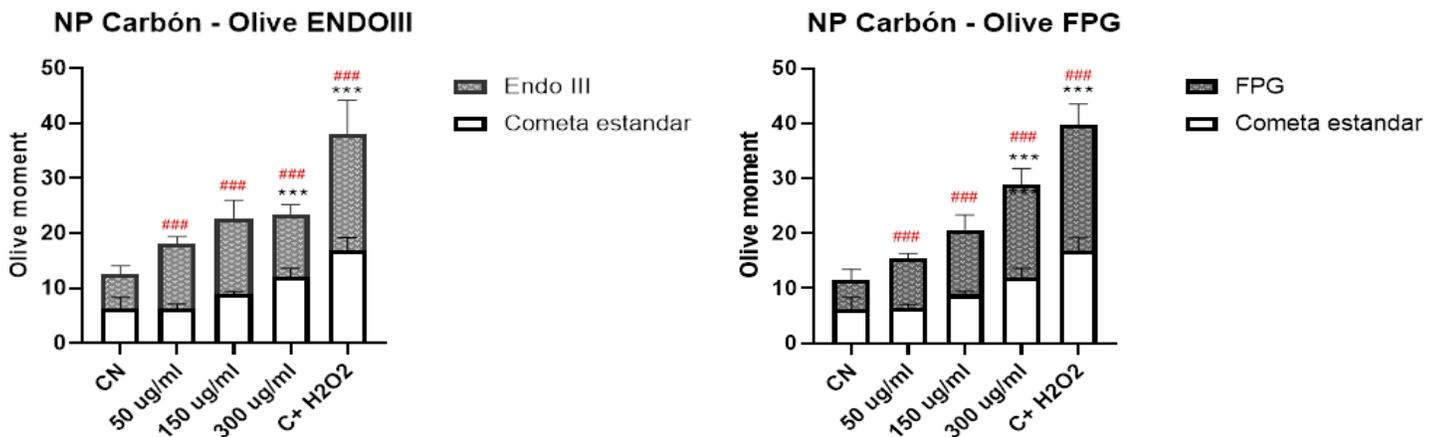


Figura 3. Parámetro momento de Olive usando ENDOIII (derecha) y FPG (izquierda) comparados con el ensayo cometa alcalino estándar (en blanco). *Diferencia estadísticamente significativa con relación al control negativo (CN) ($P < 0,05$). # Diferencia significativa del aumento del daño oxidativo con relación al control negativo con EndoIII y FPG ($P < 0,05$). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar.

Como es mostrado en la Figura 3, se encontró un aumento concentración- dependiente del momento Olive resultado de la exposición a las concentraciones evaluadas, observándose niveles más altos de daño oxidativo en la mayor concentración y en el control positivo. En el caso del cometa modificado con FPG, existió un aumento comparativamente mayor comparado con EndoIII.

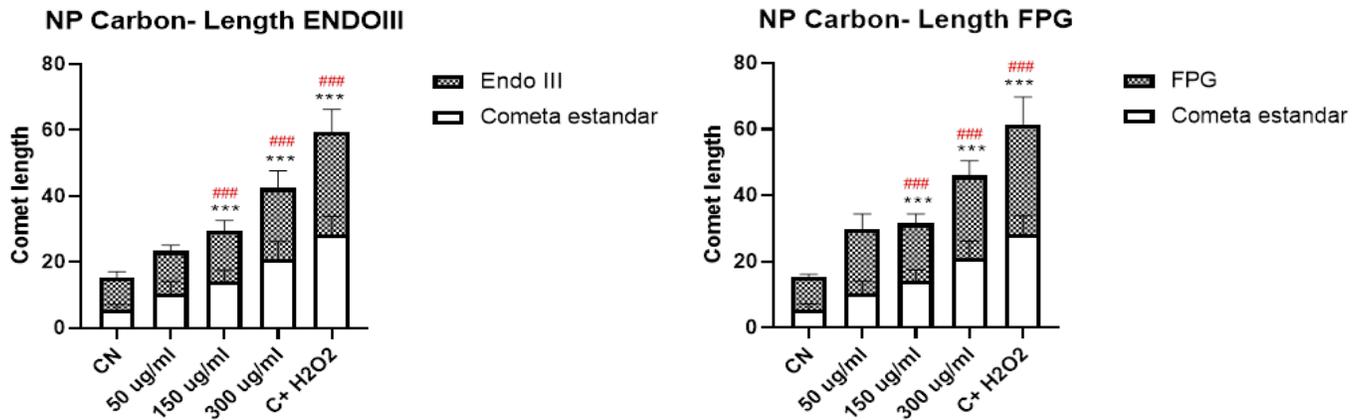


Figura 4. Longitud de la cola de los cometas obtenidos en los ensayos ENDOIII (derecha) y FPG (izquierda) comparados con el ensayo cometa alcalino estándar (en blanco). *Diferencia estadísticamente significativa con relación al control negativo (CN) ($P < 0,05$). # Diferencia significativa del aumento del daño oxidativo con relación al control negativo con EndoIII y FPG ($P < 0,05$). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar.

En la Figura 4 se analiza la longitud de la cola, se observa la misma tendencia de los otros parámetros analizados, significancia estadística en las concentraciones más altas.

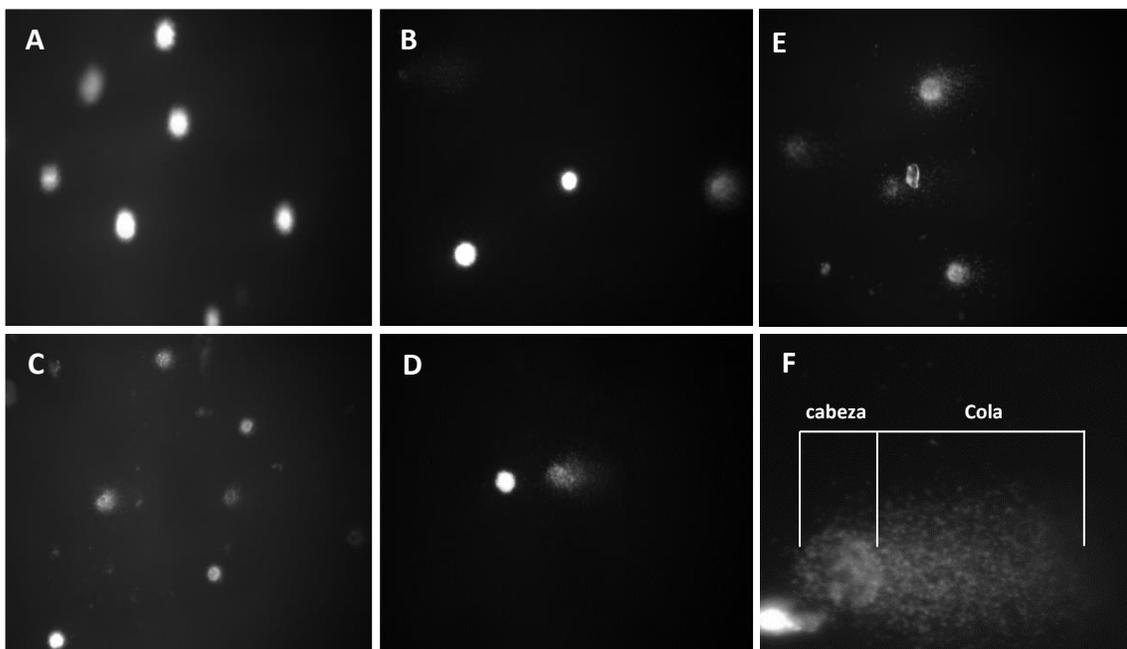


Figura 5. Mosaico de cometas observados en el microscopio de fluorescencia

A, cometas control negativo; B, cometas de concentración 50 µg/mL; C, cometas de concentración 150 µg/mL; D, cometas de concentración 300 µg/mL; E, cometas de control positivo; F, vista de cerca de un cometa que muestra daño considerable, con sus partes identificadas. Figura hecha por el autor.

Caracterización de HAPs de importancia clínica y medioambiental presentes en las nanopartículas de carbón por GC-MS

A partir del análisis de GC-MS (modo full scan) del extracto orgánico (rendimiento: 0.34%), se identificaron algunos constituyentes relevantes (CAP - Compuestos Aromáticos Policíclicos) junto con hidrocarburos lineales/ramificados y cíclicos C12-C31 (TIC en la Figura 6). El análisis reveló que el extracto total estaba compuesto principalmente por hidrocarburos lineales/ramificados (51.2%) junto con hidrocarburos mono-/bicíclicos (6.1%) e insaturados (5.1%). Además, un grupo diverso de componentes con diferentes características químicas contribuyó hasta un 24.0%, incluyendo un 4.2% de hidrocarburos tricíclicos tetracíclicos, un 3.4% de alquil-naftalenos, un 2.8% de hidrocarburos monoaromáticos alquilados y un 1.8% de hidrocarburos tricíclicos pentacíclicos/PAH y alquil-fenantrenos/antracenos. Otros componentes incluyeron aldehídos fenólicos (1.2%), cetonas alifáticas (1.1%), ésteres alifáticos (1.0%), cetonas monoaromáticas (0.9%), éteres alifáticos (0.6%) y compuestos alifáticos di-/trisulfuro/cetonas fenólicas (cada uno 0.5%). Además, el extracto contenía bifenilos/ésteres monoaromáticos (cada uno 0.4%), benzo[b]naftofuranos/aldehídos monoaromáticos/hidrocarburos monoaromáticos tetracíclicos (cada uno 0.3%) y aldehídos alifáticos/éteres monoaromáticos/PAH oxigenados/quinonas (0.2%). Finalmente, el extracto contenía naftalenos oxigenados (0.1%), pirenos alquilados (0.05%) y fenoles alquilados (0.04%).

A partir de la composición general descrita anteriormente, se resaltan: (i) el principal componente, además de los hidrocarburos lineales, fue 4,7-dimetil-1,2,3,4-tetrahidrocriceno (3.5%); (ii) se identificaron dos tipos de alquil-naftalenos: (a) naftalenos C1-C2 (1.0%), (b) naftalenos C3-C8 (2.4%); (iii) los hidrocarburos monoaromáticos alquilados identificados fueron de dos tipos: (a) bencenos C1-C5 (0.8%), (b) bencenos C6-C13 (2.0%); (iv) los hidrocarburos tricíclicos pentacíclicos derivados de octahidropiceno 1,2,3,4,4a,5,6,14b-octahidropiceno; (v) se identificaron ocho (siete son prioritarios) PAHs (pueden ser de origen natural/biogénico/diagenético o petrogénico): naftaleno/fluoranteno (cada uno 0.4%), antraceno/7H-benzo[c]fluoreno (cada uno 0.3%), fenantreno/pireno (cada uno 0.2%), benzo[a]antraceno (0.04%) y criseno (0.006%); (vi) los alquil-fenantrenos/antracenos sustituidos por alquil C1-C4; (vii) los aldehídos fenólicos estaban sustituidos por alquil C0-C2; (viii) las cetonas alifáticas C12-C18 fueron derivados de "2-ona"; (ix) la mayoría de las cetonas monoaromáticas estaban sustituidas por alquil-fenoles; (x) las cetonas fenólicas estaban sustituidas por alquil C1-C2; (xi) los bifenilos estaban sustituidos por alquil C0-C4; (xii) se identificaron tres isómeros de benzo[b]naftofuranos; (xiii) los aldehídos monoaromáticos estaban sustituidos por alquil; (xiv) los aldehídos alifáticos eran todos lineales; (xv) los PAH oxigenados se derivaron de

2H-fenantro[9,10-b]pirano; (xvi) y se identificó un alquil-pireno C1. En la Figura 7 se muestran los espectros de masas y las estructuras de cuatro de los PAHs más importantes identificados en el extracto de carbón: naftaleno, fenantreno, criseno y fluoranteno.

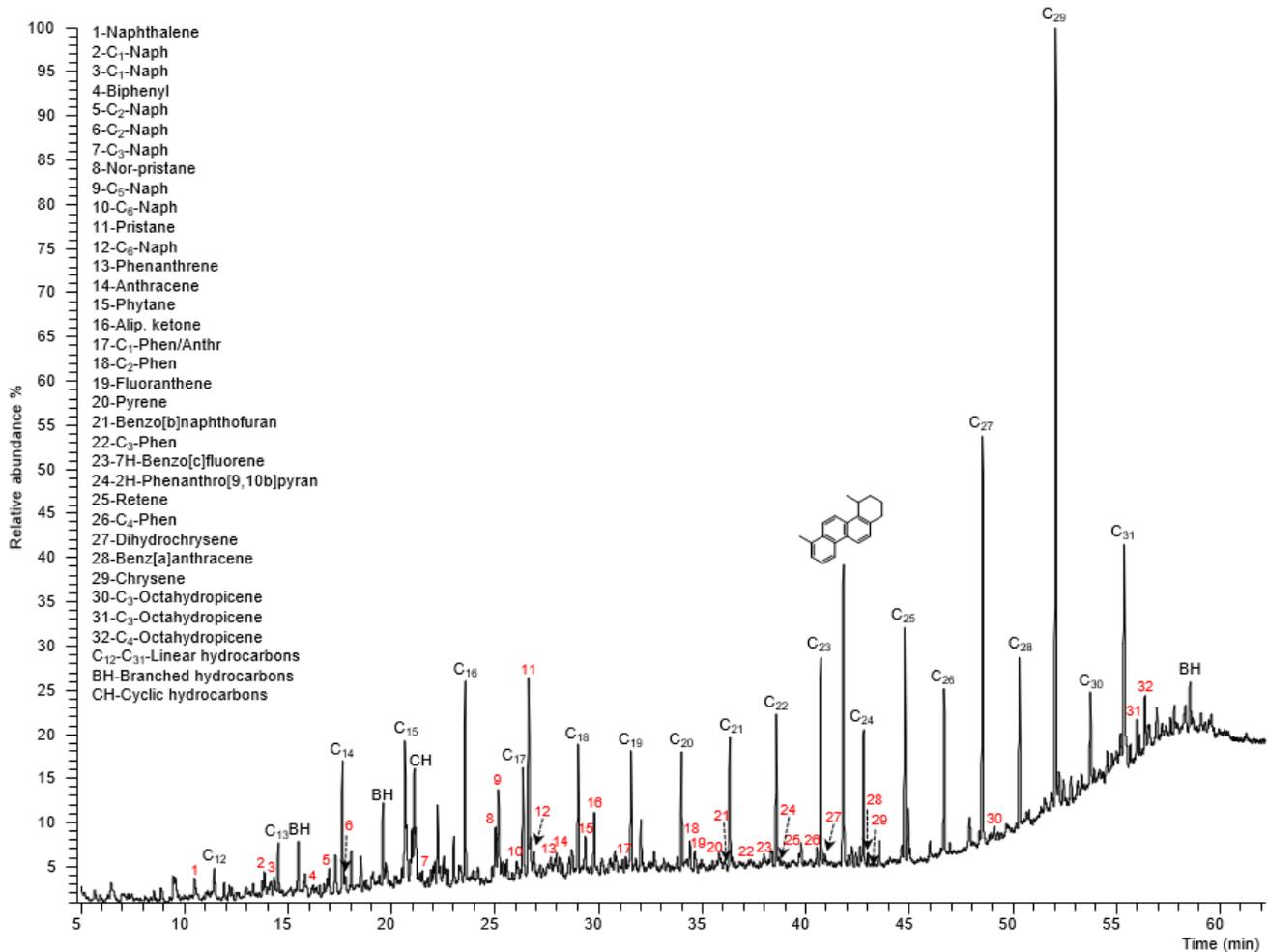


Figura 6. Perfil típico (corriente total de iones) obtenido por GC-MS (70eV, full scan) del extracto total de la muestra de carbón particulado. En la figura se incluyen los nombres de algunos constituyentes relevantes (enumerados según su orden de elución), junto con hidrocarburos lineales, ramificados y cíclicos de C12 a C31, que fueron los componentes principales.

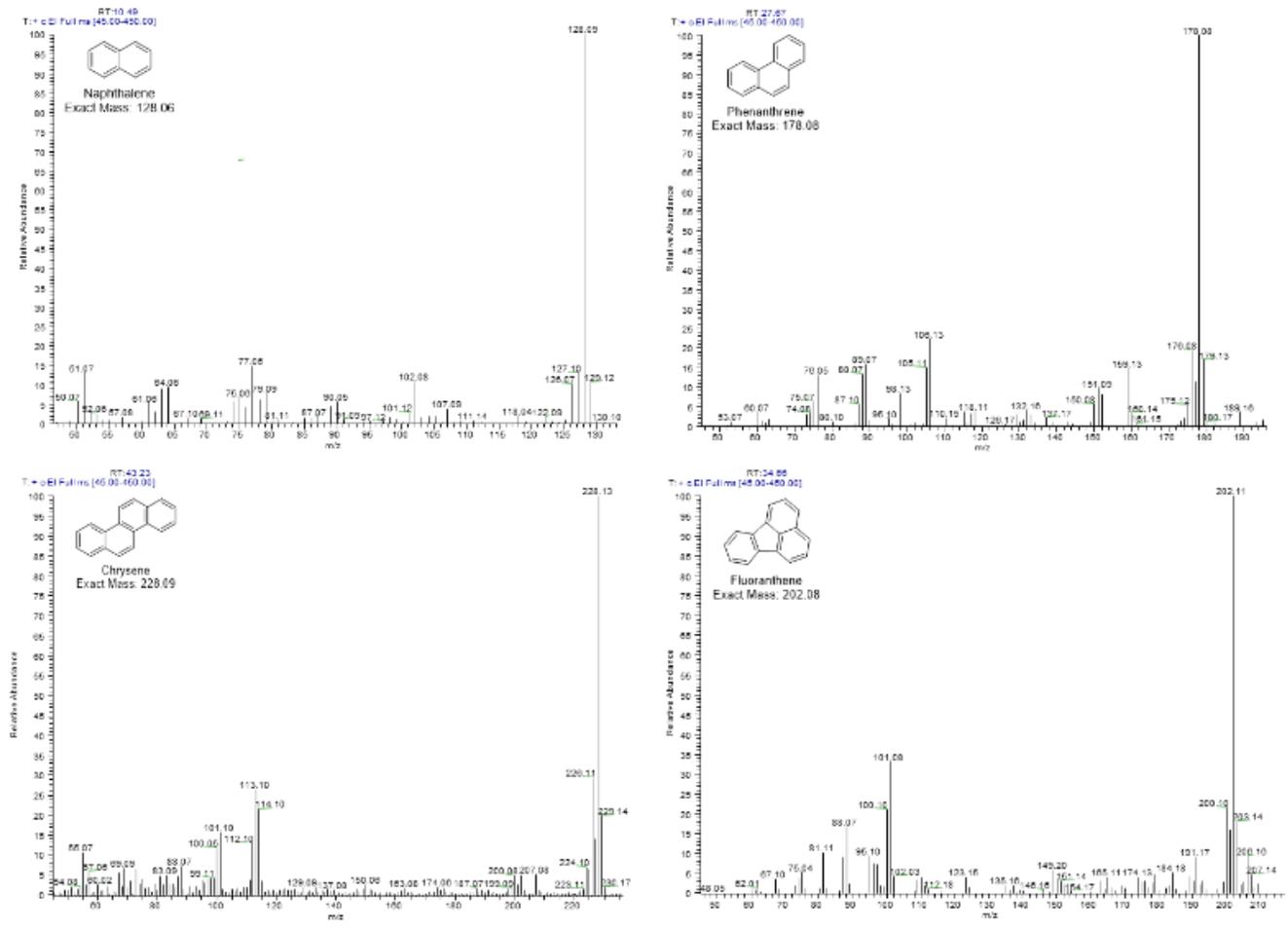


Figura 7. Espectro de masas obtenidos mediante GC-MS (full scan) de algunos compuestos aromáticos policíclicos encontrados en el extracto orgánico de la muestra de carbón.

DISCUSIÓN

El carbón es una fuente importante de energía en muchos países, sin embargo, su explotación puede ser perjudicial para los seres humanos y el medio ambiente debido a una serie de impactos negativos asociados con esta actividad. Varias investigaciones previas realizadas en el área han señalado la existencia de una relación entre el material particulado emitido durante las actividades de extracción de carbón derivadas de la actividad minera y la alteración de parámetros biológicos de individuos que habitan en las inmediaciones de esta. En el presente trabajo, y en concordancia con hallazgos anteriores, se encontró que la exposición *In vitro* del linaje celular V79 a las nanopartículas de carbón durante 48 horas se vio capaz de inducir rupturas en el ADN de manera concentración-dependiente, lo cual fue evidenciado tanto en el ensayo cometa estándar como en el modificado usando enzimas EndoIII y FPG.

En principio, el ensayo cometa alcalino no solo es capaz de medir daño directo en la forma de rupturas dobles, sino que, gracias a su componente alcalino, puede detectar daños en el ADN a nivel de rupturas simples y sitios alcali-lábiles, lugares en el ADN donde las bases nitrogenadas están dañadas o modificadas de tal manera que son susceptibles a la rotura cuando se expone a pH alcalinos. Esto puede ocurrir debido a la oxidación, la alquilación u otros procesos que afectan las bases del ADN, como el daño oxidativo [87]. Además, Las enzimas endonucleasa III (ENDOIII) y formamidopirimidina [fapy]-ADN glicosilasa (FPG) usadas en la versión modificada son capaces de interactuar con pirimidinas y purinas oxidadas respectivamente, produciendo más rupturas de cadena doble que luego se manifiestan en la electroforesis como más daño (53) (59). En suma, el aumento considerable de daño entre versiones del ensayo refleja de forma más significativa el daño total sufrido por la molécula durante el periodo de exposición de 48 horas. estos resultados de genotoxicidad pueden ser atribuidos a múltiples mecanismos de daño actuando en conjunto: cambio de la permeabilidad membranal; interrupción de la función mitocondrial; interrupción de la síntesis/actividad enzimática; daño oxidativo y rupturas/mutaciones/aductos en el ADN.

Para que las nanopartículas sean capaces de ingresar a la célula, primero deben atravesar la membrana citoplasmática, una estructura semipermeable compuesta a grandes rasgos por una bicapa lipídica, colesterol y proteínas constitutivas. En condiciones normales, esta membrana es semipermeable y requiere de transportadores para permitir el paso de estructuras químicas voluminosas de un lado a otro. Sin embargo, a la escala de $PM_{<2.5}$, las partículas se han visto capaces de difundir a través de la membrana sin la necesidad de la intervención de mecanismos de transporte activo o facilitado, aumentando la presencia de marcadores de daño de membrana (65); de esta forma pueden interactuar con las estructuras intracelulares, provocando todo tipo de daños: expresión al alza de proteínas proapoptóticas Bax, caspasa-3 y caspasa-8 y disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, disminución de viabilidad celular, daño a la membrana plasmática con consecuente fuga de contenidos intracelulares de entre los que destacan la lactato deshidrogenasa; entre otros (66) (67) (68). Para esta investigación, a través del uso de la

técnica de dispersión dinámica de luz, Miranda-Guevara et al (2023) determinaron que las nanopartículas extraídas de la Loma-Cesar usadas en este estudio poseen un tamaño medio de entre 20 y 40 nm (0.02 y 0.04 μm) (69). Ello implica que no son capaces de difundir a través de la membrana citoplasmática e ingresar al citosol (dando pie a la expresión de diferentes formas de daño), sino que también pueden ingresar al núcleo, lugar donde pueden causar daño directo al afectar directamente al material genético (70) (71).

En una caracterización del contenido de metales del material particulado originado de La Loma, León Mejía et al (2023) reportaron la presencia de cobre (Cu), aluminio (Al), cromo (Cr), silicio (Si) y de hierro (Fe) en las partículas. De estos elementos químicos, el hierro, cobre y cromo son catalizadores de la reacción de Fenton y haber Weiss (72) (73) (32). Las ERO derivadas de esta actividad catalítica dañan las células con las que tienen contacto al arrancarles electrones a estructuras como la bicapa lipídica (induciendo peroxidación lipídica), las proteínas (afectando su estructura tridimensional), al ADN (oxidando las purinas y pirimidinas), entre otros (74). A nivel del ADN, el principal mecanismo de daño tiene lugar mediante la oxidación de la guanina llevando a la formación de 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG). Esto ocurre porque la guanina, una de las cuatro bases nitrogenadas que componen el ADN, contiene un grupo amino en una posición particular que la hace más susceptible a la oxidación por ERO. El producto de esta oxidación es 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG), que puede llevar a errores en la replicación del ADN, dada la tendencia que tiene por emparejarse incorrectamente con adenina en lugar de citosina, provocando alteraciones de código que llevan a cambios considerables en la expresión y funcionalidad de proteínas (75) y consecuentemente llevar a procesos de carcinogenicidad. Esta propensión de la guanina a la oxidación puede explicar los resultados obtenidos en este estudio, en el cual se evidencian valores del ensayo con FPG comparativamente más altos que los resultados para EndoIII.

Para considerar el daño producido por los HAPs, es necesario abordar que su toxicidad puede provenir bien de los metabolitos producidos tras la interacción del HAP con enzimas de fase 1 que hidrolizan, reducen y/o oxidan la molécula exógena, o bien de las interacciones directas que puedan tener los HAPs y componentes celulares. En el primer caso, la producción de metabolitos puede ocurrir a través de tres vías principales: i. la formación de HAP-o-quinonas mediante oxidación catalizada por dihidrodiol deshidrogenasas; ii. la formación de un catión radical HAP en un proceso de oxidación metabólica que involucra la peroxidasa del citocromo P450 y; iii. la creación de epóxidos de dihidrodiol, catalizada por enzimas del citocromo P450 (66,76) (77). Para estudiar las consecuencias del metabolismo se ha optado por el uso de linajes celulares hepáticos o por la modificación genética de linajes para introducirles el gen de la p450 humana, e incluso por la exposición a los metabolitos directamente (78). Debido al hecho de que el linaje V79 no expresa citocromos p450 reportados, este se ve incapaz de metabolizar los HAPs a sus formas activas por las rutas mencionadas de una forma que resulte significativa para considerarlos como causales del daño observado en los resultados (79). Sin embargo, sí que es posible asociarlos con las observaciones realizadas por León-Mejía et al (45) (46) en las poblaciones humanas de estudio, puesto que la actividad hepática podría dar pie

para la producción de los metabolitos a partir de HAPs introducidos al torrente sanguíneo transportados en $PM_{<1}$, aunque se requiere investigaciones posteriores que validen este razonamiento. En cualquier caso, lo anterior implica que los resultados obtenidos involucran mecanismos de daño provocados directamente por la interacción HAP-célula. En el presente trabajo se logró identificar en las nanopartículas varios HAPs en los que destacan: fluoranteno, naftaleno, antraceno, 7H-benzo[c]fluoreno, fenantreno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno y algunos derivados de alquilo. Sin necesidad de activación enzimática, se ha visto que algunos son capaces de dañar estructuras celulares: el naftaleno y el fenantreno pueden inducir daño celular directo al afectar el funcionamiento de la mitocondria, un organelo responsable no solo de la producción de energía en forma de ATP, sino que también de la regulación de la apoptosis por vía intrínseca. El naftaleno, el más prominente de ambos, lo hace (presumiblemente) al interferir directamente con la coenzima Q_{10} , y a nivel general, con la cadena de transporte de electrones vía inhibición de la actividad enzimática dependiente de NADH (80)(81); el fenantreno es menos citotóxico debido a su baja solubilidad, pero también se ha involucrado en procesos de daño mitocondrial (82). El antraceno, por su parte, se ha visto capaz de interferir con la actividad de la catalasa, una enzima importante en el control del daño oxidativo provocado por ERO, al interactuar químicamente con ella (83).

Así, la suma de los componentes genotóxicos discutidos con el tamaño y las capacidades que dicha característica fisicoquímica confieren a la nanopartícula, brindan una base teórica a partir de la cual se puede fundamentar sus efectos *in vitro*. Sin embargo, fenómenos como la metabolización y los sistemas de detoxificación aun resultan elusivos y, por tanto, difíciles de abordar. Para lograr una comprensión más amplia de los riesgos asociados con la exposición a las nanopartículas de carbón, será esencial investigar en detalle cómo estas partículas son metabolizadas en el organismo y cómo los sistemas de detoxificación responden a su presencia. Esto implica explorar los posibles metabolitos que se generan a partir de las nanopartículas y cómo pueden influir en los efectos observados para, en última instancia, analizar los mecanismos celulares de defensa y reparación que entran en juego en respuesta al daño causado por las nanopartículas, fundamental para el desarrollo de estrategias de prevención y mitigación que protejan la salud pública y el ecosistema en general.



CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se logró establecer una relación entre la exposición del linaje celular V79 a nanopartículas derivadas de La Loma-Cesar, y la generación de daño genotóxico directo y mediado por estrés oxidativo de forma concentración-dependiente durante el tiempo evaluado que, junto con la caracterización de la presencia de HAPs y los metales detectados por investigaciones previas permiten fundamentar con mayor solidez la correlación entre la exposición crónica al material particulado y las alteraciones de parámetros biológicos observados en la comunidad de La Loma-Cesar. Además, permite plantear mecanismos celulares capaces de explicar, al menos en parte, el daño observado, atribuyéndolo a las alteraciones en la permeabilidad membranal, interrupción de la función mitocondrial, interrupción de la actividad enzimática, así como rupturas, lesiones y formación de aductos en el ADN provocados directa o indirectamente por las nanopartículas de carbón. Estos datos subrayan la importancia de abordar problemáticas desde una perspectiva de salud pública y medio ambiente. Se necesitan investigaciones adicionales para comprender completamente la extensión de los efectos en humanos y las posibles medidas de mitigación en la zona.

REFERENCIAS

1. Balat M. Coal in the Global Energy Scene. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy*. 2009 Dec 28;5(1):50-62.
2. Lien L. Advances in coal mining technology. In: *The Coal Handbook: Towards Cleaner Production*. Elsevier; 2013. p. 193-225.
3. Sahu SP, Yadav M, Rani N, Das AJ. Assessment of occupational health exposure to particulate matter around opencast coal mines, India: a case study. *Arabian Journal of Geosciences*. 2018 Jul 12;11(14):373.
4. Arregocés HA, Rojano R, Restrepo G. Meteorological factors contributing to organic and elemental carbon concentrations in PM10 near an open-pit coal mine. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022 Apr 6;29(19):28854-65.
5. Yang Y, Ligouis B, Pies C, Grathwohl P, Hofmann T. Occurrence of coal and coal-derived particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a river floodplain soil. *Environmental Pollution*. 2008 Jan;151(1):121-9.
6. Sun L, Liao X, Yan X, Zhu G, Ma D. Evaluation of heavy metal and polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in plants from typical industrial sites: potential candidate in phytoremediation for co-contamination. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014 Nov 20;21(21):12494-504.
7. Kwon HS, Ryu MH, Carlsten C. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Exp Mol Med*. 2020 Mar 17;52(3):318-28.
8. Environmental Protection Agency. *Air Quality Criteria for Particulate Matter (Final Report, 2004)*. Vol. EPA 600. 2004.
9. Larionov A, Volobaev V, Zverev A, Vdovina E, Bach S, Schetnikova E, et al. Chemical Composition and Toxicity of PM10 and PM0.1 Samples near Open-Pit Mines and Coal Power Stations. *Life*. 2022 Jul 13;12(7):1047.
10. Pietroiusti A. Health implications of engineered nanomaterials. *Nanoscale*. 2012;4(4):1231.
11. Brugge D, Durant JL, Rioux C. Near-highway pollutants in motor vehicle exhaust: A review of epidemiologic evidence of cardiac and pulmonary health risks. *Environmental Health*. 2007 Dec 9;6(1):23.
12. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol*. 2004 Jan;16(6-7):437-45.
13. Terzano C, Di Stefano F, Conti V, Graziani E, Petroianni A. Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010 Oct;14(10):809-21.

14. Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. Impairment of Alveolar Macrophage Phagocytosis by Ultrafine Particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001 Apr;172(2):119-27.
15. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. 2005 Jul;113(7):823-39.
16. Blamey Benavides X, Mosquera E, Díaz F. Estudio exploratorio II: Identificación de nanopartículas en procesos industriales de soldadura y de minería. *Ciencia & trabajo*. 2016;18(55):28-36.
17. Huertas JI, Huertas ME, Solís DA. Characterization of airborne particles in an open pit mining region. *Science of The Total Environment*. 2012 Apr;423:39-46.
18. Ren M, Zheng L, Hu J, Chen X, Zhang Y, Dong X, et al. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil in a coal mining area, East China: Spatial distribution, sources, and carcinogenic risk assessment. *Front Earth Sci (Lausanne)*. 2022 Oct 31;10.
19. Mastro RE, Singh MK, Rout TK, Kumar A, Kumar S, George J, et al. Health risks from PAHs and potentially toxic elements in street dust of a coal mining area in India. *Environ Geochem Health*. 2019 Oct 4;41(5):1923-37.
20. Wu D, Wang Z, Chen J, Kong S, Fu X, Deng H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in atmospheric PM_{2.5} and PM₁₀ at a coal-based industrial city: Implication for PAH control at industrial agglomeration regions, China. *Atmos Res*. 2014 Nov;149:217-29.
21. Trechera P, Moreno T, Córdoba P, Moreno N, Zhuang X, Li B, et al. Comprehensive evaluation of potential coal mine dust emissions in an open-pit coal mine in Northwest China. *Int J Coal Geol*. 2021 Feb;235:103677.
22. Espitia-Pérez L, da Silva J, Espitia-Pérez P, Brango H, Salcedo-Arteaga S, Hoyos-Giraldo LS, et al. Cytogenetic instability in populations with residential proximity to open-pit coal mine in Northern Colombia in relation to PM₁₀ and PM_{2.5} levels. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018 Feb;148:453-66.
23. Bray C, Battye W, Uttamang P, Pillai P, Aneja V. Characterization of Particulate Matter (PM_{2.5} and PM₁₀) Relating to a Coal Power Plant in the Boroughs of Springdale and Cheswick, PA. *Atmosphere (Basel)*. 2017 Sep 23;8(10):186.
24. Timonen H. TK, AM, RF, VY, BM, OP, HR, AE& SS. Sources and composition of particulate matter in boreal arctic environment next to an active mining area. *Boreal Env Res*. 2018;23:105-25.
25. Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016 Mar;25(1):107-23.

26. Achten C, Hofmann T. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - A hardly recognized source of environmental contamination. *Science of The Total Environment*. 2009 Apr;407(8):2461-73.
27. Liu J, Liu G, Zhang J, Yin H, Wang R. Occurrence and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil from the Tiefa coal mine district, Liaoning, China. *Journal of Environmental Monitoring*. 2012;14(10):2634.
28. Topinka J, Rossner P, Milcova A, Schmuczerova J, Svecova V, Sram RJ. DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM2.5 in an acellular assay. *Toxicol Lett*. 2011 May;202(3):186-92.
29. Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, Furuichi M, Iwasaki Y, Hokama M, et al. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4(1):4689.
30. Parry EM. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis*. 2002 Nov 1;17(6):509-21.
31. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2010;92:1-853.
32. Pham AN, Xing G, Miller CJ, Waite TD. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *J Catal*. 2013 May;301:54-64.
33. Go LHT, Cohen RA. Coal Workers' Pneumoconiosis and Other Mining-Related Lung Disease. *Clin Chest Med*. 2020 Dec;41(4):687-96.
34. Romero M, Varona M, Ibáñez-Pinilla M, Briceño L. Prevalence of pneumoconiosis and spirometric findings in underground mining workers in Cundinamarca, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2019 Oct 1;67(4):393-8.
35. Laney AS, Weissman DN. Respiratory Diseases Caused by Coal Mine Dust. *J Occup Environ Med*. 2014 Oct;56(Supplement 10):S18-22.
36. Buttling LG, McKnight MX, Kolivras KN, Ranganathan S, Gohlke JM. Maternal proximity to Central Appalachia surface mining and birth outcomes. *Environmental Epidemiology*. 2021 Feb;5(1):e128.
37. Ruktanonchai CW, McKnight MX, Buttling L, Kolivras K, Krometis LA, Gohlke J. Identifying exposure pathways mediating adverse birth outcomes near active surface mines in Central Appalachia. *Environmental Epidemiology*. 2022 Jun;6(3):e208.
38. Hendryx M, Entwistle J. Association between residence near surface coal mining and blood inflammation. *Extr Ind Soc*. 2015 Apr;2(2):246-51.

39. León-Mejía G, Quintana M, Debastiani R, Dias J, Espitia-Pérez L, Hartmann A, et al. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014 Sep;107:133-9.
40. León-Mejía G, Espitia-Pérez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JAP, et al. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Science of The Total Environment.* 2011 Jan;409(4):686-91.
41. Ávila Júnior S, Possamai FP, Budni P, Backes P, Parisotto EB, Rizelio VM, et al. Occupational airborne contamination in south Brazil: 1. Oxidative stress detected in the blood of coal miners. *Ecotoxicology.* 2009 Nov 18;18(8):1150-7.
42. Plinio Enrique Bustamante Ortega; Rafael Eduardo García Molano; Oswald Maya Sánchez; Juan Felipe Rodríguez López; Tatiana Aguilar Londoño. *Minería de carbón en Colombia transformando el futuro de la industria.* Ministerio de Minas y Energía. 2022;
43. Drummond Ltd. <https://www.drummondLtd.com/nuestras-operaciones/minas/>. *Nuestras operaciones: Minas.*
44. Guerrero-Castilla A, Olivero-Verbel J, Marrugo-Negrete J. Heavy metals in wild house mice from coal-mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2014 Mar;762:24-9.
45. León-Mejía G, Rueda RA, Pérez Pérez J, Miranda-Guevara A, Moreno OF, Quintana-Sosa M, et al. Analysis of the cytotoxic and genotoxic effects in a population chronically exposed to coal mining residues. *Environmental Science and Pollution Research.* 2023 Mar 4;30(18):54095-105.
46. León-Mejía G, Vargas JE, Quintana-Sosa M, Rueda RA, Pérez JP, Miranda-Guevara A, et al. Exposure to coal mining can lead to imbalanced levels of inorganic elements and DNA damage in individuals living near open-pit mining sites. *Environ Res.* 2023 Jun;227:115773.
47. Miranda-Guevara A, Muñoz-Acevedo A, Fiorillo-Moreno O, Acosta-Hoyos A, Pacheco-Londoño L, Quintana-Sosa M, et al. The dangerous link between coal dust exposure and DNA damage: unraveling the role of some of the chemical agents and oxidative stress. *Environ Geochem Health.* 2023 Oct 4;45(10):7081-97.
48. Flint OP. *In Vitro Toxicity Testing: Purpose, Validation and Strategy. Alternatives to Laboratory Animals.* 1990 Nov 13;18(1_part_1):11-8.
49. León-Mejía G, Silva LFO, Civeira MS, Oliveira MLS, Machado M, Villela IV, et al. Cytotoxicity and genotoxicity induced by coal and coal fly ash particles samples in V79 cells. *Environmental Science and Pollution Research.* 2016 Dec 16;23(23):24019-31.

50. Matzenbacher CA, Garcia ALH, dos Santos MS, Nicolau CC, Premoli S, Corrêa DS, et al. DNA damage induced by coal dust, fly and bottom ash from coal combustion evaluated using the micronucleus test and comet assay in vitro. *J Hazard Mater.* 2017 Feb;324:781-8.
51. Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology.* 1995 Jun;343(2-3):85-94.
52. SARIGÖL KILIÇ Z, ÇAL T, ÜNDEĞER BUCURGAT Ü. Evaluation of the Methylation and Acetylation Profiles of Dinitroaniline Herbicides and Resveratrol on the V79 Cell Line. *Turk J Pharm Sci.* 2020 Dec 1;17(6):631-7.
53. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc.* 2006 Jun 27;1(1):23-9.
54. Cannan WJ, Pederson DS. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol.* 2016 Jan 28;231(1):3-14.
55. Vamvakas S, Vock EH, Lutz WK. On the Role of DNA Double-Strand Breaks in Toxicity and Carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 1997 Jan 25;27(2):155-74.
56. Garm C, Moreno-Villanueva M, Bürkle A, Larsen LA, Bohr VA, Christensen K, et al. Genetic and environmental influence on DNA strand break repair: A twin study. *Environ Mol Mutagen.* 2013 Jul 25;54(6):414-20.
57. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis.* 2008 Sep 12;30(1):2-10.
58. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal.* 2003 Jul;17(10):1195-214.
59. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-61.
60. Huang B, Liu G, Wang P, Zhao X, Xu H. Effect of Nitric Acid Modification on Characteristics and Adsorption Properties of Lignite. *Processes.* 2019 Mar 22;7(3):167.
61. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988 Mar;175(1):184-91.
62. Lu Y, Liu Y, Yang C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *Journal of Visualized Experiments.* 2017 Oct 11;(128).
63. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96 Suppl 1:1-42.

64. Linstrom PJ& MWG. Linstrom, P.J. & Mallard, W.G. (2022). NIST chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. In: National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg MD; 2022.
65. Gualtieri M, Mantecca P, Corvaja V, Longhin E, Perrone MG, Bolzacchini E, et al. Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). *Toxicol Lett.* 2009 Jul;188(1):52-62.
66. Huang X, Shi X, Zhou J, Li S, Zhang L, Zhao H, et al. The activation of antioxidant and apoptosis pathways involved in damage of human proximal tubule epithelial cells by PM2.5 exposure. *Environ Sci Eur.* 2020 Dec 16;32(1):2.
67. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, et al. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro.* 2013 Sep;27(6):1762-70.
68. Allen M, Millett P, Dawes E, Rushton N. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro. *Clin Mater.* 1994 Jan;16(4):189-94.
69. Miranda Guevara AJFMOAHAQSMPLLRJTJFJPMFMLWLMG. Análisis in vitro de citotoxicidad y genotoxicidad causado por nanopartículas de carbón. In: *Calidad de aire, cambio climático y salud pública*. Hill Consulting; 2023.
70. Wang G, Zheng X, Duan H, Dai Y, Niu Y, Gao J, et al. High-content analysis of particulate matters-induced oxidative stress and organelle dysfunction in vitro. *Toxicology in Vitro.* 2019 Sep;59:263-74.
71. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, et al. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ Health Perspect.* 2005 Nov;113(11):1555-60.
72. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011 May;283(2-3):65-87.
73. Luo H, Lu Y, Shi X, Mao Y, Dalal NS. Chromium (IV)-mediated fenton-like reaction causes DNA damage: implication to genotoxicity of chromate. *Ann Clin Lab Sci.* 1996;26(2):185-91.
74. León-Mejía G, Sosa MQ, Rohr P, Kvitko K, Henriques JAP, da Silva J. Occupational Exposure to Coal, Genotoxicity, and Cancer Risk. In: *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*. InTech; 2016.
75. Bjelland S. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2003 Oct 29;531(1-2):37-80.
76. Desler C, Johannessen C, Rasmussen LJ. Repair of DNA damage induced by anthanthrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) without bay or fjord regions. *Chem Biol Interact.* 2009 Feb;177(3):212-7.

77. Chen C, editor. Selected Topics in DNA Repair. InTech; 2011.
78. Gurbani D, Bharti SK, Kumar A, Pandey AK, Ana GREE, Verma A, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. *Int J Hyg Environ Health*. 2013 Aug;216(5):553-65.
79. Jacob J, Raab G, Soballa V, Schmalix WA, Grimmer G, Greim H, et al. Cytochrome P450-mediated activation of phenanthrene in genetically engineered V79 Chinese hamster cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1996 Feb;1(1):1-11.
80. Beach AC, Harmon J. Additive effects and potential inhibitory mechanism of some common aromatic pollutants on in vitro mitochondrial respiration. *J Biochem Toxicol*. 1992 Sep 8;7(3):155-61.
81. Harmon HJ, Sanborn MR. Effect of naphthalene on respiration in heart mitochondria and intact cultured cells. *Environ Res*. 1982 Oct;29(1):160-73.
82. Schirmer K, Dixon DG, Greenberg BM, Bols NC. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology*. 1998 May;127(1-3):129-41.
83. Sun K, Song Y, Zong W, Tang J, Liu R. Anthracene-induced DNA damage and oxidative stress: a combined study at molecular and cellular levels. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020 Nov 19;27(33):41458-74.