



**Universidad de Cartagena
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Grupo de Química Ambiental y Computacional**

**EFFECTOS TÓXICOS ASOCIADOS CON LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES
DERIVADOS DE LA MINERÍA DE CARBÓN**

TESIS DOCTORAL

ANGÉLICA LISBETH GUERRERO CASTILLA

Cartagena de Indias, 2015



Universidad de Cartagena
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Ciencias Farmacéuticas
Grupo de Química Ambiental y Computacional

El presente documento es requisito de grado en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, coordinado por el Dr. Luis Caraballo. Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, bajo la dirección del Dr. Jesús Olivero Verbel y con la participación de los tutores Dr. Luis Franco Ospino y Dr. Ricardo Gaitan Ibarra.

Opta al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas:

Angélica Lisbeth Guerrero Castilla

Prof. Jesús Olivero Verbel PhD.

Prof. Luis Franco Ospino PhD.

Prof. Ricardo Gaitán Ibarra PhD.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la **Universidad de Cartagena** mediante la concesión de una beca de Formación Doctoral, así como a los proyectos financiados por el **Departamento del Cesar** (Concesión 1235/09) y el **Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - COLCIENCIAS** (Concesión 110749326186, 111249326226 y 110756933952). Además, los recursos otorgados por el **Huntsman Cancer Institute** de la Universidad de Utah por intermedio del Señor **Brent Evans**, fueron esenciales para la realización de la pasantía internacional.

	Pág.
Agradecimientos	
Abreviaturas	
Abstract	
1. Introducción	9
1.1 La minería de carbón: generalidades	9
1.1.1 Carbón: Definición, origen y tipos	9
1.1.2 Distribución de las reservas de carbón	10
1.1.3 Estructura química del carbón: Modelos moleculares	11
1.1.4 Carbón: Aspectos minero - ambientales	11
1.2 Minería carbonífera: efectos sobre la salud humana	19
1.2.1 Efectos pulmonares asociados con la exposición al polvillo de carbón	19
1.2.2 Efectos cardiovasculares asociados con la minería de carbón.	23
1.2.3 Resumen de efectos bioquímicos y moleculares generados por metales y PAHs. Dos grupos de contaminantes asociados con la minería de carbón.	24
1.3 Valoración de los efectos biológicos asociados con la exposición a contaminantes derivados de la minería de carbón	32
1.3.1 Valoración de efectos moleculares	32
1.3.2 Valoración de efectos a nivel celular	47
1.3.3 Valoración de efectos tisulares, orgánicos y sistémicos	49
1.3.4 Modelos biológicos empleados en este estudio	50
1.4 Visión general del sistema de respuesta celular frente a estresores y xenobióticos.	57
2. Hipótesis y Objetivos	63
3. Trabajos experimentales	65
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.	66
Altered gene expression in HepG2 cells exposed to a methanolic coal dust extract.	91
Toxic effects of coal dust extract on embryonic development of Zebrafish	111
4. Discusión general	137
5. Conclusiones	151
6. Referencias Bibliográficas	153

Estas son sin duda las líneas que todos los futuros graduandos soñamos con plasmar... espacio que me permite hacer una parada, que me insta a echar una mirada hacia atrás y apreciar nuevamente este camino desde sus inicios, y que finalmente me lleva a concluir que cada aprendizaje, recurso y experiencia los obtuve de alguien más y que en cada sentimiento existió alguien con quien compartirlo. Por esto, doy gracias a mi Padre Celestial, quien con su profundo amor y gran detalle fue mi todo en todo, supliendo cada una de mis necesidades y enviándome en el momento perfecto a cada una de las personas con quienes compartí a lo largo de este camino. Gracias Padre porque me diste el privilegio y la bendición de iniciar, seguir dando pasos y convertir este grado académico en una verdadera experiencia de vida en todas sus dimensiones.

Mirando hacia atrás, en el camino puedo apreciar las huellas de mi esposo a mi lado. Gracias Flaqui por acompañarme en los típicos trasnochos frente al computador y darme siempre tu apoyo. También noto las huellas de Sara, quien lleva la mitad de su vida escuchándome hablar del “doctorado”. Noto que las huellas de mi Sari fueron creciendo con el pasar de los años, pero no sólo eso, también puedo ver ahora a mi hija con la madurez para posponer en muchas ocasiones sus deseos para el beneficio de los demás, como lo ha hecho muchas veces conmigo, para que yo ahora pueda estar cerca de la meta. Hija, mi Sari, gracias por tu generosidad y tu amor. Más recientemente, Isabella ha estado también conmigo, y doy gracias por esa sonrisa y energía que me han permitido revitalizarme en esta última etapa.

Gracias a Mis padres y mis hermanos por sus oraciones, su amor y su apoyo sincero, que me afianzaron en el camino y no me permitieron desviarme. Ustedes forjaron lo que ahora soy.

Gracias Dr. Olivero por su guía constante y su trabajo dedicado, que han contribuido en mi desarrollo personal y científico. Su apoyo y confianza depositada en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

Gracias Dr. Caraballo por su generosidad y palabras que me levantaron en momentos cruciales y fueron mi aliciente para continuar. Gracias Dr. Franco y Dr. Gaitán por su disposición y apoyo en cada Seminario y en cada escenario que compartimos. Gracias a todos los profesores y estudiantes del Doctorado por el compartir de conocimiento, de protocolo, de experiencias, de equipos, de reactivos y de todo lo que estaba al alcance.

Gracias Bar, Lili, Karensita y Berty, porque más que un equipo de trabajo, fuimos hermanas, amigas, consejeras mutuas. Gracias por su disposición permanente, por los almuerzos compartidos, por las risas, por bajar y subir escaleras juntas, por buscar y

buscar, hacer y hacer, hasta completar cada tarea. Definitivamente gocé al pertenecer a un equipo esforzado, valiente y con excelente sentido del humor.

Gracias Maria C y Lesly, por añadirse el equipo de Biología molecular y fortalecer aún más nuestra capacidad para hacer más y mejores cosas desde la multidiscipliniedad. Gracias por su cariño y por cada consejo. Siempre serán las madrinas de la pequeña Isabella.

Gracias Amy, Carlos, Dr. Ojeda y Dr. Ciro por apoyarme cuando fue necesario y por alegrarse conmigo en cada logro.

Gracias al Señor Brent y la Señora Pam quienes fueron instrumentos de Dios para permitir y apoyarme durante la Pasantía realizada en Utah University. Siempre estarán en mi mente y corazón.

Gracias a mis amigos, a mis compañeros de clase, a mis profesores, al personal auxiliar, de la biblioteca y administrativo, a todos quienes estuvieron desde antes, desde mis inicios en el pre-grado, quienes estuvieron durante mi especialización, durante el doctorado y quienes están ahora. Gracias a ustedes puedo decir que soy un producto 100% Udeceísta, un producto del trabajo y cariño de todos ustedes.

Si bien reconozco que mi vida la debo a Dios, ahora me doy cuenta que mi deuda terrenal actual es más alta que cuando comencé, y con esto no me refiero al préstamo que tal vez adquirí con fin de sortear alguna situación económica, mi deuda es aún mayor, e inició cuando recibí la antorcha de la investigación y el apoyo e intervención de muchas personas, de ustedes, quienes aportaron para mantenerla encendida, regalándome muy generosamente porciones de su vida y de su manera de vivir.

Así que la palabra "Gracias" se queda corta para tratar de retribuir la generosidad de todos quienes compartieron parte de su vida conmigo en este caminar. Mi regalo para todos ustedes es mi disposición para continuar pasando la antorcha de la investigación a las próximas generaciones y mi compromiso de compartir lo mejor que tengo en mi vida con los demás, tal como ustedes lo han hecho conmigo.

8-OHdG	8-hidroxi-deoxi-guanosina
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos
ALT	Aspartato aminotransferasa
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
Arnt	Proteína nuclear traslocadora del receptor de hidrocarburos
ASTM	American Society for Testing and Materials
BGR	Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe
BP	Benzo(a)pireno
cDNA	DNA Complementario
CK	Creatinquinasa
CYP1A1	Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1
CYP450	Citocromo P-450
DDIT3	DNA-Damage-Inducible Transcript 3
DMT1	Divalent metal transporter 1
DNA	Acido Dexosiribonucleico
dNTP	Dexosinucleotidos trifosfato
ECM	Matriz extracelular
GADD45B	Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Beta
g-GT	g-glutamiltransferasa
GR	Glutación reductasa
Gt	Gigatoneladas o billones de toneladas
HbA1c	Hemoglobina A1c
HepG2	Células de Hepatocarcinoma humano
IEA	International Energy Agency

LDH	Lactato deshidrogenasa
miRNA	micro RNA
MMP-9	Metaloproteinasas-9 de matriz
mRNA	RNA mensajero
Mt	Millones de toneladas
MTs	Metalotioneínas
NCB	National Coal Board
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1
NTD	Neuronal tube Defects
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PM	Material particulado
PST	Partículas suspendidas totales
RNA	Acido Ribonucleico
RNA-Seq	Secuenciación del RNA
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SOD	Superóxido dismutasa
TIMP-9	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas-9
UNECE	United Nations Economic Commission for Europe
US-EPA	Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos
VLDL	Triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos

El habitar en zonas cercanas al desarrollo actividades mineras carboníferas y la exposición al polvillo de carbón, han sido asociadas con impactos al ecosistema, aparición de enfermedades crónicas y mortalidad. Este estudio se enfocó en probar que la exposición a contaminantes derivados del polvillo de carbón genera modificaciones en la integridad del genoma, procesos transcripcionales y alteraciones en el desarrollo embrionario. Para esto, fueron determinados los efectos genotóxicos y transcripcionales asociados con la exposición a contaminantes derivados de la minería de carbón en ratones silvestres (*mus musculus*), células HepG2 y embriones de zebrafish (*Danio rerio*).

Inicialmente fue examinado el contenido de metales (Empleando voltametría) y el estado transcripcional (mediante RT-PCR) de biomarcadores génicos asociados con estrés oxidativo, transporte de metales y daño al DNA, en el hígado de ratones silvestres (*mus musculus*) colectados cerca de las minas de carbón en La Loma y la Jagua (Departamento del Cesar), y comparados con aquellos obtenidos en sitios de referencia (Valledupar). Posteriormente, fue preparado un extracto de carbón para determinar los efectos generados en células HepG2 y embriones de Zebrafish. Las células fueron expuestas a concentraciones entre 5 y 100 ppm del extracto por 12 horas, usando DMSO como control negativo. MTT y el ensayo cometa fueron usados para evaluar citotoxicidad y genotoxicidad respectivamente y RT-PCR fue utilizada para cuantificar la expresión relativa de genes biomarcadores de estrés oxidativo, metabolismo de xenobioticos y daño al DNA. Finalmente, alteraciones en el desarrollo y cambios transcripcionales fueron evaluados en los embriones expuestos a concentraciones entre 5 y 5000 ppm del extracto de carbón, empleando análisis microscópico, hibridación *in situ* y RNA-Seq.

La expresión de mRNA de NQ01, MT1, SOD1, MT2, and DDIT3 fue más alta en el hígado de ratones silvestres (*mus musculus*) capturados en zonas mineras de La Jagua y la Loma, que en el tejido hepático de animales recolectados en el sitio de referencia (Valledupar). Estos resultados podrían estar vinculados, entre otros aspectos, con las altas conconcentraciones hepáticas de Cd, Cu y Zn, encontradas también en los animales expuestos a actividades mineras carboníferas. Por otra parte, diferentes concentraciones de extracto de carbón, no inducen cambios significativos en la viabilidad de células HepG2 después de 12 horas de exposición, sin embargo, concentraciones entre 50 y 100 ppm producen incremento significativo del índice de daño genómico, al comparar con controles negativos. Células HepG2 expuestas al extracto de carbón mostraron alteraciones transcripcionales mediadas por AhR, cambios en el estado oxidativo celular y efectos genotóxicos. La expresión de mRNA de CYP1A1 (Hasta 163

veces), NQO1 (Hasta 4.7 veces), y GADD45B (Hasta 4.7 veces) resultó ser mayor en HepG2 expuestas que en los controles.

Concentraciones de extracto de carbón entre 50 y 250 ppm, son relacionadas con alta mortalidad y malformaciones en embriones de zebrafish. Exposiciones entre 500 y 5000 ppm registraron porcentajes de supervivencia máximos de 20% y aparición de malformaciones en el 100% de los embriones sobrevivientes. Las principales aberraciones fenotípicas en los embriones expuestos incluyen malformaciones en cabeza, cola, cuerpo y corazón. La mezcla de contaminantes en el extrado de carbón indujo en embriones de zebrafish, alteraciones transcriptómicas asociadas con procesos de oxido-reducción, metabolismo de xenobioticos, filamentos intermedios, unión a calcio, interacciones ECM-receptor y adhesión focal. Presumiblemente los mecanismos de toxicidad implicados incluyen vías AhR-independientes y AhR-dependientes.

En conjunto, los resultados indican que los contaminantes asociados con las actividades mineras carboníferas alteran los procesos transcripcionales de la biota expuesta y causan alteraciones en el desarrollo embrionario de organismos vertebrados. Los resultados de este trabajo permiten una comprensión global de los efectos moleculares, celulares, orgánicos y sistémicos potencialmente asociados con la explotación y uso del carbón. Seguir avanzando en la búsqueda de mas conocimiento científico sobre los riesgos adversos de la minería de carbón, es el camino para que de forma conciente y racional se encuentre un balance entre las ganancias económicas y la salud humana y medio ambiental, tanto a corto como a largo plazo.

1. Introducción

1.1

La minería de carbón: Generalidades

La explotación de combustibles fósiles ha sido una actividad primordial para el desarrollo de la sociedad humana y el avance tecnológico. Sin embargo, la extracción, transporte y uso de estas fuentes de energía, implican riesgos ambientales y en la salud humana (Smith *et al.*, 2013; Wilkinson *et al.*, 2007). El carbón no es la excepción, más aún cuando es la segunda fuente de energía fósil en el mundo, al emplearse principalmente para la generación de energía eléctrica, producción de acero, manufactura de cemento y fabricación de papel (Alpern Boris and Lemos de Sousa M.J., 2002) Sin embargo, también es el combustible más contaminante en todas las etapas de su proceso productivo (Mamurekli, 2010).

1.1.1 carbón: definición, origen y tipos

El carbón es un combustible fósil, tipo roca sedimentaria compuesto mayoritariamente por carbono, hidrógeno y oxígeno; constituyentes que hacen parte de una mezcla compleja y heterogénea de material orgánico e inorgánico (Alpern Boris and Lemos de Sousa M.J., 2002; Vassilev and Vassileva, 2009).

El carbón se generó a partir de restos vegetales prehistóricos autóctonos o alóctonos de los yacimientos, sometidos inicialmente a descomposición microbiana y luego a presiones y temperaturas altas (Craqueo geotérmico), durante millones de años en el período carbonífero. Lignina y celulosa son las principales biomoléculas de origen vegetal involucradas con la formación del carbón, en el proceso denominado carbonificación, que permite la generación de diversos tipos de este mineral según su contenido carbonífero y energético: Turba, Lignito, Sub-bituminoso, Bituminoso y Antracita (Elard and León, 2006). La Figura 1 muestra el proceso de carbonificación y los distintos tipos de carbón.

Internacionalmente existen diversos parámetros utilizados para clasificar el carbón, entre los que se destacan los establecidos por la “American Society for Testing and Materials - ASTM”, “National Coal Board - NCB” y “United Nations Economic Commission for Europe - UNECE”. En Colombia, la norma técnica NTC 4196, utiliza como referente la clasificación estándar del carbón por rango establecida por ASTM (ASTM-D388-777). Los estándares de ASTM clasifican al carbón de acuerdo con su grado de metamorfismo o alteración progresiva en la serie natural desde turba hasta antracita (Ministerio de Minas y Energía, 2005). En la Tabla 1 se muestra la clasificación establecida por ASTM.

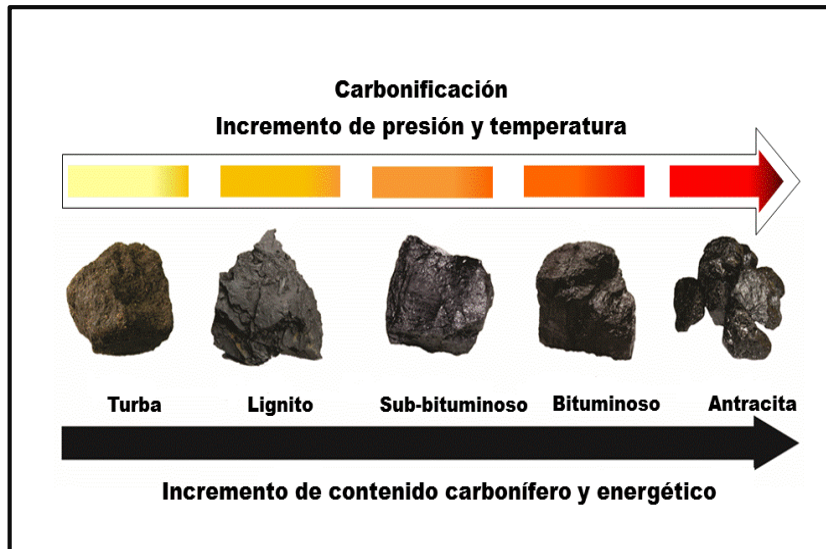


Fig. 1. Proceso de Carbonificación. Se representan los tipos de carbón y su formación secuencial.

Tabla 1. Clasificación del carbón por rango

TIPO	Carbono fijo (%)	Poder Calorífico (Kcal/Kg)
Antracita	86 -98	>7.780
Bituminoso	45 - 86	5.800 - 7.780
Sub-Bituminoso	35 - 45	4.300 - 7.780
Lignito y Turba	25 - 35	2.200 - 4.300

Fuente: American Society for Testing and Materials (ASTM-D388-777). (Kcal-Kilocalorias; Kg-Kilogramo)

1.1.2 Distribución de las reservas de carbón

El Instituto Federal de Geociencia y recursos naturales BGR (Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe), en su último estudio de energía 2012, avalado por la Agencia Internacional de Energía (IEA - International Energy Agency), reportó un total de reservas de carbón de 1.038 Gt (Gigatoneladas o billones de toneladas) en todo el mundo, de las cuales alrededor de 755 Gt corresponden a carbones de alto rango energético (Antracita y bituminoso) y 283 Gt a carbones de bajo rango tales como el lignito y sub-bituminoso. Los cinco países con las más grandes reservas de carbón de alto rango son en orden

decreciente: Estados Unidos, China, India, Rusia, Australia. Por otra parte, los principales países con las reservas de carbón de bajo rango son Rusia, Australia, Alemania, Estados Unidos y China (Andruleit *et al.*, 2012). La Distribución de las principales reservas de carbón en el mundo es mostrada en las Figura 2 y 3.

Colombia ocupa el lugar número 11 entre los países con las más grandes reservas de carbón de alto rango energético, con 4.9 Gt que representan el 0.6% del total mundial. Al año 2011, la producción de carbón Colombiano alcanzó la cifra de 85.8 Millones de toneladas (Mt), correspondiente al 1.3% del total de la producción mundial de carbón de alto rango, lo que le permitió al país exportar 79.3 Mt del mineral y posicionarse en el puesto número 5 entre los mayores exportadores de carbón de este tipo con una participación del 7.3% en el mercado mundial (Andruleit *et al.*, 2012). En la Costa Caribe se encuentra el 90% del carbón térmico del país, principalmente en los departamentos de La Guajira, Cesar y Córdoba (Ministerio de Minas y Energía de Colombia, 2013). El carbón de esta región es de tipo bituminoso alto en volátiles, de buena calidad desde el punto de vista de su poder calorífico, con bajos contenidos de humedad, cenizas y azufre, características que lo hace competitivo en el mercado internacional para ser utilizados en la industria y en la generación de calor, vapor y electricidad (Ministerio de Minas y Energía, 2009).

1.1.3 Estructura química del carbón: Modelos moleculares

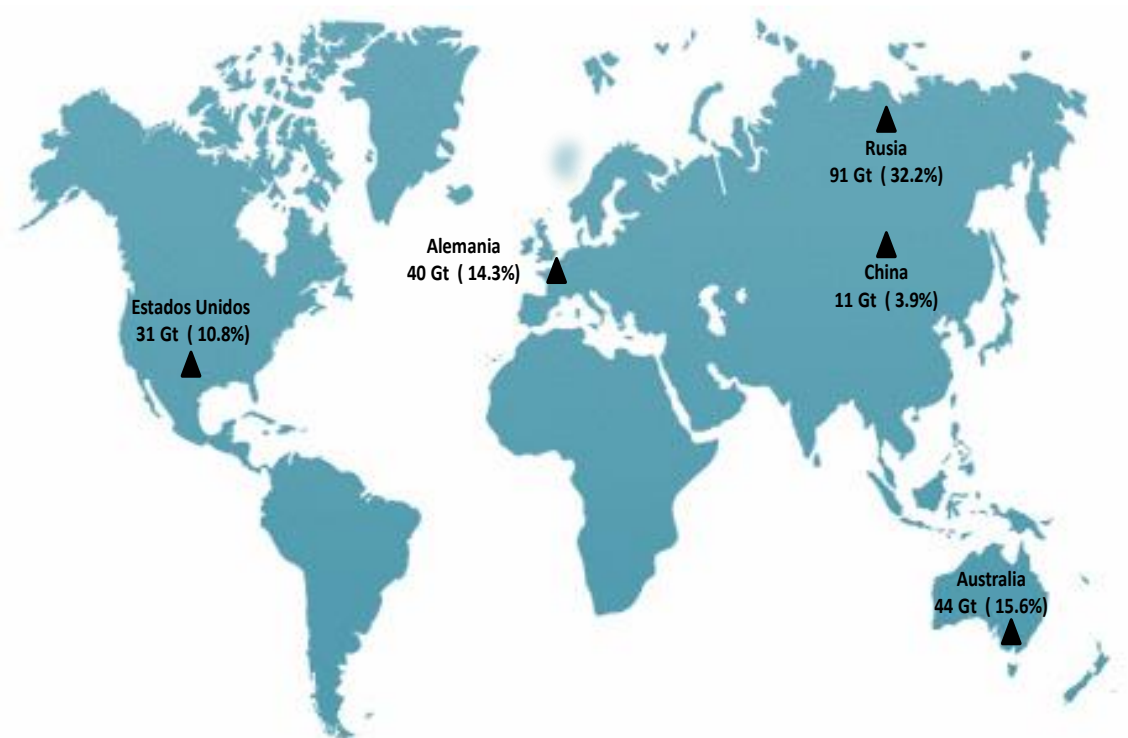
La estructura de carbón es compleja y varía mucho en función del origen y el rango del carbón en particular examinado. Sin embargo, han surgido modelos moleculares para explicar su estructura y propiedades. Entre estos, los modelos moleculares para el carbón de Wiser (1975), Solomon (1981) y Shinn (1984), son reconocidos como los más apropiados debido a la estabilidad energética y flexibilidad de la estructura propuesta (Jurkiewicz, 1986; Kabe *et al.*, 2004). En los tres modelos, el componente principal es una gran estructura policíclica, constituida por la condensación de numerosos anillos aromáticos, cicloalcanos, cadenas laterales alquilo, sustituyentes carbonilo, entre otros. En la Figura 4 se presenta el modelo molecular del carbón actualmente aceptado y propuesto por Shinn.

1.1.4 Carbón: Aspectos minero - ambientales

La industria minera es un sector de la economía basado en agregarle valor económico a los recursos del subsuelo, mediante una serie de actividades que se inician con la exploración geológica y los procesos de extracción del material mineralizado (cielo abierto o subterránea), continúan con los de beneficio del mineral o su transformación en un producto derivado y finalizan con su transporte y comercialización (World Coal Association - WCA, 2013).



Fig. 2. Distribución mundial de las reservas de Carbón de alto rango energético (Bituminoso y Antracita) en 2011: Principales países. Fuente: Instituto Federal de Geociencia y recursos naturales (BGR) – Energy Study 2012.



DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LAS MAYORES RESERVAS DE CARBÓN DE BAJO RANGO ENERGÉTICO (Sub-bituminoso y Lignito) – 2011.

Total de reservas de carbón tipo Sub-bituminoso y Lignito	282.9 Gt
Porcentaje de reservas en principales países (Rusia, Australia, Alemania, Estados Unidos y China)	76.9%
Porcentaje Otros países	23.1%

Fig. 3. Distribución mundial de las reservas de Carbón de bajo rango energético (Sub-bituminoso y Lignito) en 2011: Principales países. Fuente: Instituto Federal de Geociencia y recursos naturales (BGR) – Energy Study 2012.

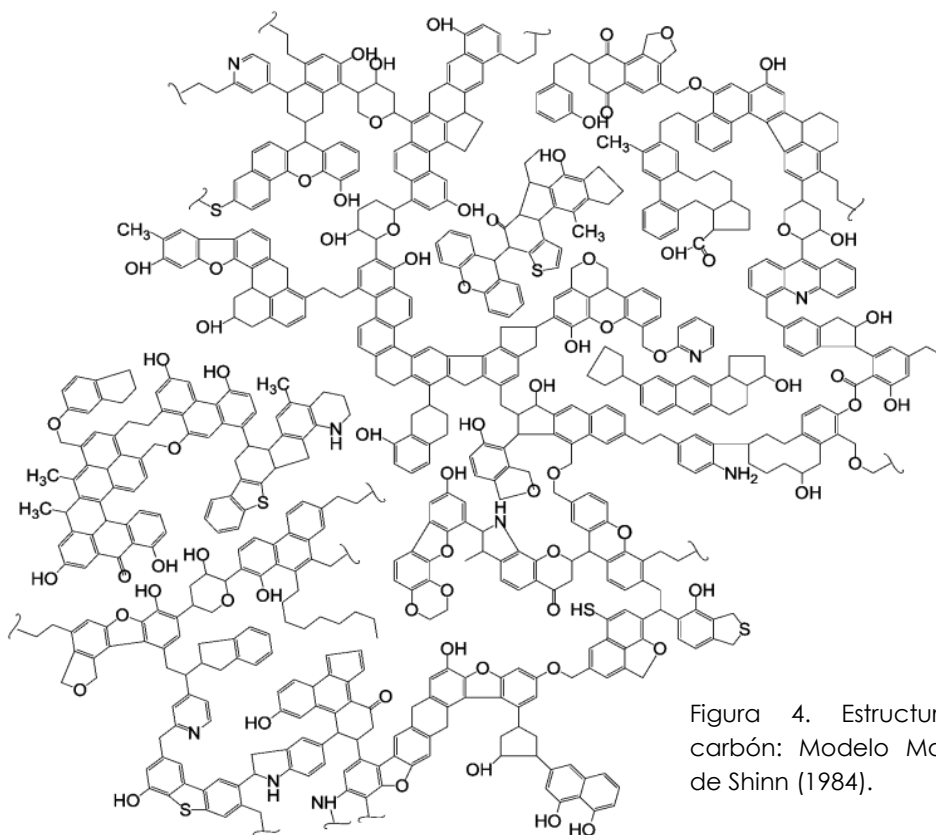


Figura 4. Estructura del carbón: Modelo Molecular de Shinn (1984).

El carbón constituye un importante recurso minero, que ha contribuido continuamente en el desarrollo de gran variedad de tecnologías que trascienden en la forma de vida de la humanidad. Aspectos tales como la comunicación, la movilización y el acceso rápido a la información, han progresado gracias a la energía proporcionada por el carbón, y aunque existen fuentes alternativas de energía, tales como el gas natural, la energía eólica, hidroeléctrica y la nuclear, el bajo costo del carbón ha sido un punto a favor en la selección de su uso. Pero inevitablemente, existen efectos negativos y consecuencias económicas derivadas de la exposición a los contaminantes asociados con la minería y que afectan la salud de comunidades, la integridad ecológica y el clima global (Epstein *et al.*, 2011; Morrice and Colagiuri, 2013).

Los principales contaminantes asociados con la actividad minera carbonífera incluyen a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH - Polycyclic aromatic hydrocarbon), metales pesados y material particulado (PM) (Miller and

Maccalman, 2010). Estos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el carbón y formados durante su combustión pueden ser liberados al medio ambiente, afectando diversos ecosistemas (Keating, 2001).

La presencia de PAH en el carbón se relaciona con su biogénesis y estructura policíclica aromática característica. Estudios realizados en países como Alemania, Canadá, Estados Unidos, Francia, Japón, China y Brasil han reportado la presencia de PAHs en carbón. De estas, un número limitado de publicaciones reporta datos cuantitativos de concentraciones variables de PAH, entre 1 y 2500 mg/Kg (Achten and Hofmann, 2009; Pies *et al.*, 2008; Stout and Graan, 2010; Yang *et al.*, 2008). Entre los PAHs detectados en el carbón se incluyen los 16-EPA-PAH, contaminantes prioritarios establecidos por US-EPA (Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos).

Los PAH son un grupo de hidrocarburos conformados por dos o más anillos aromáticos unidos de forma de racimos, lineales o angulares, caracterizados por su baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos. El naftaleno corresponde a la molécula más pequeña perteneciente a este grupo, la cual junto con otros 15 PAH, hacen parte del listado de los 126 contaminantes prioritarios establecidos por la US-EPA. Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno son ejemplos de estos contaminantes asociados con patologías como el cáncer (Ming-Ho, 2005; Moldoveanu, 2010; Walker, 2001).

El carbón, como roca sedimentaria, también ha sido reportado como fuente natural y antropogénica de metales pesados. El término “Metales pesados” es empleado para agrupar de forma general elementos metálicos y metaloides con densidad atómica alta (>4 g/cm³ o más de 5 veces mayor que la del agua) y se caracterizan porque a bajas concentraciones generan efectos tóxicos o de envenenamiento. Metales tales como arsénico (As), plomo (Pb), mercurio (Hg), níquel (Ni), vanadio (V), berilio (Be), cadmio, bario (Ba), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), zinc y selenio (Se) son contaminantes asociados con el carbón, así como los isótopos radiactivos de origen natural radio (Ra), uranio (U) y torio (Th).

Durante los proceso de explotación minera carbonífera, se originan aguas de drenaje con metales pesados a consecuencia de la remoción de grandes cantidades carbón y material mineral asociado. La eliminación de estos elementos es un desafío ambiental para el sector minero, que debe minimizar su impacto en el ecosistema acuático y el suelo (Baird *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). En el medio acuático, los metales existen en equilibrio entre su forma libre (iones disueltos, compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo metil- metales, hidroximetil-metales, huminico-metales, así como los carbonatos, sulfatos, cloruros y bicarbonatos metálicos) y unido a través de

dominios O- a la superficie de organismos vivos tales como algas unicelulares y partículas inertes como en el caso de la arcilla (Bjerregaard and Andersen, 2007).

Adicionalmente, la extracción y transporte de mineral liberan partículas de todos los tamaños, siendo la mayoría incorporadas al aire, formando partículas suspendidas totales (PST). Entre las PST se encuentran diferentes tipos de acuerdo a su tamaño: PM10 (<10 micrómetros), PM2.5 o partículas finas (< 2.5 micrómetros) y PM0.1 o partículas ultrafinas (< 0.1 micrómetros) (Ghose and Majee, 2002; Ghose, 2007; Ghose and Majee, 2007; Orem and Finkelman, 2004).

El material particulado es caracterizado por ser un fragmento sólido pequeño constituido por una mezcla compleja de varios materiales tales como metales, hollín, tierra, polvo, o una combinación de estos. Por lo tanto, cuando se consideran los posibles efectos tóxicos del polvillo de carbón, se está considerando la toxicidad de los minerales y otros contaminantes ambientales que pueden ser absorbidos y están asociados en el polvillo de carbón (Jones *et al.*, 2002). Los niveles de PM en la atmósfera son reportados en microgramos de partículas por metro cúbico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) y organizaciones como EPA y La Unión Europea (EU), establecen los valores estándares permisibles de estos contaminantes del aire, basándose en la evidencia sobre su impacto en la salud tras su inhalación (Ming-Ho, 2005).

El impacto de la minería del carbón en el medio ambiente varía si la mina es activa o abandonada, los métodos de extracción utilizados y las condiciones geológicas de su ubicación, sin embargo, en todos los casos tendrá efectos lesivos en organismos vegetales, animales y en seres humanos, ya sea por destrucción del hábitat o por la liberación de contaminantes al ambiente (Keating, 2001). En general, el espectro de impactos medioambientales de la minería carbonífera es presentado en la Figura 5 e incluye accidentes en minas, subsidencia minera (hundimiento y erosión del terreno), cambios en la hidrología de aguas subterráneas, contaminación del agua y generación de drenajes ácidos y salinos, alteraciones visuales en el ecosistema próximo a la mina, acumulación de escombros, contaminación del aire, entre otros (Mamurekli, 2010).

En cuanto a los accidentes en minas de carbón, sus principales causas son las fugas de gas, derrumbes, incendios y explosiones. En el año 2012, China reportó 1384 muertes por accidentes ocurridos en minas carboníferas (China Labour Bulletin, 2013), cifras que sobrepasan a otros países de importancia, tal como Estados Unidos, con reportes de seguridad señalan un promedio de 24 muertes al año en los últimos cinco años (Mine Safety and Health Administration, 2013). En Colombia, la Agencia Nacional de Minería reportó en 2011 un total 127 personas fallecidas en emergencias mineras. En el año 2012 los accidentes generaron 101 muertos y en el primer trimestre de 2013 ya se han reportado 14 defunciones de mineros. De las anteriores cifras, el 90% de las pérdidas humanas

fueron originadas por accidentes en minas de carbón (Agencia Nacional de minería, 2013).

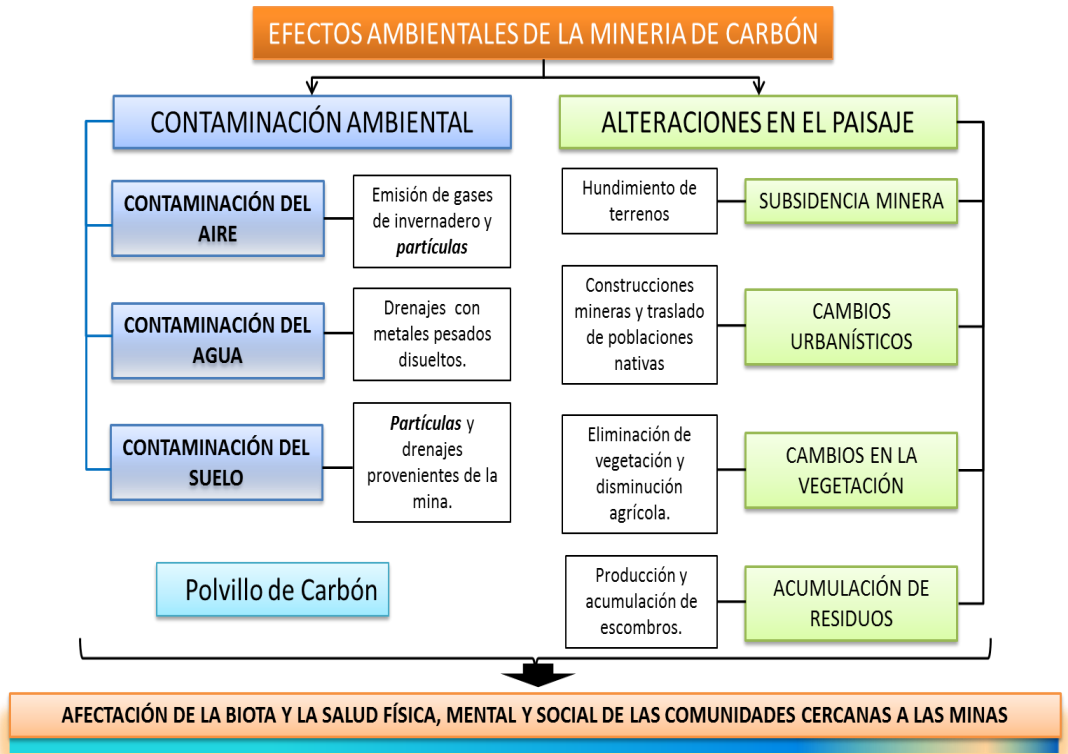


Fig. 5. Efectos medio-ambientales de la minería carbonífera.

El hundimiento de suelo sobre las minas de carbón subterráneas (subsistencia) es otro impacto ambiental que puede afectar la seguridad de organismos e individuos de la zona, y alterar de múltiples formas el terreno (Bian *et al.*, 2010). Recientemente ha sido reportado que la subsistencia en minas de carbón altera la distribución de los metales en el suelo, ya que concentraciones de metales pesados como Cadmio (Cd) y Zinc (Zn) fueron encontradas más altas en las zonas de hundimiento, respecto a zonas no afectadas (Zhang *et al.*, 2012).

Además de los hundimientos, han sido encontrados altos niveles de metales pesados en muestras de suelo próximo a minas de carbón, generando un riesgo potencial al ecosistema y a residentes locales (Liu *et al.*, 2013b; Shi *et al.*, 2013).

Elevadas concentraciones de As, Mn, Zn, Pb y Ti han sido reportadas en muestras de suelo provenientes de regiones mineras carboníferas (Bhuiyan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) y niveles séricos de cadmio considerados tóxicos (>0.5 microgramos/dL), han sido encontrados en el 85% de los niños que habitan en poblaciones aledañas a minas de carbón, a consecuencia de la exposición directa o indirecta a suelos y ecosistemas acuáticos contaminados con los productos y/o desechos de la minería carbonífera (Yapici *et al.*, 2006).

La minería de carbón produce descargas o drenajes ácidos producto por la reacción de la pirita (FeS_2), principal componente mineral presente en el carbón, con el aire y el agua, formando ácido sulfúrico y hierro disuelto. Asociados a estos drenajes, han sido reportados nuevos minerales de hierro amorfo e hidróxidos que contienen elementos peligrosos, tales como As, Cr, Hg, Mo, Se, Pb, U, y otros (Silva *et al.*, 2013). Estos drenajes pueden tener como destino aguas superficiales y/o subterráneas próximas al área minera, convirtiéndose en una fuente importante de contaminación debido a su capacidad de disolver metales pesados como cobre, plomo y mercurio en su recorrido por el terreno minero y adyacente. Así se generan cambios en la química del agua, reduciendo su calidad y afectando el ecosistema acuático (Bian *et al.*, 2010).

Otro destacado impacto de la minería carbonífera es la contaminación del aire, que se debe principalmente a emisiones partículas y gases (metano, dióxido de azufre y óxidos de nitrógeno) (Bian *et al.*, 2010). Los diversos tipos de MP tienen potenciales efectos adversos en la salud tras ser inhaladas, por lo que han sido establecidos límites permisibles a fin de asegurar la calidad del aire respirable (Ming-Ho, 2005). En Colombia, mediciones de PST realizadas en la región minera carbonífera de la costa norte del país, han informado lecturas que exceden las normas vigentes en poblaciones cercanas a las minas de carbón, por lo que los individuos y la biota se encuentran expuestos a un aire contaminado con partículas de alto potencial toxicológico (Huertas *et al.*, 2012a; Huertas *et al.*, 2012b).

En resumen, la industria minera carbonífera es causante de accidentes que cobran vidas humanas, es una reconocida fuente de contaminantes que afectan los ecosistemas y genera fragmentaciones y cambios en el paisaje local debido a la eliminación de vegetación autóctona, disminución de territorios agrícolas, acumulación de los residuos mineros y construcción de nuevos proyectos urbanísticos (Bian *et al.*, 2010). Toda esta constelación de efectos ambientales generados por la minería de carbón, impacta en la biota y en la salud física, mental y social de las comunidades que viven alrededor de las minas como se tratará a continuación (Morrice and Colagiuri, 2013).

1.2

Minería carbonífera: Efectos sobre la salud humana.

De acuerdo con lo revisado antes, existe una constelación de efectos ambientales asociados a la industria minera carbonífera, que finalmente trascienden en el estado de salud de las personas y su calidad de vida. Existe evidencia de los efectos a la salud de la minería de carbón en trabajadores e individuos de poblaciones cercanas a las minas. Incluso, paradójicamente han sido observadas desventajas socio-económicas en las poblaciones aledañas a la explotación del mineral (Zullig and Hendryx, 2011).

La Neumoconiosis es la principal y más estudiada patología en los mineros de carbón, vinculada con la exposición al material particulado (Karkhanis and Joshi, 2013) y específicamente atribuida al contenido de hierro y sílice del mineral (McCunney *et al.*, 2009; McCunney *et al.*, 2011). Por otra parte, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son las patologías mayormente asociadas con la extracción de este mineral en poblaciones cercanas a las minas (Palmer *et al.*, 2010). Finalmente, también existe evidencia de una probable asociación entre la producción de carbón y la ocurrencia de defectos en el tubo neural en niños nacidos de madres expuestas (NTD- Neuronal tube Defects) (Liao *et al.*, 2010).

1.2.1 Efectos pulmonares asociados con la exposición al polvillo de carbón

La exposición material particulado es una de las amenazas graves a la salud de muchos trabajadores del sector industrial y minero. La toxicidad de estas partículas depende de su tamaño y surge como consecuencia de varios factores, entre estos, su propia naturaleza química, cuando contienen sustancias tóxicas tales como Pb, Cd, Ni, Hg, As o radionúcleos. También, las partículas pueden absorber productos químicos con diversos efectos tóxicos e incrementar su efecto lesivo, ya sea al aumentar su disponibilidad de ingreso por inhalación o al prolongar su tiempo de residencia en el sistema respiratorio. Por otra parte, si existen altas concentraciones de partículas en el aire, se pueden generar sobrecargas en el aparato mucociliar, lo que a su vez disminuye su remoción y genera su retención a nivel pulmonar desencadenando una respuesta inflamatoria (Ghose, 2007; Ghose and Majeed, 2007; Ming-Ho, 2005).

La exposición al polvo del carbón induce inflamación alveolar que puede dar origen a enfermedades pulmonares crónicas, tal como la neumoconiosis del minero (Miller and Maccalman, 2010) y otras patologías relacionadas tales como la enfermedad pulmonar obstructiva, enfisema, cáncer y bronquitis crónica (Cohen *et al.*, 2008;Cohn *et al.*, 2010;Vallyathan *et al.*, 2011). Incluso, algunos investigadores han sugerido que existe progresión de la neumoconiosis en trabajadores de las minas de carbón aún después de su retiro (Kimura *et al.*, 2010).

La neumoconiosis de minero, es una enfermedad causada por la inhalación y depósito pulmonar del polvillo de carbón, que usualmente contiene pequeñas cantidades de hierro y sílice cristalina (cuarzo) y es caracterizada principalmente por la degeneración fibrosa (fibrosis) originada tras un proceso inflamatorio (Borm *et al.*, 2011). En el año 2013, China reporta una prevalencia de neumoconiosis del 6.02% entre los trabajadores de la industria carbonífera, un alto índice comparado con países desarrollados como el Reino Unido y Estados Unidos que registran datos del 1% y 3.2% respectivamente (Mo *et al.*, 2013).

El desarrollo de esta patología depende del tipo de carbón, siendo el tipo antracita el de mayor citotoxicidad y patogenicidad. Ha sido estimado que se requieren 10 años para visualizar pequeñas opacidades en el Rayos-X de tórax, en trabajadores de la minería carbonífera (Farzaneh *et al.*, 2010). La neumoconiosis es incurable e incapacitante y su forma más severa está asociada con alta mortalidad. Estas características hacen que la regulación y el control de la exposición al polvo de carbón sean indispensables para prevenir el desarrollo de las enfermedades pulmonares (Santo Tomas, 2011). El progreso de esta enfermedad en los mineros se asocia con complicaciones tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hemoptisis, neumotórax, enfermedad pleural, tuberculosis, enfermedad autoinmune, neumonía intersticial crónica y malignidad (cáncer) (Jun *et al.*, 2013).

En modelos de exposición aguda y crónica, realizados en ratas expuestas al polvo de carbón se han observado efectos inflamatorios y daño oxidativo en el tejido parenquimatoso pulmonar, caracterizados por la activación de la enzima superóxido dismutasa (SOD), aumento de marcadores de peroxidación lipídica y disminución de la defensa antioxidante (Pinho *et al.*, 2004). Efectos similares han sido vistos en humanos, en quienes la exposición al polvo de carbón estimula la respuesta inflamatoria mediante el incremento de la liberación de citoquinas tales como TNF-alpha, de forma que estas moléculas se han propuesto como importantes biomarcadores de neumoconiosis (Ates *et al.*, 2011). Adicionalmente a las alteraciones en marcadores de inflamación y estrés oxidativo, al analizar la sangre total y suero de individuos expuestos ocupacionalmente al polvo de carbón, se ha encontrado daño celular y

alteraciones metabólicas, evidenciados por aumentos de creatinina, ferritina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinquinasa (CK), g-glutamyltransferasa (g-GT), lactato deshidrogenasa (LDH), glutatión reductasa (GR), triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), carbonil-proteínas y malondialdehído (Tuluze *et al.*, 2011).

Se proponen a las especies reactivas de oxígeno (ROS) como las directamente implicadas en el desarrollo de la neumoconiosis, carcinogénesis y demás patologías pulmonares, causadas por la exposición a polvo de carbón (Vallyathan *et al.*, 1998). La pirita (FeS_2) es el principal componente del polvo de carbón que se encuentra directamente relacionado con la capacidad de generación de ROS. Este mineral, específicamente el átomo de hierro, forma espontáneamente peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo en medio acuoso, a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. Son diversos los efectos y blancos de estas ROS, por ejemplo, alteraciones en el material genético celular tras oxidar biomoléculas como adenina y guanina, que son transformadas en los aductos 8-oxoadenina, 2-hidroxiadenina y 8-hidroxiguanina (Cohn *et al.*, 2006a; Cohn *et al.*, 2006b; Cohn *et al.*, 2010). En la Figura 6 es mostrado un esquema de este proceso.

Polvillo de carbón

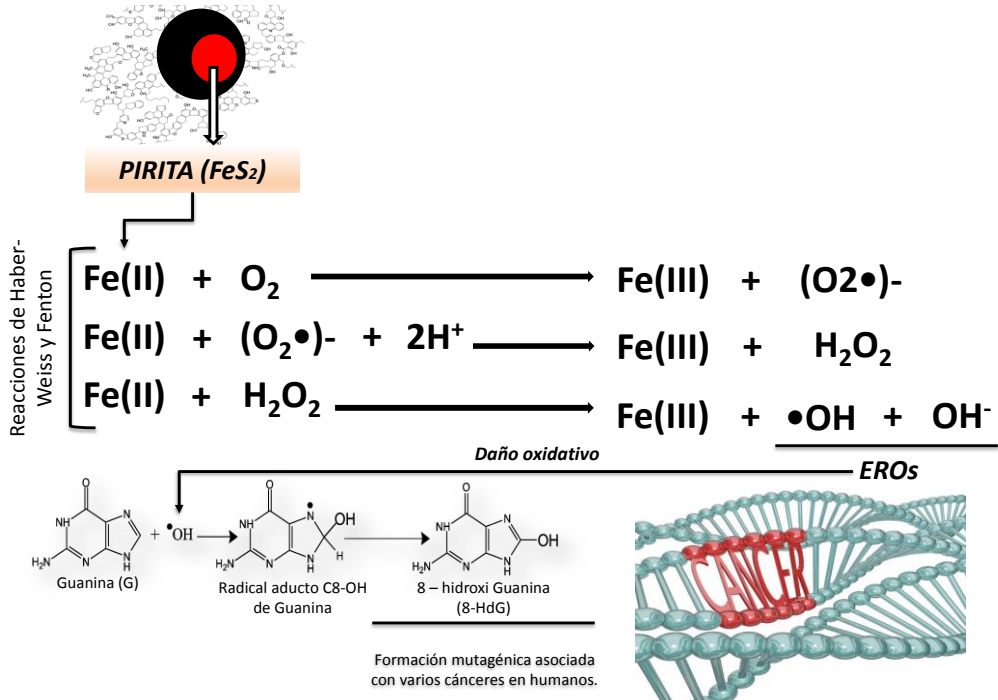


Fig. 6. Formación de ROS a partir de la pirita presente en el polvo de carbón y su potencial efecto oxidativo sobre el ADN.

Como mecanismo de toxicidad del polvillo de carbón, se propone que inicialmente las partículas interactúan con las células epiteliales y macrófagos alveolares, estimulando en las células epiteliales la secreción de componentes de la matriz extracelular (ECM) para dar inicio a la fibrosis y la secreción de citoquinas por macrófagos alveolares que estimulan la migración de células fagocitarias capaces de generar una amplificación en la producción local de citoquinas y ROS. Adicionalmente, las partículas de carbón oxidan membranas celulares y permiten la salida de enzimas intracelulares de tipo proteasas, que lesionan los alveolos pulmonares. En este punto, la generación de ROS supera en número a la defensa antioxidante, acrecentándose la peroxidación lipídica y el consecuente daño pulmonar (Schins and Borm, 1999; Shi *et al.*, 2001; Vallyathan *et al.*, 1998; van *et al.*, 2012).

El incremento de ROS también puede alterar la proliferación celular, tras la activación de factores de transcripción nucleares que favorecen la síntesis de factores de crecimiento, la inducción de la expresión de oncogenes y la generación de mutaciones de genes supresores de tumores (Lim and Seow, 2012). Tal es el caso de las proteínas factor nuclear kappa-B y el activador de la proteína 1, las cuales inducen transcripción de RNA para producir quimoquinas y citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento asociados con la formación de lesiones pulmonares y fibrosis (McCunney *et al.*, 2009).

Recientemente también se ha reportado que alteraciones en el metabolismo de metaloproteinasas-9 de matriz (MMP-9) e inhibidores tisulares de metaloproteinasas-9 (TIMP-9), que podrían estar implicadas en la patogénesis de la neumoconiosis (Zou *et al.*, 2010). Adicionalmente, el estado oxidativo generado por la exposición a polvillo de carbón favorece la síntesis de factores de crecimiento, la inducción de la expresión de oncogenes y la generación de mutaciones de genes supresores de tumores (Lim and Seow, 2012).

En síntesis, las partículas de carbón con un diámetro medio de 0,5-10 micrómetros (PM10) y otras más pequeñas, pueden penetrar en los alvéolos y por medio de mecanismos tales como la generación de estrés oxidativo, disrupción del metabolismo proteico, alteraciones en la proliferación celular e inflamación, pueden provocar la fibrosis del tejido pulmonar y proporcionar condiciones que favorecen la transformación celular que origina cáncer (Karkhanis and Joshi, 2013).

En la Figura 7 se presenta de forma esquemática los efectos pulmonares del polvillo de carbón.

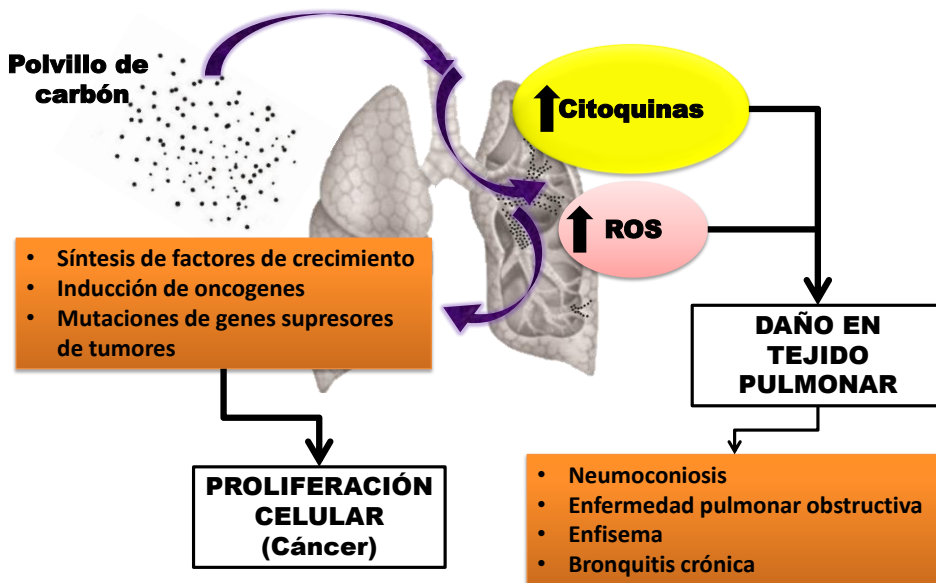


Fig. 7. Resumen de efectos pulmonares relacionados con la exposición al polvillo de carbón.

1.2.2 Efectos cardiovasculares asociados con la minería de carbón.

La contaminación del aire por partículas también está asociada con morbilidad y mortalidad cardiovascular. En las poblaciones cercanas a las minas de carbón, las actividades mineras tiene impacto en la salud humana como consecuencia de la contaminación de los ecosistemas acuáticos, producida por drenajes provenientes de las zonas de explotación, así como por la exposición de los individuos a un aire cargado con altas concentraciones de partículas que son continuamente emitidas durante las diversas etapas del proceso minero (Palmer *et al.*, 2010). Además de las afecciones en la salud, los individuos que habitan en áreas mineras carboníferas tienen una reducción en su calidad de vida, porcentajes altos de pobreza y menor porcentaje de individuos universitarios, aspectos atribuidos a la degradación medioambiental y a las observables desventajas socio-económicas de estas poblaciones (Esch and Hendryx, 2011; Zullig and Hendryx, 2011).

Cada etapa en el ciclo de la minería de carbón (extracción, procesamiento, transporte, almacenamiento y disposición de residuos) se asocia con enormes problemas de salud, de acuerdo a lo reportado por Hendryx *et al.*, (2007-2012),

quienes han encontrado una relación directa entre la producción de carbón y la alta prevalencia e incremento de la mortalidad por enfermedades cardiopulmonares, cáncer y enfermedades renales, en habitantes de las cercanías a las minas de carbón (Hendryx *et al.*, 2007;Hendryx and Ahern, 2008;Hendryx and Zullig, 2009;Hendryx and Ahern, 2009;Hendryx, 2009;Hendryx *et al.*, 2010b;Hendryx *et al.*, 2010a;Hendryx and Fedorko, 2011;Hendryx *et al.*, 2012b;Hendryx *et al.*, 2012a;Hendryx and Luo, 2012).

Interesantemente, la mortalidad por enfermedades cardiovasculares crónicas ha resultado ser significativamente mayor en las zonas mineras al comparar con zonas sin esta industria (Esch and Hendryx, 2011). Así mismo ha sido observado que el número de hospitalizados por hipertensión incrementa de acuerdo con la producción del mineral (Hendryx *et al.*, 2007). De hecho, patologías con consecuencias cardiovasculares como la diabetes tipo 2, ha sido significativamente asociada con la presencia de minas de carbón, tras encontrar que individuos de poblaciones aledañas tienen un valor más alto de hemoglobina A1c (HbA1c) (Liu *et al.*, 2013a).

A nivel endotelial, en individuos expuestos al material particular tal como el generado por la industria minera, han sido reportadas alteraciones en la permeabilidad celular y disrupción en los mecanismos de señalización intracelular que mantienen la homeostasis endotelial (Nadadur *et al.*, 2009). La exposición a partículas de carbón provenientes de actividades mineras ha sido relaciona también con disfunción microvascular sistémica en distintos tejidos, como consecuencia de la vasodilatación mediada por óxido nítrico mediante la disrupción de vías de señalización que aún no han sido completamente identificadas (Knuckles *et al.*, 2013).

1.2.3 Resumen de efectos tóxicos generados por dos grupos de contaminantes asociados con la minería de carbón: Metales y PAH.

1.2.3.1 Efectos tóxicos generados por metales. Los efectos de los metales pesados sobre la salud han sido ampliamente estudiados e incluyen principalmente la generación de diversos tipos de cáncer, neurodegeneración, afecciones reproductivas, diabetes y enfermedades crónicas renales, pulmonares y hepáticas, entre otras (Farina *et al.*, 2013;Jarup, 2003). La toxicidad de los metales depende de varios factores, incluyendo la dosis, la vía de exposición y forma química, así como la edad, el sexo, la genética y el estado nutricional de los individuos expuestos. Debido a su alto grado de toxicidad, arsénico, cadmio, cromo, plomo, níquel y mercurio son catalogados como los metales prioritarios en salud pública. Estos elementos metálicos se consideran

tóxicos sistémicos que inducen daño múltiple de órganos, incluso en los niveles más bajos de exposición (Tchounwou *et al.*, 2012).

Iones metálicos tóxicos con propiedades similares a metales esenciales (por ejemplo, carga y tamaño), pueden competir por sitios de unión en sus blancos celulares, generando perturbaciones en la estructura y función de las biomoléculas, así como desequilibrios en la homeostasis de los metales esenciales para el metabolismo celular (Koedrith and Seo, 2011). Un ejemplo de ello es el bloqueo en el transporte de Fe, generado por el Ni al unirse a la proteína DMT1 (Divalent metal transporter 1 – Transportador de metales divalentes 1) y la alteración en el metabolismo del Ca^{2+} y el Zn^{2+} ocasionada por el Cd^{2+} (Chen *et al.*, 2005; Moulis, 2010).

Enfoques toxicogenómicos han permitido dilucidar que la asociación entre la exposición a metales pesados y carcinogénesis, se fundamenta en múltiples alteraciones en la expresión de genes implicados en equilibrio oxidativo, epigenética, inmunidad, inflamación, apoptosis, crecimiento y metabolismo celular, que finalmente conducen a la iniciación e instalación del tumor (Koedrith and Seo, 2011). La Figura 8 presenta una representación de estos efectos.

El estrés oxidativo generado por la exposición a metales tóxicos es consecuencia de la inducción directa o indirecta de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) en los biosistemas (Koedrith and Seo, 2011; Moulis, 2010). Una importante ROS es el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el cual puede ser convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y este a su vez en el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), en presencia de iones metálicos (Chen and Shi, 2002). Los radicales generados y otros derivados a través de las rutas en cascada propia de estas especies, pueden inducir directamente daño celular o estimular quimoquinas, enzimas y señales celulares generadoras de inflamación. A su vez, estas especies químicas altamente reactivas pueden dañar una o dos hebras del DNA, modificar bases, azúcares o proteínas de unión al DNA, originar mutaciones, errores de replicación e inestabilidad genómica (Kalyanaraman, 2013). La formación de 8-hidroxi-deoxi-guanosina (8-OHdG) por acción de ROS (Figura 9), es una lesión al DNA implicada en varios cánceres humanos (Aseervatham *et al.*, 2013).

La reacción de Fenton, las reacciones de Haber-Weiss, la generación de especies reactivas por unión directa con biomoléculas celulares y la inducción de vías de señalización celulares relacionadas con estrés oxidativa, son los mecanismos propuestos para explicar la generación de especies reactivas por metales (Leonard *et al.*, 2004). Cromo (III), Cobalto (II), Niquel (II) y Vanadio (V), son los metales que mayormente utilizan la reacción de Fenton para generar ROS. En esta reacción los metales reaccionan con H_2O_2 para generar el radical hidroxilo y el metal en su estado oxidado (Valko *et al.*, 2006). La reacción de Haber-Weiss es también importante en la generación de especies reactivas inducidas por

metales tales como Cromo (III, IV, V, VI), Vanadio (V) y Cobalto (I). En esta reacción, un metal oxidado es reducido por el ion radical superóxido, luego el metal reducido se oxida nuevamente por acción del H_2O_2 , dando origen a ión hidroxilo y radical hidroxilo (Leonard *et al.*, 2004). La Figura 10 muestra las ecuaciones que representan las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss, así como una ecuación global de la formación de ROS generadas por metales, a través de estos dos mecanismos.

Adicional a los mecanismos de Fenton y Haber-Weiss, se ha reportado que varios metales pueden reaccionar directamente con moléculas y generar estrés oxidativo. Por ejemplo el Cromo y el Cadmio originan peroxidación de lípidos, niveles elevados de carbonil-proteínas y disrupción proteica tras la formación de radicales tiolicos derivados de aminoácidos como la cisteína. También están implicados en la disminución intracelular de grupos sulfhidrilos y la consecuente interrupción de la acción antioxidante del glutatión (Mattagajasingh *et al.*, 2008; Nemmiche *et al.*, 2012). Los metales pueden además modular la expresión y transducción de señales que reducen la actividad de enzimas involucradas en la defensa antioxidante e inducen la formación de ROS (Mates *et al.*, 2010; Mates *et al.*, 2012).

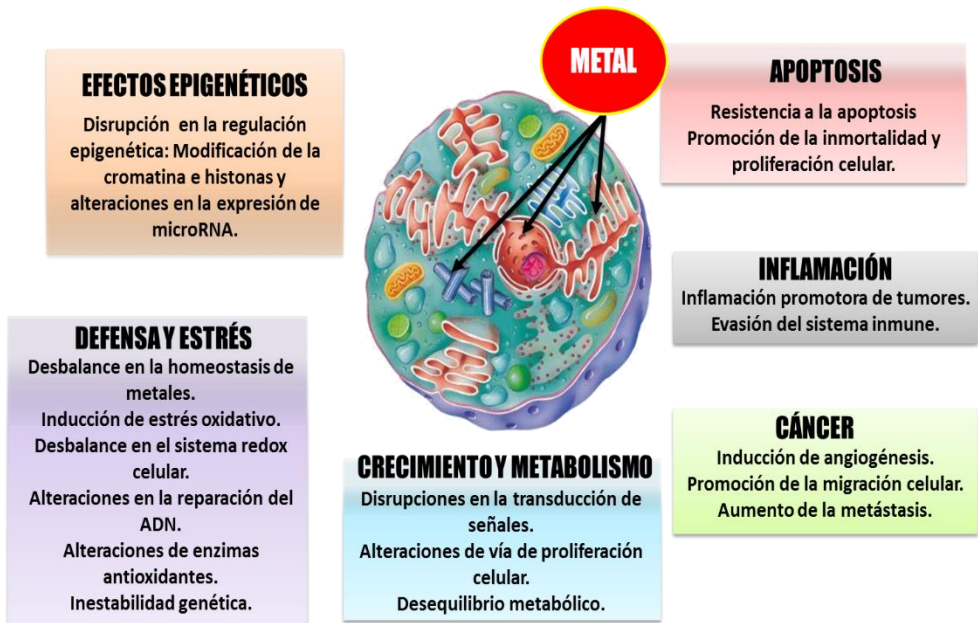


Figura 8. Conjunto de efectos celulares relacionados con la asociación carcinogénesis – exposición por metales.

A – Enzima del grupo de complementación A de xeroderma pigmentoso) y PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1 - Poli-ADP-ribosa polimerasa-1) (Piatek *et al.*, 2008; Witkiewicz-Kucharczyk and Bal, 2006). Por otro lado, ha sido reportado efecto inhibitorio de los metales, en la actividad quinasa y fosfatasa de la enzima reparadora de daño al DNA, Polinucleotido kinasa (PNK) (Whiteside *et al.*, 2010).

Concerniente a las interferencias con el ciclo celular, algunos metales carcinogénicos inactivan moléculas tales como la proteína supresora de tumores p53 y disminuyen la expresión de genes supresores de tumores tales como Fhit (fragile histidine triad gene - en de la triada frágil-histidina) y p16; además, otros metales inactivan los procesos apoptótico (Filipic, 2012). Ha sido reportado que metales como Ni, As y Cr inducen carcinogénesis a través de mecanismos epigenéticos; por ejemplo el As, altera los patrones de metilación del DNA en células sanguíneas, generando disminución de la expresión de la proteína p53 por hipermetilación de su gen (Chanda *et al.*, 2006; Salnikow and Zhitkovich, 2008) y el Cr produce metilación y disminución de la expresión de la proteína supresora de tumores p16 en células pulmonares (Ceryak *et al.*, 2004; Nickens *et al.*, 2010).

1.2.3.2 Efectos tóxicos de los PAH. Entre los PAH encontrados en el carbón se encuentran los 16-EPA-PAH, contaminantes prioritarios establecidos por US-EPA, cuya exposición se asocia principalmente con un riesgo elevado de cáncer, enfermedades pulmonares y cardiovasculares (Achten and Hofmann, 2009; Lee *et al.*, 2011). La intensidad del daño para los organismos expuestos a PAH depende de numerosos factores, incluyendo el grado y el tipo de exposición, naturaleza del ambiente contaminado (es decir, terrestre o acuático), el tipo y la sensibilidad del organismo frente a las fracciones de hidrocarburos específicos y su capacidad para metabolizar diferentes fracciones de PAH (Ball and Truskewycz, 2013).

Los PAH son frecuentemente absorbidos vía oral, inhalación y contacto dérmico, para ser luego principalmente metabolizados por el sistema enzimático CYP450 (Citocromo P-450) en el hígado, riñón, glándulas adrenales, intestino delgado, glándulas sebáceas, pulmón y piel. Los PAH son transformados inicialmente en derivados electrofílicos reactivos, tal como epóxidos que posteriormente son convertidos en derivados de dihidrodiol y fenoles. A través de la fase II de conjugación, estas especies reactivas se destoxifican y hacen solubles en agua tras su unión con ácido glucurónico, glutatión y sulfatos. Los conjugados con glutatión son luego metabolizados a ácido mercaptúrico y junto con los metabolitos hidroxilados y conjugados con el ácido glucurónico son eliminados posteriormente en la orina (Bekki *et al.*, 2013).

Las propiedades carcinogénicas de los PAH están asociadas con su habilidad para lesionar el DNA e inducir mutaciones, para esto, los PAH requieren la activación

a metabolitos electrófilos para ejercer sus efectos mutagénicos o cancerígenos. Actualmente, existen tres principales vías propuestas para la activación metabólica de la PAH: La vía dihidrodiol- epóxido, principal vía de activación catalizada por acción de las enzimas del sistema CYP450, y los dos mecanismos menores, la vía catión radical por oxidación de un electrón y participación del mismo sistema enzimático, y la vía de orto-quinona por acción de la enzima Dihidrodiol deshidrogenasa (DD).

La vía dihidrodiol- epóxido ha sido ampliamente estudiada y el Benzo[a]pireno (BP) ha sido seleccionado como modelo, a fin de comprender los mecanismos intracelulares de la genotoxicidad, carcinogénesis y mutagénesis de los PAH. Dos importantes reacciones de oxidación del BP (Figura 11) son la formación de 7,8-oxido-Benzo[a]pireno y 4,5 oxido-Benzo[a]pireno. El 4,5 oxido-Benzo[a]pireno es inestable en las condiciones celulares, pasando rápidamente a la forma fenólica para ser biotransformado a trans-dihydrodiol o se conjuga con el glutatión. Por otro lado, el 7,8-oxido es convertido en 7,8-trans-dihidrodiol por acción de la epóxido hidrolasa. El 7,8-trans-dihidrodiol es un sustrato e inductor de CYP1A1(Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1) y consecuentemente tras la acción de esta enzima se forma un metabolito oxidado altamente mutagénico, el 7,8-diol-9,10-oxido, que en las condiciones celulares interactúa con residuos de guanina del DNA (Xue and Warshawsky, 2005).

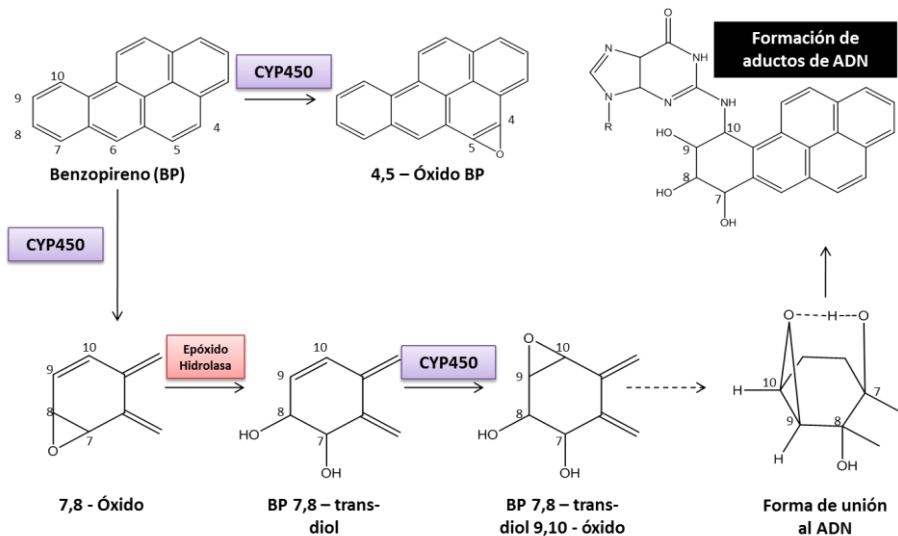


Figura 11. Mecanismo genotóxico del Benzo[a]pireno: Vía dihidrodiol-epóxido.

Con base en este metabolismo celular, la inducción de CYP1A1, es usada como biomarcador de los efectos tóxicos de los PAHs. La inducción de CYP1A1 está mediada por el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR). Los PAH al ser ligandos del AhR, se unen a este receptor, formando un producto de unión (PAH-AhR) que se transportan hacia el núcleo. En el núcleo, AhR dimeriza con la proteína nuclear traslocadora del receptor de hidrocarburos (Arnt), formándose así el complejo encargado del reconocimiento de los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE), que ubicados en los promotores de genes tales como el CYP1A1 y otras enzimas involucradas en la activación metabólica de PAH, inducen su transcripción (Baird *et al.*, 2005). Actualmente es reconocido que Arnt es requerido para la iniciación de tumores inducidos por BP (Shi *et al.*, 2009).

El AhR también media procesos de inducción de estrés oxidativo, otro importante efecto involucrado en la acción patogénica de los PAHs (Costa *et al.*, 2010). Ha sido reportado que la unión PAH-AhR media daño oxidativo del DNA (formación de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxiguanosina) por la traslocación de este ligando al núcleo (Park *et al.*, 2009). Existe también evidencia sobre las alteraciones de la composición de la membrana plasmática de microestructuras ocasionadas por el BP través del AhR. Se ha reportado que este proceso es mediado por H₂O₂, e induce eventos apoptóticos tempranos tales como la remodelación de la membrana que origina alcalinización intracelular (Tekpli *et al.*, 2010). La supresión inmune, otro efecto tóxico de los PAH, también es mediada por la unión de estas tóxicos con el AhR; GCNT3 (Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3 - Glucosaminil (N-acetil) transferasa 3) y DGAT2 (Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 - Diacilglicerol O-aciltransferasa homóloga 2) se han propuesto como los blancos moleculares, cuya disrupción, vía AhR, explica la inmunotoxicidad asociada a los PAH (Iwano *et al.*, 2010). Todos los anteriores procesos celulares mediados por el AhR contribuyen a la procarcinogénesis relacionada con la exposición a PAH.

1.3

Valoración de los efectos biológicos asociados con la exposición a contaminantes derivados de la minería de carbón.

Con el fin de estudiar los mecanismos patogénicos que vinculan la minería del carbón con la prevalencia de enfermedades crónicas, varios estudios han hecho posible establecer el efecto genotóxico de este mineral y sus contaminantes asociados, mediante pruebas estándares como el ensayo cometa y la determinación de micronúcleos (Jose *et al.*, 2010; Leon-Mejia *et al.*, 2011; Leon *et al.*, 2007). Por otra parte, son pocos los estudios orientados hacia la evaluación de los efectos intracelulares generados por los contaminantes asociados a la minería carbonífera, sin embargo, algunos que han utilizado técnicas toxicogenómicas reportan efectos inflamatorios y disrupciones intracelulares asociadas con la exposición a este mineral (Ghanem *et al.*, 2004; Huang and Zhang, 2003). De acuerdo con lo anterior, y como sucede generalmente para los tóxicos, los efectos sobre los organismos pueden ser medidos bajo distintas perspectivas o escalas. Un esquema resumido de los efectos biológicos de los contaminantes asociados a la minería del carbón desde el nivel molecular hasta el sistémico es mostrado en la Figura 12.

Así, estudio de los efectos adversos generados por la exposición crónica a contaminantes implica una multiplicidad de aristas alrededor del problema (Jayapal *et al.*, 2010). A continuación es descrito un planteamiento general para la evaluación de los efectos generados por los tóxicos ambientales, aplicable a los contaminantes asociados a la minería del carbón, desde un enfoque toxicológico que integra metodologías y herramientas aplicadas a diversas escalas: sistémica, orgánica, tisular, celular y molecular. Esta perspectiva de evaluación toxicológica considera que cuando el organismo es expuesto a un tóxico, inicialmente son generadas alteraciones en los patrones de expresión y en la transducción de señales a nivel intracelular, los cuales a su vez producen modificaciones estructurales y funcionales de forma secuencial en células, tejidos y órganos.

Finalmente, a nivel sistémico aparecen cambios clínicamente relacionados con diversas patologías (Figura 13).

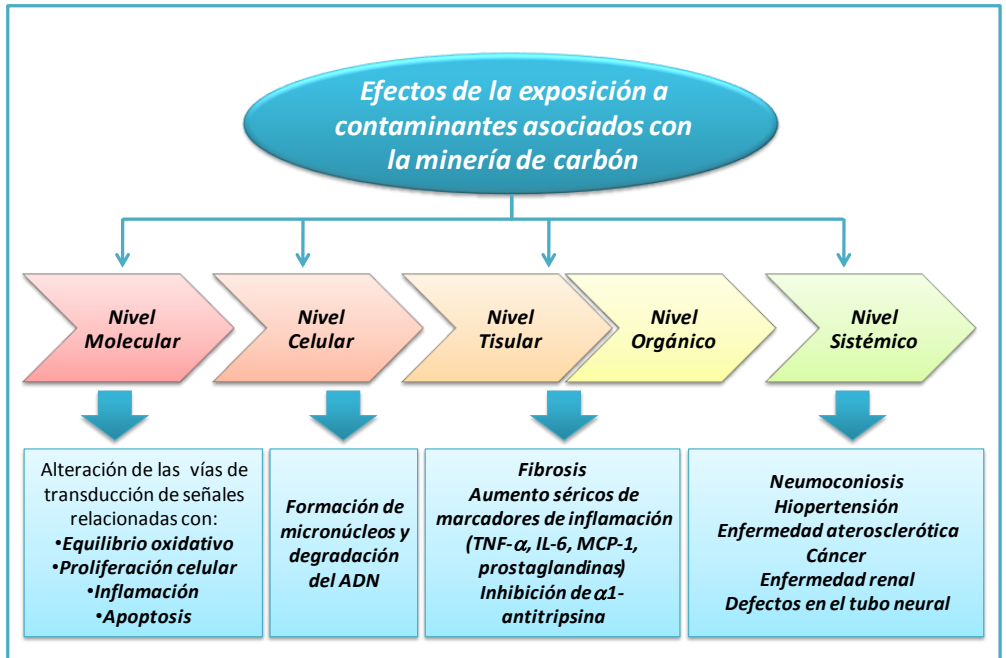


Figura 12. Resumen de efectos biológicos de los contaminantes asociados a la minería del carbón.

1.3.1 Valoración de efectos moleculares

Aunque son pocos los estudios sobre los efectos de la minería del carbón en la estructura, expresión y función de las biomoléculas, existe un conocimiento preliminar que propone a este mineral como un contaminante que puede alterar vías de transducción de señales relacionadas con el equilibrio oxidativo, los mecanismos de proliferación celular, inflamación y ciclo celular, promoviendo la inducción y silenciamiento de múltiples proteínas y factores transcripcionales (Albrecht *et al.*, 2002). Para continuar avanzando en la comprensión de los efectos moleculares de este contaminante deben considerarse los posibles mecanismos mediadores de toxicidad.

Existe un enorme número de posibles mecanismos asociados a la gran diversidad de contaminantes, estructuras biológicas y procesos celulares. Sin embargo, una ruta de toxicidad general ha sido claramente establecida para explicar los efectos causados por la exposición a diversos compuestos tóxicos (Ashauer *et al.*,

2011; Escher *et al.*, 2011). Un esquema de este mecanismo general que inicia con la exposición al contaminante y finaliza en la generación de los efectos tóxicos y patológicos, es presentado en la Figura 14.

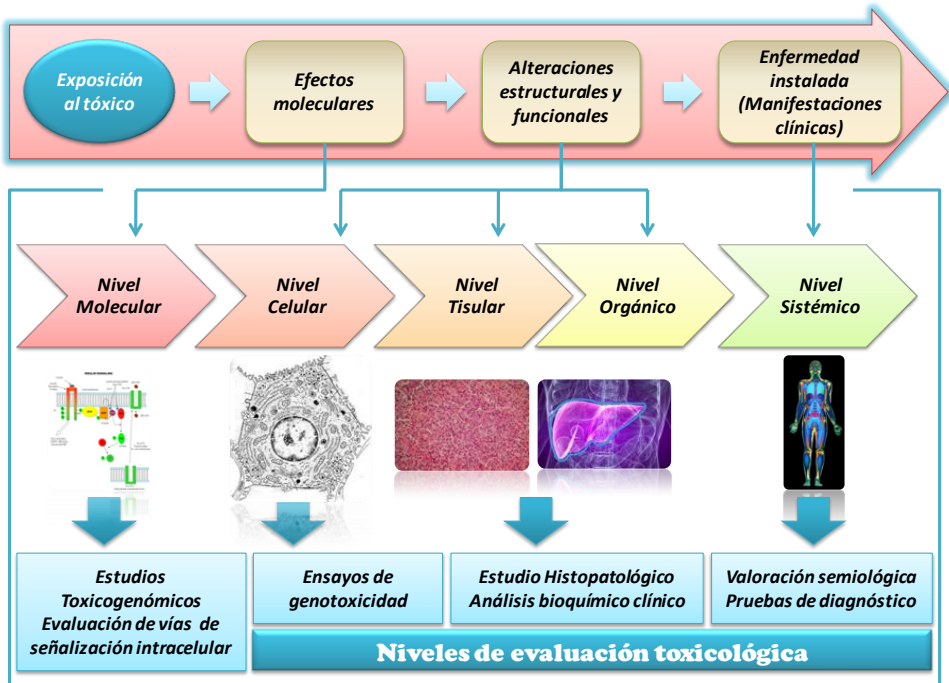


Figura 13. Enfoque de evaluación a escala para determinar los efectos tóxicos asociados con la exposición a contaminantes: caso carbón.

La fase inicial comienza desde la exposición al tóxico hasta su llegada al blanco biológico, por lo que están involucrados los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación del contaminante. Una vez culminada esta fase, el compuesto inalterado, su(s) derivado metabólico o especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generadas durante el proceso, interactúan con su diana molecular. La interacción subsecuente, desencadena una serie de eventos bioquímicos que incluyen modificaciones estructurales de proteínas (p.e. carbonilación), lípidos (p.e. peroxidación) y DNA (p.e. Oxidación de bases y azúcares, rompimiento de cadenas), dando origen a disfunción y destrucción molecular. Si bien, algunos contaminantes no interactúan directamente con dianas moleculares, si lo hacen con el ambiente biológico generando las mismas consecuencias toxicológicas (Escher *et al.*, 2011).

Posteriormente, en la tercera etapa, la disrupción molecular ocasiona alteraciones en la regulación y funcionamiento celular, tras modificaciones en el sistema de transducción de señales y alteraciones de la expresión génica. La

cuarta y última fase está constituida por la inapropiada reparación y adaptación del sistema biológico. En el origen de esta fase final, los trastornos impulsados por los tóxicos exceden la capacidad de respuesta adaptativa, o un malfuncionamiento de los mecanismos de reparación es inducido. Finalmente, a nivel orgánico y sistémico se produce toxicidad o alteraciones patológicas tales como necrosis tisular, fibrosis y cáncer (Ma, 2010).

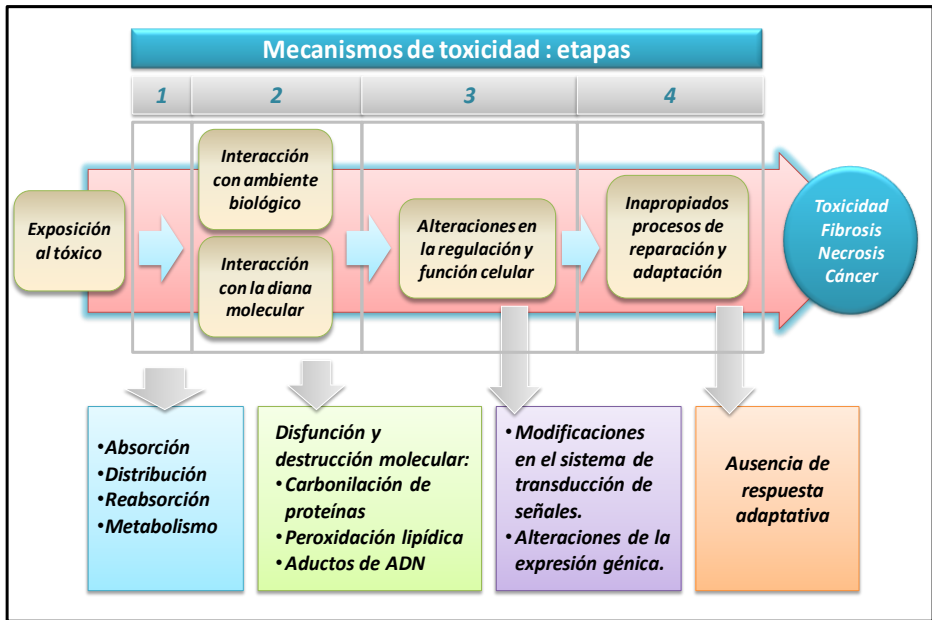


Figura 14. Mecanismo general de toxicidad y sus etapas

Con base en el conocimiento de las etapas generales del mecanismo general de toxicidad y gracias a los avances biotecnológicos que han dado inicio a las nuevas tecnologías ómicas (transcriptómica, proteómica, metabolómica, epigenómica) los efectos moleculares implicados con la exposición a los contaminantes ambientales pueden ser estudiados a nivel molecular con gran detalle. Así, la toxicogenómica es una rama emergente de la toxicología que permite identificar y caracterizar los mecanismos y efectos celulares de compuestos tóxicos y contaminantes ambientales, mediante el uso de tecnologías ómicas, con el fin de comprender y valorar su riesgo e impacto en humanos y los ecosistemas (Singh *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2013).

Para comprender los mecanismo moleculares de toxicidad, elucidar la relación gen-ambiente-enfermedad y descubrir nuevos biomarcadores de exposición a sustancias tóxicas ha surgido la toxicogenómica. Respecto a los hallazgo de

nuevos biomarcadores, el análisis toxicogenómico permite determinar la naturaleza y magnitud de la exposición humana a tóxicos, medir el grado de exposición y generar indicadores tempranos de efectos patológicos (Decristofaro and Daniels, 2008).

Específicamente en el campo ambiental, la toxicogenómica se orienta hacia la elucidación de los mecanismos de toxicidad en diversos modelos y a la valoración de riesgos y efectos, con el fin de traducir estos hallazgos en biomarcadores que puedan ser aplicados en estudios de exposición humana a contaminantes. Adicionalmente, también son estudiados biomarcadores conocidos, con el fin de valorar efectos patológicos tempranos o susceptibilidad de exposición. En la figura 15 es presentado un esquema del potencial uso de datos toxicogenómicos para el entendimiento de los mecanismos de acción y valoración de efectos y riesgos derivados de la exposición a contaminantes ambientales.

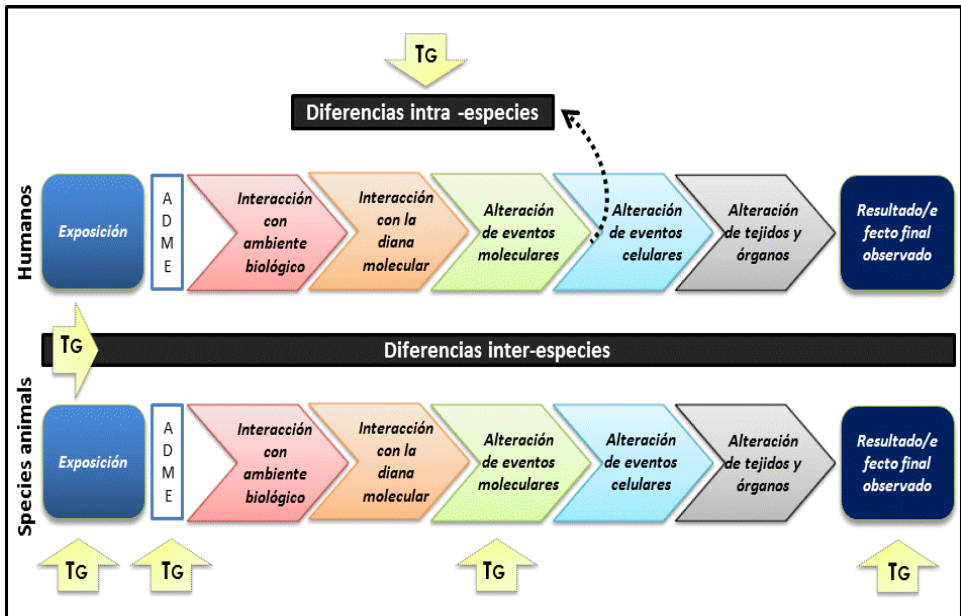


Figure 15. Potencial uso y generación de datos toxicogenómicos en diferentes etapas del proceso de interacción contaminante-sistema biológico. La aplicación de esta información permite comprender los mecanismos de acción, efectos y valorar de riesgo de contaminantes ambientales en la Biota. TG, Información toxicogenómica; ADME, absorción, distribución, metabolismo y excreción.

En este esquema, el proceso inicia desde que el contaminante entra al organismo hasta que el efecto o respuesta es observable, y la información toxicogenómica

generada en etapas específicas, podría proveer información principalmente sobre: la expresión de genes y proteínas, evaluación funcional de proteínas y otras biomoléculas; determinación de transportadores y enzimas claves en el proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de un organismo o tejido; niveles y consumo de pequeñas biomoléculas involucradas en el metabolismo celular; diferenciación entre el estado molecular la pre y post exposición; extrapolación de efectos in vitro a modelos in vivo; identificación de similitudes y diferencias entre mecanismos y efectos tóxicos en diversas especies y entre los tipos celulares de la misma especie; caracterización de diferencias inter-individuales (variabilidad genética entre una población) que podrían alterar la respuesta a xenobióticos (McHale *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2013).

La toxicogenómica incluye el análisis transcriptómico, encargado de la cuantificación de todo el RNA celular en un momento celular específico, a fin de determinar los genes que están siendo activados o silenciados durante el proceso de transcripción, bajo ciertas condiciones naturales o experimentales. Al analizar simultáneamente el conjunto de RNA transcritos, se hace posible valorar el transcriptoma celular. El transcriptoma es dinámico, responde continuamente a los cambios de las condiciones fisiológicas y ambientales en una célula, tejido u organismo, y su análisis permite comprender la relación entre la expresión génica y el fenotipo expresado (Chen *et al.*, 2012).

En los últimos años, el número y variedad de moléculas de RNA (transcriptoma) conocidas ha crecido dramáticamente y adicional a los RNA mensajeros (mRNA), el catálogo de elementos transcritos ahora incluye a miles de RNA no codificantes (ncRNA) que desempeñan múltiples roles estructurales y regulatorios en la célula. Así, la tradicional definición de gen (Una secuencia de DNA que es transcrita para producir una proteína funcional), ha sido expandido para incluir no sólo a los aproximadamente 22.000 genes codificadores de proteínas presenten el genoma humano, sino también a las miles de secuencias no codificadoras de proteínas, sumando entre 30.000 a 40.000 genes totales estimados (Perlea, 2012).

El ncRNA es categorizado de acuerdo a su tamaño en sncRNA (<200pb) y lncRNA (>200 pb). Cada tipo de ncRNA tiene distinta maquinaria de biogénesis, función y al ser más pequeños que los mRNA, la mayor parte de los transcritos humanos son de este tipo. Ha sido cuantificado que 28.191 de los transcritos corresponden a lncRNA, 10.473 a sncRNA y 8.490 a mRNA. Todos los ncRNA involucran complejos patrones de expresión, regulación y juegan un papel importante en control transcripcional y post-transcripcional de genes, modificación de cromatina, median las uniones de los factores de transcripción y participan en el splicing o empalme alternativo de los transcritos primarios de mRNA. Los sncRNA incluyen al RNA ribosomal (rRNA), RNA de transferencia (tRNA), micro RNA (miRNA), RNA pequeños de interferencia (siRNA), RNA nucleolar pequeño

(snoRNA), RNA asociados a piwi (piRNA) y RNA nucleares pequeños (snRNA). miRNA y siRNA son moduladores post-transcripcionales de la expresión génica que se unen a mRNA específicos; snoRNA participa en la modificación química de otros tipos de RNA; piRNA forma complejos de RNA-proteínas a través de dominios proteicos tipo Piwi para luego ser mediador epigenético y de silenciamiento post-transcripcional de genes; y snRNA funciona como un procesador de mRNA. La desregulación de ncRNA está involucrada con cáncer y otras patologías cardiovasculares y neurológicas (McHale *et al.*, 2013).

Las mediciones de la expresión de genes han evolucionado a partir de las medidas individuales de RNA, principalmente mRNA, en estado estacionario utilizando análisis de transferencia de Northern hasta los análisis más globales que involucran a miles de genes, gracias a la utilización de microarrays de ADN y más recientes a tecnologías de análisis de expresión por secuenciación del RNA (RNA-Seq) (Chen *et al.*, 2012). A continuación es presentada una breve revisión de las metodologías de expresión génica empleadas en la valoración de los efectos moleculares asociados con los contaminantes derivados de la minería de carbón: RT-PCR (Real time polymerase chain reaction/ Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), Hibridación *In Situ* y RNA-Seq.

1.3.1.1 RT-PCR (Real time polymerase chain reaction/ Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). La tecnología RT-PCR es frecuentemente utilizada para estudiar la expresión de 10 o más genes. Esta metodología robusta y ampliamente utilizada fue reportada por primera vez por el investigador Higuchi en el año 1992, como una modificación de la PCR desarrollada por Kary Mullis dos años antes (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993).

La PCR es un procedimiento en el cual una fracción de DNA es copiado y amplificado, empleando enzimas DNA polimerasas que amplifican sitios particulares del DNA (amplicones), utilizando oligonucleótidos específicos (cebadores o primer) que actúan como moléculas de reconocimiento e iniciadores del proceso. La enzima más común es la Taq-DNA polimerasa (proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*) que se caracteriza por ser termo-resistente, un aspecto necesario para permanecer activa a las altas temperaturas requeridas para la generación de cadenas sencillas de DNA y garantizar el progreso de la amplificación. La PCR está conformada por las siguientes etapas repetitivas: Desnaturalización (separación de la doble cadena de DNA), alineación (unión de las cadenas sencillas de DNA con los cebadores) y extensión (formación de una nueva cadena) (Valasek and Repa, 2005).

La metodología RT-PCR se diferencia de la PCR convencional, por su capacidad para detectar y medir el producto generado (amplicón) durante cada ciclo del proceso, los cuales son directamente proporcionales a la cantidad de plantilla (template) que se incorporó al inicio de la PCR (Arya *et al.*, 2005). En los ensayos

de expresión usando RT-PCR, el mRNA debe ser primero aislado de la muestra en estudio y posteriormente gracias a la actividad enzimática de la transcriptasa reversa, el mRNA es convertido en cDNA (complementary DNA), el cual es usado como template en RT-PCR (Godfrey and Kelly, 2005). De esta forma RT-PCR se ha posicionado como una herramienta esencial y popular para cuantificar los niveles de RNAm, con alta sensibilidad y precisión en la detección de pequeños cambios de la expresión génica. Además, RT-PCR es una técnica ampliamente utilizada para confirmar y validar la expresión de cDNA obtenida con el uso de Microarrays (Arya *et al.*, 2005; Valasek and Repa, 2005). Un esquema metodológico general de la determinación de la expresión génica utilizando RT-PCR se muestra en la Figura 16a.

La detección del amplicón en RT-PCR emplea dos planteamientos: el uso de agentes intercalantes de cadenas dobles de DNA y la utilización de sondas fluorescentes (Figura 16b y 16c). El primer enfoque es el más simple y costo efectivo, e implica el uso de SYBR® Green I, un fluorógeno no específico que sólo se une sólo a DNA de cadena doble (dDNA) y no a DNA de cadena sencilla (sDNA), emitiendo fuerte fluorescencia cuando se encuentra intercalado dentro del dDNA (Ponchel *et al.*, 2003). El SYBR® Green I libre (No unido a DNA) emite un poco de fluorescencia, sin embargo la fuerte intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de dDNA en el tubo o pozo de reacción. Por esto, la medición del amplicón se realiza al final de la fase de extensión de cada ciclo de la PCR, a fin de monitorear el incremento de la cantidad de DNA amplificado (Arya *et al.*, 2005).

La principal desventaja de este enfoque es la inespecificidad del SYBR® Green I, el cual puede unirse a cualquier cadena doble de DNA formada durante la PCR (Ej: Productos de PCR no específicos y dímeros de primer). Para revertir la inespecificidad de este fluoróforo, es realizada una validación de los resultados al final de la amplificación mediante la curva de disociación del producto amplificado a fin de verificar igualdad en el tamaño (Figura 16e). Este proceso consiste en someter el producto de amplificación a incrementos de temperatura para determinar la temperatura a la cual el 50% del producto se encuentra desnaturalizado (T_m). El valor de T_m es específico para cada tamaño y secuencia de bases de un amplicón, por esto, un único tipo de producto amplificado corresponde a un único valor de T_m para todas las muestras. De esta forma se confirma también la especificidad de los cebadores, una condición requerida para en los ensayos de expresión génica (Wilhelm and Pingoud, 2003).

El otro enfoque de detección de los productos de amplificación está basado en el uso de sondas fluorescentes, tal como el sistema Taqman® que ha sido generalmente empleado (Figura 16c). Con esta metodología son empleados dos primer y una sonda unida covalentemente a un marcador fluorescente (reportero) y a un apagador (quencher) en los extremos 5' y 3' respectivamente.

El uso de la sonda fluorescente está fundamentado en que no emite fluorescencia cuando el complejo sonda-reportero-quencher está formado, sin embargo una vez ha comenzado la amplificación, la sonda alineada es rota por la acción exonucleasa 5' de la Taq polimerasa, incrementándose de esta forma la emisión de fluorescencia, por liberación del marcador fluorescente. Así, el aumento en la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de amplicón generado durante la PCR (Arya *et al.*, 2005).

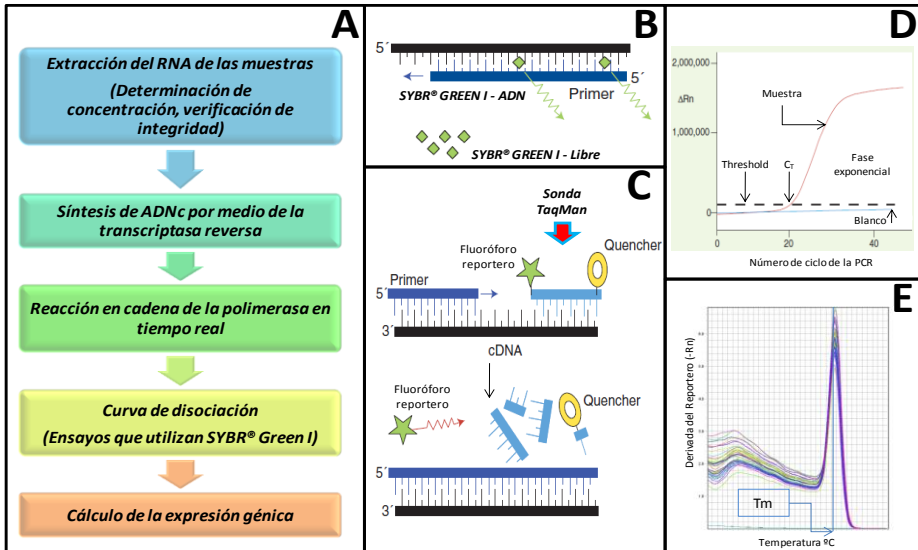


Figura 16. Fundamentos metodológicos de RT-PCR. Esquema general de la determinación de expresión génica usando RT-PCR (A). Métodos usados para la detección de productos de amplificación: SYBR® Green I (B) y Sondas con fluorógenos – Sondas TaqMan (C). Curva de Amplificación (D) y gráfica de disociación del producto amplificado (E).

La fluorescencia emitida por cualquiera de los métodos expuestos, es detectada por un termociclador en tiempo real, cuyo software genera gráficos de amplificación con los valores de fluorescencia Vs el número de ciclos como se muestra en la Figura 16d. El principio básico de cuantificación por RT-PCR, consiste en emplear el valor correspondiente al número de ciclos en el cual la fluorescencia del reportero es tan grande que supera el nivel límite de detección (threshold). Este valor es conocido como CT, y es inversamente proporcional a la cantidad de DNA correspondiente a una secuencia específica de la muestra original, por lo tanto esta medida permite determinar la expresión génica relativa de un gen de interés comparándolo con la expresión de genes constitutivos (genes de expresión constante) tales como β -actina, GAPDH (Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y RPS29 (Proteína ribosomal S29), entre otros (Valasek and Repa, 2005).

Finalmente, dos métodos son utilizados para realizar los cálculos de expresión génica a partir de los valores de CT, cuantificación absoluta (curva estándar) y cuantificación relativa. De estos, la cuantificación relativa también conocida como método comparativo CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) es ampliamente utilizado y permite que la cantidad del gen de interés en la muestra sea normalizado por un gen constitutivo y el grupo control experimental de acuerdo con las siguientes fórmulas matemáticas (Livak and Schmittgen, 2001):

- 1) Expresión génica = $2^{-\Delta\Delta CT}$
- 2) $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Muestra}) - \Delta CT (\text{Control})$
- 3) $\Delta CT = CT (\text{Gen blanco}) - CT (\text{Gen constitutivo})$

RT-PCR se ha consolidado como un método altamente eficaz para la determinación de la expresión génica, gracias a su alta sensibilidad y bajo costo. Otras ventajas de esta metodología incluyen la posibilidad de visualizar el progreso de la amplificación, la ausencia de procesamientos de muestra posteriores al análisis por RT-PCR, el rango dinámico de detección y la creciente lista de biomarcadores génicos disponibles para ser medidos por RT-PCR (Jensen, 2012). Una muestra de estos biomarcadores que permiten continuar avanzando en la elucidación de mecanismos y valoración de efectos asociados con la exposición a contaminantes ambientales es presentada en la Tabla 2.

1.3.1.2 Hibridación *In Situ*. La hibridación *In Situ* emplea sondas de RNA complementarias para localizar secuencias específicas de mRNA en un tejido. Al emplear organismos completos tales como embriones o larvas de *Danio rerio* (zebrafish), la hibridación *In Situ* es el primer paso para analizar y caracterizar los patrones de expresión temporal y espacial de genes durante el desarrollo embrionario, y determinar relaciones de co-expresión de grupos de genes que podrían estar o no controlados por la misma vía de señalización (Thisse and Thisse, 2008).

Generalmente, este método emplea sondas de RNA marcadas con digoxigenina uridina-5'-trifosfato (UTP). Posterior a la hibridación de las sondas, la localización del transcripto específico es visualizada por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, que luego hidroliza el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) a 5-bromo-4-cloro-3-indol y fosfato inorgánico. El compuesto 5-Bromo-4-cloro-3-indol puede también ser oxidado a azul nitro tetrazolio (NBT- nitro blue tetrazolium), el cual forma un precipitado azul oscuro insoluble después de su reducción (Thisse *et al.*, 2004). El uso combinado de NBT/BCIP ha sido reportado como sustrato de mayor sensibilidad, por lo que actualmente es el más empleado (Jowett, 2001; Thisse and Thisse, 2014).

Tabla 2. Ejemplos de Biomarcadores génicos para la evaluación de efectos transcripcionales.

Vía de señalización intracelular	Nombre del gen	Símbolo del gen
Apoptosis	V-AKT murino timoma oncogén viral homólogo 1 [V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1]	AKT
	Proteína X asociada a BCL2 [BCL2-associated X protein]	BAX
	CLL/Linfoma 2 Células B [B-cell CLL/lymphoma 2]	BCL-2
	Caspasa 1, cisteinil peptidasa relacionada con apoptosis [Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase]	CASP1
	Factor de necrosis tumoral [Tumor necrosis factor -TNF superfamily, member 2]	TNF
Necrosis	Factor modificante de Bcl2 [Bcl2 modifying factor]	BMF
	Cilindromatosis [Cylindromatosis -turban tumor syndrome]	CDMT
	Glicoproteína asociada a mielina [Myelin associated glycoprotein]	GMA
	Polimerasa 2 poly (ADP-ribose) [Poly (ADP-ribose) polymerase 2]	ADPRT2
Daño y reparación del ADN	Inhibidor kinasa ciclin dependiente [Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)]	P21
	Transcripto 3 inducible por daño al ADN [DNA-damage-inducible transcript 3]	DDIT3/CHOP/GADD153
	Grupo de complementación 2 reparador de rupturas transversal que complementa la deficiencia de la reparación de roedores [Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2]	ERCC2
	Grupo A de complementación del xeroderma pigmentoso [Xeroderma pigmentosum, complementation group A]	XP1
	Grupo C de complementación del xeroderma pigmentoso [Xeroderma pigmentosum, complementation group C]	XP3
Metabolismo energético mitocondrial	Aconitasa soluble 1 [Aconitase 1, soluble]	ACO1
	Citocromo c-1 [Cytochrome c-1]	CYC1
	Malato deshidrogenasa NAD soluble [Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)]	MDH1
	Succinato- CoA ligasa - subunidad α [Succinate-CoA ligase, alpha subunit]	SUCLA1
	Proteína 1 desacopladora mitocondrial transportadora de protones [Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)]	UPC1
	Acetil-Coenzima A aciltransferasa 1 [Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1]	ACAA

Metabolismo de ácidos grasos (β -oxidación)	Acetil - Coenzima A acetiltransferasa 1 [Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1]	ACAT
	Acil-CoA tioesterasa 1 [Acyl-CoA thioesterase 1]	ACH2
	Palmitoil acil-coenzima A oxidasa 1 [Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl]	ACOX
	Glutaril - Coenzima A deshidrogenasa [Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase]	ACAD5
Estrés oxidativo y respuesta antioxidante	Catalasa [Catalase]	CAT
	Glutation peroxidasa 1 [Glutathione peroxidase 1]	GPX1
	NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 [NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1]	NQO1
	Nudix - Nucleosido difosfatasa ligada a X [Nudix (nucleoside diphosphate linked X)-type motif 1]	MTH1
	Superóxido dismutasa 1 soluble [Superoxide dismutase 1, soluble]	SOD
	Metalotioneína 1 [metallothionein 1]	MT1
	Metalotioneína 2 [metallothionein 2]	MT2
Metabolismo de xenobioticos /Citocromo P450	Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1 [Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1]	CYP1
	Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 2 [Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2]	CYP2B
	Citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 19 [Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19]	CYP2C
	Esterasa D/Formilglutation hidrolasa [Esterase D/formylglutathione hydrolase]	FGH
	Monooxigenasa de flavina 2 - No funcional [Flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)]	FMO1B1
Inmunotoxicidad	Apolipoproteína A-V [Apolipoprotein A-V]	APOA-V
	Interleukina 10 [Interleukin 10]	IL-10
	Interleukina 6 (Interferon beta 2) [Interleukin 6 (interferon, beta 2)]	IL-6
	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal ki-67 [Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67]	KIA
	Paraoxonasa 1 [Paraoxonase 1]	PON

Un esquema general de la metodología de hibridación *In Situ* empleando zebrafish es mostrado en la figura 17. Inicia con la fijación de los embriones, esta etapa implica tratar a los embriones provistos de su envoltura externa (corion) con solución de formaldehído por aproximadamente 4 horas. Posteriormente, los coriones son eliminados con un par de pinzas finas y los embriones desnudos preparados para su almacenamiento mediante tratamiento con soluciones

crecientes de alcohol hasta alcanzar metanol al 100%. Previamente a la etapa de hibridación, los embriones son rehidratados y tratados con la enzima proteinasa K con el fin de incrementar la permeabilidad de su membrana. A continuación, los embriones desnudos son sumergidos en la mezcla de hibridación con las sondas a una concentración no mayor a 1 µg/mL e incubados toda la noche a 60-70 °C (Jowett, 2001).

Una vez se ha cumplido el tiempo de la etapa de hibridación los embriones son sometidos a lavados sucesivos con soluciones salinas, a fin de eliminar todo el exceso de la mezcla de hibridación. Después de la hibridación *In Situ*, los embriones son incubados con el anticuerpo anti-digoxigenina por aproximadamente 2 horas y luego sometidos a soluciones de bloqueo de reacción y lavado. Finalmente, los embriones son tratados con la solución de coloración (NBT/BCIP) por un intervalo de tiempo entre 15 y 30 minutos, para luego ser lavados y mantenidos en formaldehído por 12 horas a 4°C, con el fin de fijar la coloración y garantizar la integridad de los resultados para la posterior etapa de visualización y análisis microscópico de los embriones empleando glicerol (Jowett, 2001).

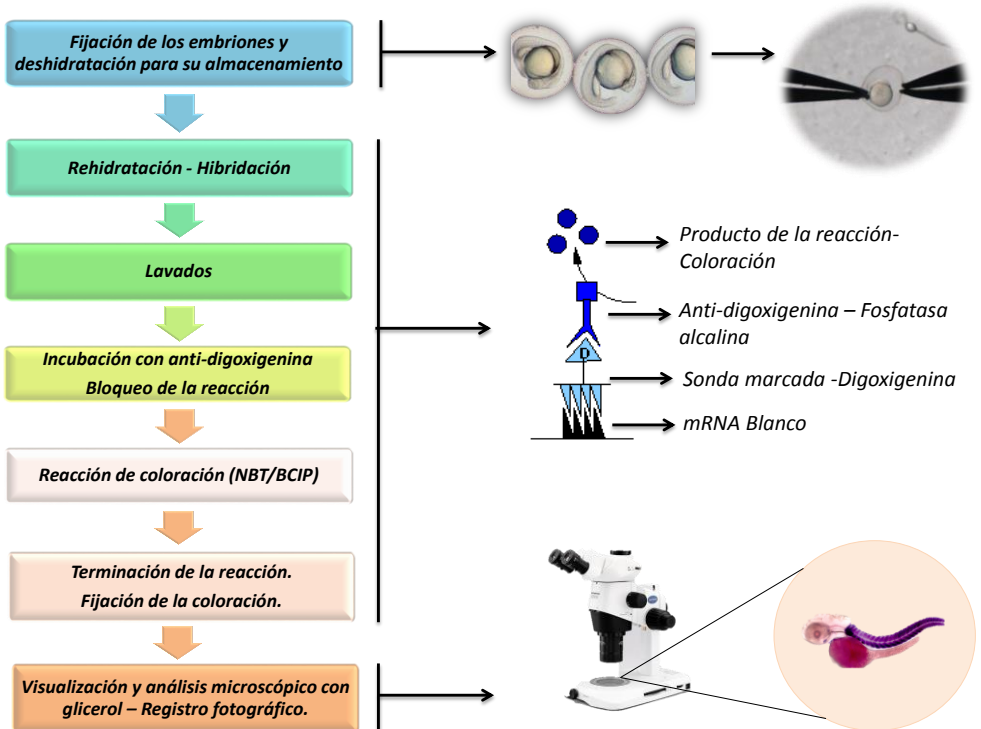


Figura 17. Esquema general de la hibridación *In Situ* aplicada en embriones de Zebrafish.

1.3.1.3 RNA-Seq (RNA sequencing /secuenciación del RNA). Las tecnologías de alto rendimiento con enfoques globales y capacidad de analizar el comportamiento de decenas, cientos o miles de moléculas biológicas en un único ensayo, aventajan a las metodologías tal como Northern o RT-PCR que limitan su análisis a un número reducido de genes. El análisis de microarrays fue pionero en estas tecnologías de análisis transcriptómico globales, basado en el concepto de hibridación, se convirtió en la tecnología más ampliamente utilizada para el estudio de transcriptomas conocidos, debido a su bajo costo, facilidad de uso y procesos de control de calidad (Ozsolak and Milos, 2011).

Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, NGS (del inglés Next Generation Sequencing), se han revolucionado los campos de la genómica y la transcriptómica. La secuenciación de RNA (RNA-Seq), que mide directamente la totalidad del transcriptoma, se integra a este nuevo grupo de tecnologías, ampliando la comprensión actual sobre el complejo y dinámico conjunto de RNA celulares y las diversas vías por las cuales puede ser alterado al exponerse a xenobióticos (Marguerat and Bahler, 2010).

RNA-Seq ha sido una herramienta transcriptómica revolucionaria, por ser la primera metodología basada en secuenciación que permite el análisis cuantitativo y de alto rendimiento de todo el transcriptoma, y que a diferencia de los métodos basados en hibridación, limitados por la detección de transcritos conocidos, analiza la expresión de una amplia gama de moléculas nuevas. Así, RNA-Seq permite una mejor y más profunda comprensión de los mecanismos intracelulares, generados tras la exposición a compuestos químicos y ofrece nuevas oportunidades para identificar y descubrir biomarcadores tempranos de toxicidad y de enfermedad (Ozsolak and Milos, 2011).

En la tecnología de RNA-Seq, se captura el RNA total o RNAm, el cual se fragmenta y convierte en una librería de cDNA. La obtención de RNA de buena calidad y que represente todos los transcritos que se producen en la condición y tejido de estudio es un paso fundamental en RNA-Seq. Para el aislamiento del RNA con frecuencia son empleados kits de extracción que realizan la captura a partir de la cola poly(A). Previo al proceso de fragmentación del RNA, es usualmente realizada la síntesis de cDNA mediante la actividad de la enzima transcriptasa reversa y la incorporación de adaptadores a los extremos 3' y 5' de la cadena. La etapa de fragmentación es realizada ya sea por nebulización, por digestión con enzimas de restricción o a través del uso de cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas. De esta forma se obtiene la librería de cDNA para ser analizada de acuerdo con la plataforma RNA-Seq disponible (Wang *et al.*, 2009).

Las plataformas y estrategias de secuenciación para RNA-Seq actualmente disponibles y mayormente aplicadas son el sistema de pirosecuenciación FLX de

la compañía 454 Life Science (Roche), el Genome Analyzer de Illumina (Solexa) y el sistema AB SOLID (Life Technologies). En todas las tres plataformas, los fragmentos de DNA son secuenciados en paralelo, produciendo un gran número de lecturas de secuencias relativamente cortas, que van desde las cientos de bases en el sistema FLX, hasta millones de bases cuando se emplean los sistema Illumina y AB SOLID (Marguerat and Bahler, 2010). A continuación será descrita la plataforma Illumina, por ser la utilizada en los estudios transcripcionales utilizados.

El Genome Analyzer desarrollado por Sodexa (Illumina) es utilizado tanto para la secuenciación de DNA convencional, como para análisis transcriptómicos. Este método está basado en un mecanismo de dos pasos y la combina la tecnología de amplificación de moléculas de cadena sencilla con la secuenciación por síntesis basada en la unión a un terminador reversible. Primero, el cDNA fragmentado es unido a adaptadores en ambos lados de la cadena. Luego el cDNA es fijado a la superficie interna de una celda que contiene una capa densa de cebadores que son complementarios a los adaptadores. Los fragmentos de DNA hibridados con los cebadores en forma de puente constituyen el complejo iniciador para la subsiguiente e inmediata amplificación en fase sólida para dar origen a fragmentos de doble cadena en forma de puente. Mediante etapas adicionales que incluyen desnaturalización, renaturalización y síntesis, se genera una alta densidad de fragmentos iguales de DNA en una pequeña área de la celda. Aproximadamente un millón de copias de DNA de doble cadena son producidos como un conjunto (Cluster), que representa a un fragmento inicial de cDNA. La síntesis de cluster, previa a la etapa de secuenciación, garantiza la formación de una señal de intensidad óptima para ser detectada (Mutz *et al.*, 2013).

La secuenciación propiamente dicha, es el segundo paso en la metodología del Genome Analyzer. Los dNTPs marcados con fluoróforos base-específicos, son añadidos por una DNA polimerasa de forma gradual al fragmento de DNA de cadena sencilla, la incorporación de cada base es detectada por medio de excitación con láser y luego el fluoróforo es eliminado para así dejar el grupo OH del extremo 3' libre para la incorporación de otro dNTP a la cadena en formación. De esta forma, se obtiene como resultado el conjunto de lecturas de las secuencias de los fragmentos de la librería inicialmente preparada a partir de la muestra de RNAm (Mutz *et al.*, 2013).

Finalmente, el análisis de expresión transcripcional a partir de los datos de lecturas de las secuencias obtenidas, se compone fundamentalmente de tres etapas que utilizan una gran variedad de herramientas bioinformáticas: a) Alineación de las secuencias leídas con el genoma de referencia; b) Cuantificación de la expresión de cada gen por inferencia a partir de los alineamientos realizados; c) Determinación de la expresión génica diferencial (Fonseca *et al.*, 2014).

Existe un considerable número de herramientas bioinformáticas usadas en RNA-Seq para alinear las secuencias obtenidas, algunos ejemplos son: TopHat1 (Trapnell *et al.*, 2012; Trapnell *et al.*, 2009), TopHat2 (Kim *et al.*, 2013), Osa (Hu *et al.*, 2012), Star (Dobin *et al.*, 2013), GSNAP (Wu and Nacu, 2010), Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012), Bowtie1 (Langmead *et al.*, 2009), BWA2 (Li and Durbin, 2010), BWA1 (Li and Durbin, 2009), Smalt (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/smalt/>), y Novoaling (<http://www.novocraft.com/main/page.php?s=novoalign>). Por otra parte, las herramientas bioinformáticas para la cuantificación de los niveles de expresión génica incluyen a: HT-Seq (Anders *et al.*, 2014), Flux-capacitor (Montgomery *et al.*, 2010), Cufflinks1 (Trapnell *et al.*, 2010), Cufflinks2 (Trapnell *et al.*, 2012). Un esquema general de la metodología RNA-Seq es presentado en la Figura 18.

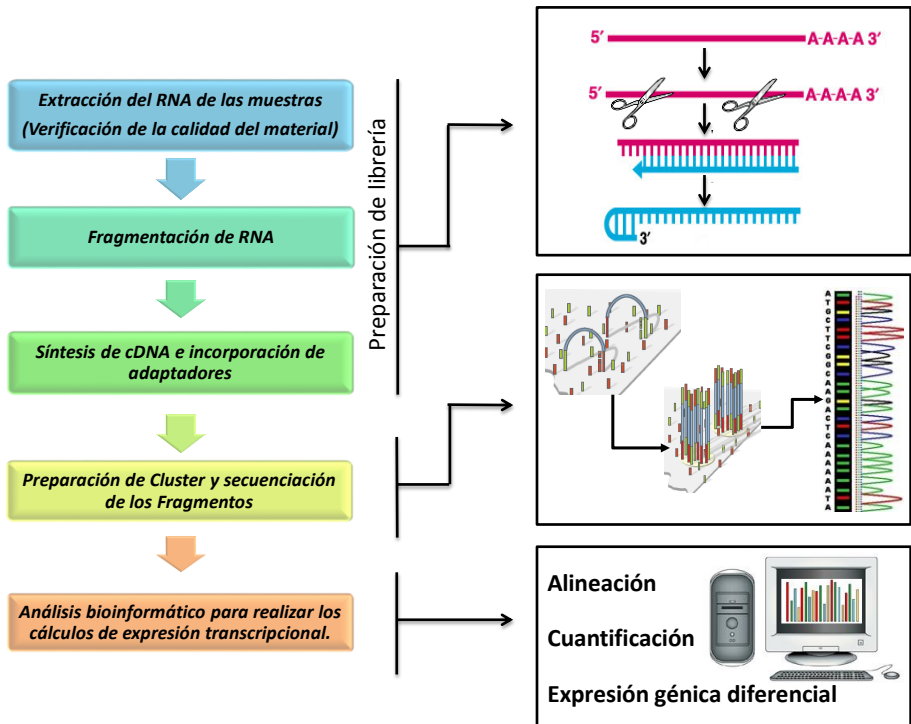


Figura 18. Metodología General de RNA Seq.

1.3.2 Valoración de efectos celulares

Alteraciones en la función y estructura celular son consecuencias de las interrupciones moleculares originadas por la exposición a contaminantes. Por esto, los estudios de toxicidad a nivel celular, conocidos como estudios de genotoxicidad, son muy frecuentes en la evaluación de los efectos generados por contaminantes ambientales, en especial aquellos que se relacionan con los inicios de cáncer (Kang *et al.*, 2013).

Los ensayos de genotoxicidad pueden ser definidos como pruebas *in vitro* e *in vivo*, utilizadas para detectar compuestos que inducen daño genético en las células. Estos ensayos son capaces de identificar daño al DNA y la fijación del mismo (mutaciones, daños cromosomales a gran escala o recombinaciones). Así, un compuesto genotóxico (mutágeno o genotoxina) es un agente químico que puede causar daño cromosomal o al DNA. Estos daños en una célula somática pueden resultar en una mutación de que podría estar asociada a cáncer y en las células germinales, este mismo daño implicaría alteraciones del DNA heredables (Phillips and Arlt, 2009). Han sido desarrollados muchos test *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidad (Zeiger, 2010), en este documento será descrito el Ensayo Cometa que constituye una importante herramienta para el estudio de los efectos celulares de los contaminantes asociados a la minería de carbón.

1.3.2.1 El ensayo Cometa en la evaluación de los efectos celulares causados por la exposición a contaminantes asociados a la minería de carbón. Dentro de las aplicaciones del ensayo cometa, una de las más importantes y documentadas es la valoración de genotoxicidad ambiental y ocupacional. El ensayo cometa en estas áreas permite monitorear la exposición humana a potenciales mutágenos y carcinógenos ambientales tales como gases y material particulado presente en aire contaminado, metales, pesticidas, radiación y otros xenobióticos (Valverde and Rojas, 2009).

Entre los reportes más recientes de evaluación de efectos de la minería de carbón, se señalan incrementos significativos en el índice de daño al ADN en linfocitos aislados de muestras de sangre periférica de trabajadores de la mina de carbón del Cerrejón en Colombia (Leon-Mejia *et al.*, 2011). Estos mismos autores reportaron resultados similares en el año 2007 al analizar muestras de sangre total de ratones provenientes de zonas mineras (Leon *et al.*, 2007). Otros dos estudios realizados en el año 2010, evaluaron los efectos de contaminantes de la minería del carbón en dos tipos de animales, caracol común (*Helix aspersa*) y murciélagos (*Molossus molossus*, *Tadarida brasiliensis* and *Eptesicus diminutus*). En el primer estudio, tras analizar la hemolinfa de los caracoles, se encontró que los animales expuestos al carbón y sus contaminantes asociados, presentaron más altos niveles de daño al DNA al compararlos con el grupo control. Similares resultados fueron encontrados también en la especie de murciélago, *T. brasiliensis*

(Jose *et al.*, 2010;Leffa *et al.*, 2010). Estos antecedentes demuestran que el ensayo Cometa es una valiosa herramienta para la evaluación del potencial genotóxico del polvillo de carbón y sus contaminantes asociados sobre la biota expuesta. A continuación serán precisados los aspectos metodológicos relevantes de este ensayo.

El ensayo cometa también referido como electroforesis en gel de células aisladas (del Inglés: single cell gel electrophoresis assay – SGCE), es una técnica electroforética desarrollada por Ostling y Johanson en el año 1984, que permite visualizar el daño o fragmentación al DNA en células eucarióticas individuales utilizando microscopía (Ostling and Johanson, 1984). Este ensayo se ha convertido en esencial para la evaluación de los efectos genotóxicos de nuevos fármacos u otros compuestos químicos, además de ser útil también como biosensor de contaminación ambiental por genotoxinas en los estudios de monitoreo ambiental. El ensayo cometa también ha sido incluido en estudios de evaluación nutricional, por ejemplo, para determinar el efecto de nutrientes en los niveles de daño al DNA o los beneficios protectores de alimentos ricos en componentes antioxidantes (Collins, 2004).

Tras la técnica inicial del ensayo cometa creada por Ostling y Johanson, a partir de 1988 han surgido varias versiones que implican el uso de condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) y neutras, con el fin de aumentar la sensibilidad y ampliar la detección de un amplio espectro de lesiones en el DNA (Hartley *et al.*, 2011;Olive, 2002;Tice *et al.*, 2000). Hoy en día el ensayo Cometa en medio alcalino es ampliamente utilizado por un número creciente de estudios que evalúan el daño al ADN, haciendo uso de sus principales ventajas: sensibilidad, flexibilidad, bajo costo, fácil y rápida aplicación, además de requerir poca cantidad de células por muestra (Liao *et al.*, 2009;Tice *et al.*, 2000). Dentro de las alteraciones al DNA, el ensayo cometa permite detectar fragmentaciones en una sólo cadena del DNA (SSB), roturas de doble cadena (DSB), sitios lábiles alcalinos (ALS), daño a bases nitrogenadas (usando tratamiento previo con enzimas específicas de acuerdo con la lesión), entrecruzamientos (DNA-DNA, DNA-proteínas) y fragmentos apoptóticos. Adicionalmente, el uso de anticuerpos para detectar aductos del DNA y la utilización de sondas específicas de hibridización *in situ* con fluorescencia (FISH) están comenzando a investigarse a fin de desarrollar sistemas automatizados que acoplen estas metodologías con el ensayo cometa (Dhawan *et al.*, 2009;Hovhannisyán *et al.*, 2004).

El ensayo cometa, se fundamenta en la realización de una suspensión celular, a partir de líneas celulares cultivadas, linfocitos de sangre periférica o células aisladas de varios tejidos, en un gel de agarosa sobre un portaobjetos. Una vez embebidas, las células son lisadas en condiciones alcalinas suaves a fin de remover las proteínas celulares. Las placas son luego expuestas a condiciones alcalinas a fin de relajar el DNA y prepararlo para la electroforesis. Durante la

electroforesis con buffer alcalino, el DNA superenrollado migra lentamente hacia el ánodo, mientras los fragmentos de DNA rotos migran rápidamente generándose la apariencia de un cometa, conformado por una cabeza correspondiente al DNA íntegro y una cola con los fragmentos de DNA. La coloración del DNA con compuestos fluorescentes permite cuantificar el daño por microscopia de fluorescencia, de forma que a mayor tamaño de la cola de cometa, mayor es el daño del DNA en la célula (Azqueta and Collins, 2013). Algunos tipos de daño al DNA detectados por diversas variantes del ensayo cometa, el procedimiento del ensayo cometa alcalino y su variante neutra y un patrón de clasificación de los cometas de acuerdo el grado de daño del DNA son esquemáticos en la Figura 19.

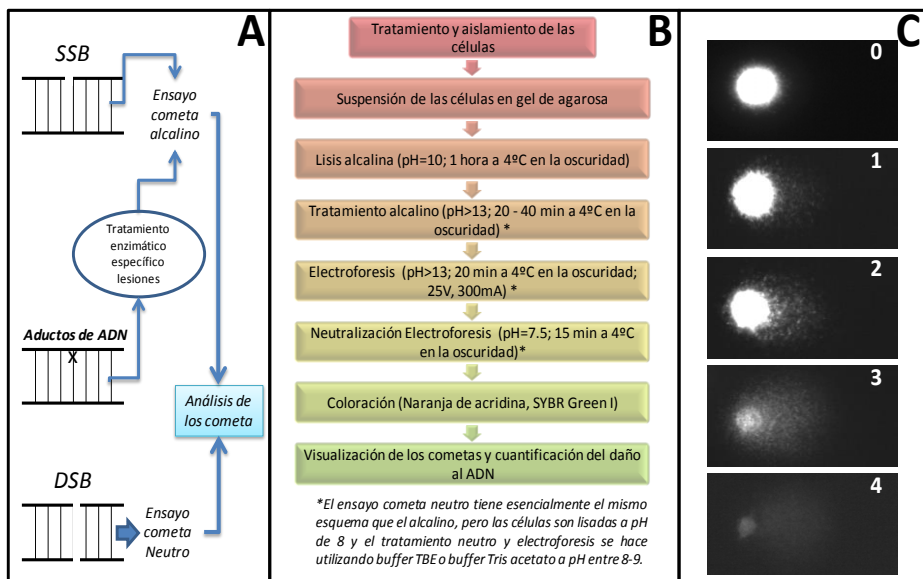


Figura 19. El ensayo cometa. **A**. Tipos de daño al DNA detectados en el ensayo cometa (Olive, 2002) . **B**. Esquema general metodológico del ensayo cometa alcalino y su variante neutra (Azqueta and Collins, 2013). **C**. Patrón de clasificación de los cometas de acuerdo el grado de daño del DNA en células HepG2, que muestra 5 niveles desde el nivel 0, sin daño al DNA hasta el nivel 4 de máximo daño (Azqueta and Collins, 2013).

1.3.3 Valoración de efectos tisulares orgánicos y sistémicos

Las herramientas clínicas de análisis radiográfico y cuantificación de marcadores séricos han sido utilizadas para el diagnóstico y valoración de los efectos tisulares, orgánicos y sistémicos generados por la exposición a xenobioticos. Respecto a la valoración de los efectos generados por el polvillo de carbón, han sido utilizados algunos marcadores séricos del estado oxidante/antioxidante de

mineros expuestos. Así, los niveles séricos de óxido nítrico, malondialdehído, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, carbonil proteínas y antioxidantes como β -carotenos, retinol, ascorbato y α -tocoferol, confirman la existencia de un desbalance oxidativo relacionado con la actividad minera (Tuluze *et al.*, 2011). Otros estudios han sido dirigidos a cuantificar marcadores séricos de inflamación tales como TNF- α y IL-6 (Borm *et al.*, 1988;Zay *et al.*, 1999) y de apoptosis tales como Fas, FasL, Fas/APO-1 (Hoffmeyer *et al.*, 2010;Yuan *et al.*, 2006).

Por otro lado, las alteraciones morfológicas macro y microscópicas en tejidos y órganos, pueden ser determinadas mediante análisis histopatológico. La histopatología es una herramienta ampliamente utilizada para la evaluación de los efectos de contaminantes ambiental en la biota (Wu *et al.*, 2009). Relacionado con la exposición a partículas de carbón, ha sido reportado que el tejido pulmonar de ratas expuestas a polvillo de este mineral, presenta marcada infiltración inflamatoria, observación que se relaciona con la génesis de enfermedades pulmonares crónicas (Pinho *et al.*, 2004).

En este sentido, las biomoléculas cuantificadas en muestras de fluidos biológicos y el examen histopatológico, constituyen un conjunto valioso de biomarcadores para la determinación de los efectos tisulares, orgánicos y sistémicos de exposición a los contaminantes asociados a la minería de carbón, aplicables tanto en individuos habitantes en las cercanías a las minas, como en aquellos estudios experimentales en animales o que emplean especies de biota silvestre expuesta.

1.3.4 Modelos biológicos utilizados en este estudio

1.3.4.1 Especies animales usadas como centinelas ambientales.

El término “centinela” fue aplicado por primera vez en los años 1950s, a especies animales usadas para detectar radioactividad en diversas áreas. Actualmente, para el monitoreo de peligros o riesgos ambientales existen tres conceptos diferenciados que han sido establecidos, de acuerdo con el propósito de uso. Así, el término “Especie monitor” es usado cuando se mide la reducción de rendimiento o funciones propias del organismo; las “Especies indicadoras” permiten determinar una escala de contaminación ambiental de acuerdo a su ausencia o abundancia en un área, y finalmente las “Especies centinela”, permiten evaluar la fracción biodisponible de contaminantes en un ecosistema, al realizar mediciones de su retención y efectos relacionados en diversos tejidos (Beeby, 2001).

Una especie centinela, no humana (ya sea silvestre o doméstica) se caracteriza por estar expuesta a contaminantes químicos, físicos o a un agente infeccioso en su hábitat, el cual es compartido por humanos o son comparables en

concentración. Estas especies deberían ser capaces de responder a los compuestos químicos contaminantes o agentes patógenos, a través de un espectro que incluyera disfunciones reproductivas y de supervivencia, perturbaciones inmunológicas, bioquímicas, cambios anatómicos y/o otros defectos incluyendo cáncer. En la evaluación de los riesgos ambientales, el uso de especies centinelas es el adecuado para monitorear de manera conjunta el riesgo a los humanos y valorar el delicado balance de un ecosistema (Reif, 2011). En la literatura existen estudios que usan animales centinela tanto para valoración de riesgos infecciosos como para exposición a xenobioticos, sin embargo en este documento será realizado énfasis en este último grupo. Tres aspectos que favorecen el uso de este modelo animal de investigación del riesgo ambiental son descritos a continuación.

En primer lugar, muchos animales comparten ambiente con los humanos, frecuentemente consumen los mismos alimentos y agua de las mismas fuentes, respirante el mismo aire y experimentan similares condiciones de estrés asociadas a conflictos humanos y a los avances tecnológicos y urbanísticos de un territorio. En segundo lugar, los animales y humanos responden a muchos agentes tóxicos a través de vías de señalización celular análogas y frecuentemente desarrollando similares enfermedades inducidas por mecanismos patológicos comunes. Finalmente, el uso de especies centinela a menudo permite predecir los efectos a largo plazo generados por la exposición a contaminantes en los humanos, debido a que la esperanza de vida más corta de las especies animales hace que muchas de las condiciones patológicas vinculadas con la contaminación ambiental sean desarrolladas por estos organismos más rápido (Rabinowitz *et al.*, 2008).

En la actualidad los estudios realizados con especies centinela revelan que en su mayoría los animales utilizados son de vida silvestre, respecto a los estudios realizados con mascotas o ganado de diversos tipos. Dentro de los vertebrados, el uso de mamíferos como centinelas de riesgos químicos ambientales ocupa el tercer lugar después de aves y peces, que son las especies mayormente utilizadas (Beeby, 2001). El ratón casero clasificado en la especie *Mus musculus*, de interés en el presente trabajo, ha sido frecuentemente empleados en estudios para la valoración de los efectos de contaminantes ambientales, algunos ejemplos incluyen investigaciones relacionadas con el efecto material particular volcánico (Camarinho *et al.*, 2013), asbesto (Ben-Shlomo and Shanas, 2011) y metales (Sanchez-Chardi *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo anterior, existen oportunidades interesantes para estudiar especies centinelas de mamíferos, habitantes de ecosistemas afectados por contaminantes ambientales tales como los generados por la industria minera carbonífera. La posibilidad de contar con estos modelos animales de valoración de riesgo ambiental ofrece la oportunidad de generar resultados de investigación

relevantes para la salud humana y como soporte para conducir intervenciones en los temas de salud pública y políticas del medio ambiente.

1.3.4.2 Modelo in vivo vertebrado: Embriones de Danio rerio (Zebrafish). Zebrafish (Pez cebra) se producen naturalmente en el sur de Asia y se describió por primera vez por el médico británico Francis Hamilton (1762-1829) en 1822, quien le dio el nombre científico *Brachydanio rerio*. La literatura más antigua se refiere a zebrafish como *Brachydanio rerio*, sin embargo desde el año 1993 desde la publicación de Meyer y col., relacionada con la posición filogenética de esta especie y por voto consensado en la Reunión de Zebrafish de este mismo año, fue establecido que a partir de esta fecha el nombre científico *Danio rerio* debería ser utilizado (Meyer *et al.*, 1993).

Desde su descripción, este pez de origen tropical se convirtió en un habitante popular de acuarios privados. En el siglo XX, además de la popularidad de los acuarios y eventos de exhibición de diversas especies de peces tropicales, un amplio número de especies acuáticas fueron sometidas a investigaciones científicas en el área de la embriología, debido a características tales como la reproducción ovípara y la generación de grandes cantidades de huevos disponibles para los ensayos in vivo (Meunier, 2012).

El primer artículo registrado en la base de datos pubmed sobre investigaciones con este organismo es registrado en el año 1955, sin embargo sólo hasta la década de los ochenta zebrafish generó interés científico, luego que George Streisinger (1927 - 1984), de la Universidad de Oregon, identificara y desarrollara zebrafish como un modelo biológico para el análisis genético del desarrollo en vertebrados, publicando junto con otros autores, el primer artículo con resultados de investigación empleando este modelo y titulado "Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*)" (Halstead *et al.*, 1955; Streisinger *et al.*, 1981). Desde los primeros trabajos de Streisinger hasta la fecha, el número de publicaciones que registran el término "zebrafish" ha sido creciente. Si bien, Streisinger es reconocido como el pionero de este modelo por la comunidad científica (Grunwald and Eisen, 2002), en el año 1967, las investigaciones de Anderson y Battle constituyen un antecedente importante de la utilidad de zebrafish en el área de la toxicología y la farmacología al publicar el artículo titulado "Effects of chloramphenicol on the development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*" (Anderson and Battle, 1967).

George Streisinger, era uno de un puñado de científicos defensores del estudio de la neurobiología con un enfoque genético utilizando este modelo. En la Universidad de Oregon, este investigador desarrolló técnicas para la producción de clones y métodos para la introducción de mutaciones en la línea germinal. Sus estudios, condujeron a la identificación de varias mutaciones que afectaban el

desarrollo embrionario (Felsenfeld *et al.*, 1990;Grunwald *et al.*, 1988;Grunwald and Streisinger, 1992).

Históricamente, los científicos de la Universidad de Oregon han desempeñado y siguen desempeñando un papel importante en el desarrollo del modelo zebrafish, apoyando además a la comunidad científica, con el suministro de información, procedimientos, reactivos y peces (Linney *et al.*, 2004). De hecho, la Universidad de Oregon ha creado en su sitio web, la base de datos <http://www.zfin.org>, que proporciona información y enlaces sobre todos los aspectos de la investigación en zebrafish, el cual puede ser visitado y utilizado por cualquiera interesado en este modelo. Esta Institución, además cuenta con el Centro internacional de Recursos de Zebrafish ZIRC (Zebrafish International Resource Center- <http://zebrafish.org/zirc/home/guide.php>) que ofrece peces de las ocho cepas wild type de *Danio rerio* disponibles para investigación: AB, AB/Tuebingen (AB/TU), Sanger AB Tuebingen (SAT), Tuebingen (TU), SJD, SJA, WLK y TL. De estas, la cepa TU ha sido objeto de investigación en el proyecto de secuenciación del genoma de zebrafish iniciado en el año 2001 por el Instituto Sanger y disponible a través del sitio web <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Drerio/>.

Actualmente, el genoma de *Danio rerio* (cepa Tuebingen), se encuentra secuenciado y disponible en la base de datos del NCBI (The National Center for Biotechnology Information), donde se registra la secuencia de 25 cromosomas y el genoma mitocondrial de este organismo. El número de acceso CABZ01000000, corresponde al genoma completo de zebrafish e incluye las secuencias comprendidas entre los códigos genbank CABZ01000001 y CABZ01119119.

Respecto a la morfología de esta especie, zebrafish es un pequeño pez de aguas dulces tropicales, nativo de la India, con longitud entre 1 y 2 pulgadas. Los estados de desarrollo de zebrafish están bien caracterizados e incluyen la etapa de formación de la blástula que se completa a las 5.35 horas después de la fertilización (hpf); el proceso de gastrulación que se completa a las 10.33 hpf, seguido de inmediato por la etapa de segmentación en la cual se forman los somitas tras 24 hpf. El periodo comprendido entre las 48 y 72 hpf, implica la eclosión de los embriones. La etapa entre 72 hpf y hasta los 29 dpf es el estado larvario de zebrafish, en el cual el organismo comienza a alimentarse lo que sugiere que la mayoría de los órganos han llegado a un estado funcional a partir de los 5dpf. Finalmente se encuentran las etapas de juvenil (30 – 90 dpf) y adulto (90 – 130 dpf) (Eisen, 1996). La Figura 20 muestra las diferentes etapas del desarrollo de zebrafish.

Algunas de las ventajas de utilizar este organismo como modelo, es que sus embriones son transparentes, por lo tanto, anomalías morfológicas pueden ser fácilmente detectadas a través del examen visual microscópico. Una hembra

puede producir de 100 a 200 huevos en cada nidada, lo que permite generar un gran número de progenie para la realización los ensayos en el laboratorio. Los huevos son lo suficientemente grandes para ser fácilmente manipulados y pueden ser fertilizado naturalmente o in vitro. El rápido desarrollo extrauterino de zebrafish permite obtener larvas que nadan libremente y con las características morfológicas y de comportamiento de los adultos en 4-7 días posterior a la fertilización (dpf) (Eisen, 1996).

La fácil visualización de la organogénesis de los embriones es otra de las ventajas de este modelo; por ejemplo, las contracciones cardiacas comienzan durante el segundo día después de la fertilización y todos los órganos importantes pueden ser reconocidos al quinto día. Adicionalmente, el tamaño de esta especie adulta permite aislar cantidades significativas de tejidos específicos para diversos ensayos. Finalmente, cantidad de recursos necesarios para mantener un gran número de peces es modesta (Gerhard, 2007; Gerhard, 2003).

Aunque zebrafish es filogenéticamente distante de los humanos, su desarrollo, utiliza una caja de herramientas genética que es esencialmente conservada entre todos los vertebrados (Canestro *et al.*, 2007). En términos de genoma la arquitectura y la regulación de genes, en zebrafish, lo constituyen como un modelo muy bueno para investigaciones sobre el desarrollo de los diversos sistemas del organismo, así como para otros enfocados a comprender los mecanismos moleculares implicados en la homeostasis, ya que gran parte de la anatomía y la fisiología de los peces es altamente homóloga a los seres humanos (Van de Peer *et al.*, 2009). Así, la respuesta molecular en zebrafish es comparable a la especie humana porque los procesos metabólicos fundamentales y los mecanismos de señalización son marcadamente conservados en ambas especies (Gerhard and Cheng, 2002).

En esta era de las ciencias ómicas, el modelo de zebrafish es un sistema biológico atractivo y clave para el desarrollo de la ciencia, debido a la disponibilidad de recursos genómicos, tras la secuenciación de su genoma. Además, la capacidad de generar zabrafish transgénicos, permite el desarrollo de estudios de sobreexpresión así como la elucidación de genes candidatos (Meng *et al.*, 1999). Hoy en día, diversas investigaciones utilizan especies knockout y knockdown de zebrafish como herramientas genéticas dirigidas al estudio de nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades genéticas y la elucidación de funciones génicas en el desarrollo de los vertebrados (Amacher, 2008; Koudijs *et al.*, 2008). En la Tabla 3 se resumen las ventajas de zebrafish como modelo biológico de investigación.

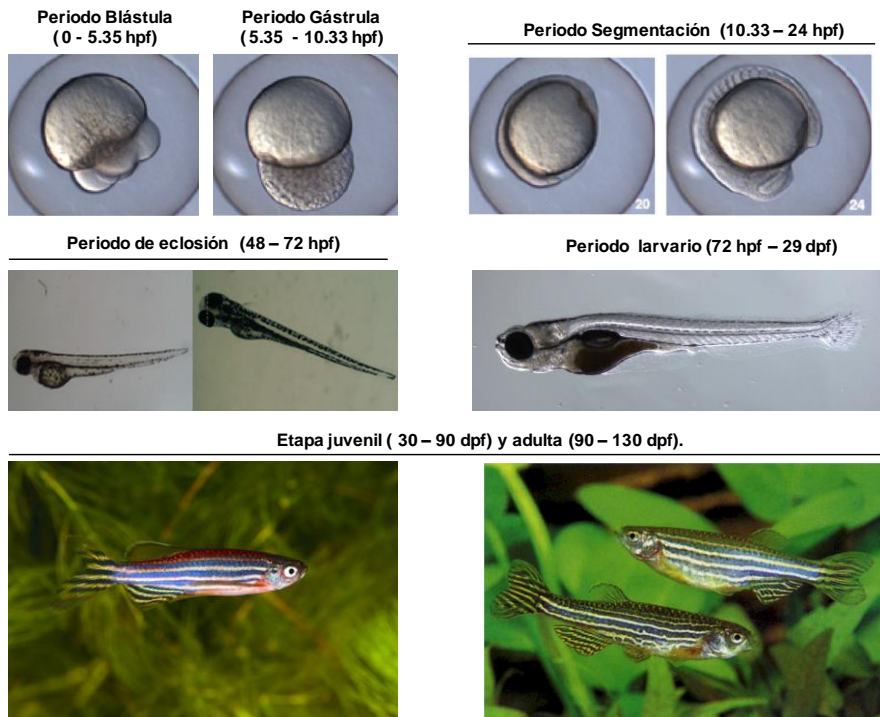


Figura 20. Zebrafish: Etapas de desarrollo. Imágenes tomadas de www.zfin.org.

1.3.4.3 Modelo *in vitro*: Células HepG2. La ATCC (American Type Culture Collection) es la principal fuente mundial de cientos de líneas celulares que en su gran mayoría han sido derivadas desde un cultivo primario, ya sea por subcultivos sucesivos o por transfección con oncogenes, adquiriendo la capacidad de proliferar indefinidamente. La principal ventaja de utilizar cultivos celulares en investigaciones toxicológicas, es la posibilidad de elucidar mecanismos intracelulares mediante la aplicación de herramientas genómicas, proteómicas y metabolómicas. Por esto, la toxicología *in vitro* es un área de acelerado desarrollo y día tras día sigue tomando fuerza como la mejor alternativa para evaluar la seguridad de múltiples compuestos químicos en humanos (Jennings, 2014).

Dentro de las células hepáticas, las Células de Hepatocarcinoma humano (HepG2) han sido ampliamente empleadas como modelo *in vitro* de ensayos toxicológicos. Esta línea celular, patentada en 1980 por investigadores del instituto Wistar en Filadelfia, fue aislada desde el hepatoblastoma primario de un hombre de 15 años, y posteriormente incluida en el listado ATCC con el nombre HB 8065 (Knasmuller *et al.*, 2004; Majer *et al.*, 2004). La morfología de

estas células es similar a las del parénquima hepático, sintetizan y secretan varias proteínas al igual que las células humanas normales y expresan a un nivel comparativo más bajo múltiples enzimas del metabolismo de xenobióticos, incluyendo a la familia de Citocromos P450 y diversos transportadores nucleares (Wilkening *et al.*, 2003).

Tabla 3. Ventajas de zebrafish (*Danio rerio*) como un modelo de vertebrados.

-
- Tiempo de generación rápida (2-3 meses después de la fertilización)
 - Bajo costo y alta densidad de población
 - Desarrollo extrauterino (Larvas pueden nadar libremente a los 4 dpf).
 - Transparencia de los embriones
 - Ideal para la microscopía de pequeño tamaño.
 - Éticamente la mayoría de los experimentos son de fácil justificación tanto en la forma embrionaria como larvaria.
 - Más de 12.000 patrones de expresión génica registrados (incluidos los miRNAs)
 - La transgénesis con vectores retrovirales y de transposones (miles de líneas generadas)
 - Rápida mutagénesis
 - Gran colección de mutantes
 - Permite ensayos de screening farmacológico y toxicológico a gran escala
 - Conservación de las dianas farmacológicas
 - Conservación de neurotransmisores (glicina, GABA, glutamato, dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina, la melatonina)
 - Conservación de la mayoría de los neuropéptidos
 - Conservación de los genes de desarrollo embrionario
-

En el campo toxicológico, la línea celular HepG2 ha sido y continúa siendo empleada para la realización de ensayos de genotoxicidad de una amplia variedad de compuestos incluyendo pesticidas (Ej: Endosulfan, p,p'-Diclorodifeniltricoloroetano), micotoxinas (Ej: Aflatoxina B1, Ocratoxina A), PAH (Ej: Benzopireno, Antraceno), Nitrosaminas y otras sustancias tales como el metanol, etanol y cloruro de cadmio (Knasmuller *et al.*, 2004). En este sentido, las células HepG2 representan una excelente herramienta para la elucidación de los efectos biológicos asociados con la exposición a la mezcla de contaminantes derivados del polvillo de carbón.

1.4

Visión general del sistema de respuesta celular frente a estresores y xenobióticos.

El Consejo Nacional de Investigaciones – USA (National Research Council – NRC) en su reporte titulado “Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy”, define el concepto de vías intracelulares de toxicidad como aquellas que activadas por estresores, tales como contaminantes u otros compuestos químicos, conllevan a cambios en los procesos intracelulares, generando cambios suficientes para acarrear injuria celular y los subsecuentes efectos adversos en la salud (NRC, 2014). Bajo esta perspectiva, el origen de los efectos tóxicos de cualquier sustancia química, es el conjunto de alteraciones en vías intracelulares transductoras de señales, las cuales producen modificaciones estructurales y funcionales de forma secuencial en células, tejidos y órganos, apareciendo finalmente a nivel sistémico, cambios clínicamente relacionados con diversas patologías.

Si bien la valoración de los efectos tóxicos generados por la exposición crónica a contaminantes implica un enfoque integrado de análisis a diversas escalas, incluyendo la sistémica, orgánica, tisular, celular y molecular, el estudio toxicológico a esta última es actualmente un área de investigación crucial y fértil. Gracias a los avances biotecnológicos, los estudios moleculares han permitido la elucidación de diversos mecanismos intracelulares de toxicidad y el descubrimiento de nuevos biomarcadores de exposición, efectos y susceptibilidad a contaminantes. Así, nuevas disciplinas en el campo toxicológico, tales como la tóxico-genómica y la tóxico-proteómica, entre otras, apoyan la generación del conocimiento en investigaciones orientadas hacia el monitoreo y control de la exposición humana y medio-ambiental a tóxicos individuales o mezclas complejas de contaminantes (Decristofaro and Daniels, 2008; Jayapal *et al.*, 2010; Silins and Hogberg, 2011).

La multiplicidad de vías intracelulares que pueden estar afectadas y el desafío de analizar los efectos biológicos de diversos estresores celulares, especialmente cuando son mezclas complejas de contaminantes, como en el caso de industria minera carbonífera, hacen necesario que los estudios toxicológicos moleculares se circunscriban a rutas toxicológicas activadas en respuesta a la exposición a un amplio espectro de contaminantes. En este sentido, sistemas de señalización intracelular, tal como la respuesta al estrés celular, constituyen un punto de partida para el estudio de los efectos causados por diversos contaminantes y su

influencia en la génesis de múltiples enfermedades crónicas (Simmons *et al.*, 2009).

Los humanos y la biota en general están expuestos a un amplio espectro de agentes potencialmente tóxicos a lo largo de la vida, de procedencia endógena en algunos casos y en su mayoría provenientes de fuentes exógenas, tal como los contaminantes ambientales presentes en el aire, agua, suelo y alimentos. Chirstopher Wild definió como “exposoma” a la totalidad de exposiciones ocurridas desde el momento de la concepción del organismo, como un concepto clave para continuar avanzando en el estudio de muchas enfermedades crónicas, que en el 70 a 90% de los casos están asociadas con factores de origen ambiental (Rappaport and Smith, 2010;Rappaport, 2011;Wild, 2005).

A pesar de la complejidad y alto grado de organización estructural y funcional, los organismos reaccionan a cambios ambientales a nivel celular. En condiciones normales, las células responden a señales endógenas, tales como las activadas por factores de crecimiento y otras moléculas que regulan sus condiciones metabólicas, promueven el crecimiento y el adecuado funcionamiento del organismo. De forma similar, las células responden a estresores exógenos tales como sustancias químicas, xenobióticos, calor y radiación iónica, a través de numerosas vías de señalización que integran el sistema de respuesta adaptativa al estrés, con el fin de mitigar el daño y mantener o restablecer la homeostasis celular. Así, el sistema de respuesta al estrés celular es integrado por numerosas vías de señalización o vías de transducción de señales que resultan en la activación transcripcional de genes citoprotectores, también reconocidos como genes de respuesta rápida o temprana al estrés y que pueden ser clasificadas de acuerdo con el tipo de agresión celular en el cual son activadas (Mahadevan *et al.*, 2011;Simmons *et al.*, 2009).

Los diversos tipos de vías adaptativas en respuesta al estrés celular, actúan como un sistema de defensa, con acción temprana frente a la toxicidad generada por químicos, radiación y otros estresores físicos. Estas vías de señalización pueden ser agrupadas de acuerdo a su participación en respuesta a: estrés oxidativo, daño al DNA, choque térmico, inflamación, estrés osmótico, estrés del retículo endoplasmático (RE), estrés por metales e hipoxia. Al ser vías de señalización ubicuas, presentes en todos los tipos celulares y que además son desencadenadas por un amplio grupo de agentes contaminantes, este sistema es esencial para la supervivencia, desarrollo y mantenimiento de las funciones de los organismos. El estudio de estas vías de adaptación ha sido de interés en el campo de la toxicología para la elucidación de efectos, mecanismos de toxicidad, así como para la búsqueda de dianas farmacológicas que permitan controlar de la incidencia y prevalencia de múltiples patologías crónicas y enfermedades genéticas relacionadas con la exposición a contaminantes ambientales y demás estresores celulares (Simmons *et al.*, 2009).

Aunque son numerosas las vías intracelulares implicadas en este sistema, un aspecto o diseño común y básico en todas estas rutas de señalización, es la existencia de tres componentes que actúan en la respuesta celular en cascada, Factor de transcripción (FT), sensor y transductor. El FT es una proteína de unión a DNA que se acopla a regiones denominadas elementos de control o respuesta, para activar el promotor de un gen e iniciar su expresión. El sensor es una proteína que en condiciones basales inactiva el factor de transcripción interactuando físicamente con él para secuestrarlo o degradarlo. Finalmente, el transductor, por lo general, es una enzima de tipo quinasa, que transmite la señal bioquímica (Ej. Fosforilación) que modifica la estructura del FT o del sensor, generando la forma activa del FT capaz de translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes citoprotectores. La respuesta al estrés celular, no está mediada por un único transductor, en realidad, un grupo de transductores activa simultáneamente diversas vías intracelulares adaptativas, en respuesta a la acción de un mismo estresor, produciendo respuestas simultáneas (Simmons *et al.*, 2009). Un esquema del sistema de respuesta al estrés celular y ejemplos de los componentes básicos de las vías de señalización más importantes de cada grupo, es representado en la Fig. 21.

Entre el sistema de vías intracelulares activadas frente a estresores, la respuesta al estrés oxidativo constituye la adaptación más importante frente a los efectos oxidativos generados por diversos agentes tóxicos tales como los metales pesados, dioxinas, hidrocarburos aromáticos polinucleares y material particulado, entre otros (Jomova *et al.*, 2010; Jomova and Valko, 2011; Simmons *et al.*, 2009).

Algunos de estos estresores celulares, integran por ejemplo, la mezcla compleja de contaminantes derivada de la industria minera carbonífera, haciendo que el interés del biomonitorio de los efectos de esta actividad, se oriente hacia la determinación de biomarcadores implicados en rutas de señalización mediadas por desequilibrio oxidativo. De hecho, existe evidencia de efectos tóxicos de la partícula de carbón, tras encontrarse aumento de marcadores de peroxidación lipídica y disminución de la defensa antioxidante en tejido pulmonar de ratas crónicamente expuestas a este mineral, confirmando de esta manera que el estrés oxidativo es uno de sus efectos tóxicos (Pinho *et al.*, 2004).

Precisando aún más los conceptos descritos en párrafos anteriores, el estrés oxidativo involucra el desbalance entre especies oxidantes y componentes antioxidantes a nivel intracelular, debido al incremento de la producción de sustancias oxidantes, o a la reducción de los niveles de antioxidantes. Modificaciones de proteínas celulares, lípidos y DNA son los efectos de este desequilibrio asociado con enfermedades crónicas tales como neurodegeneración, inflamación, aterosclerosis y varios tipos de cáncer (Klaunig *et al.*, 2010; Ma, 2010; Roberts *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2010).

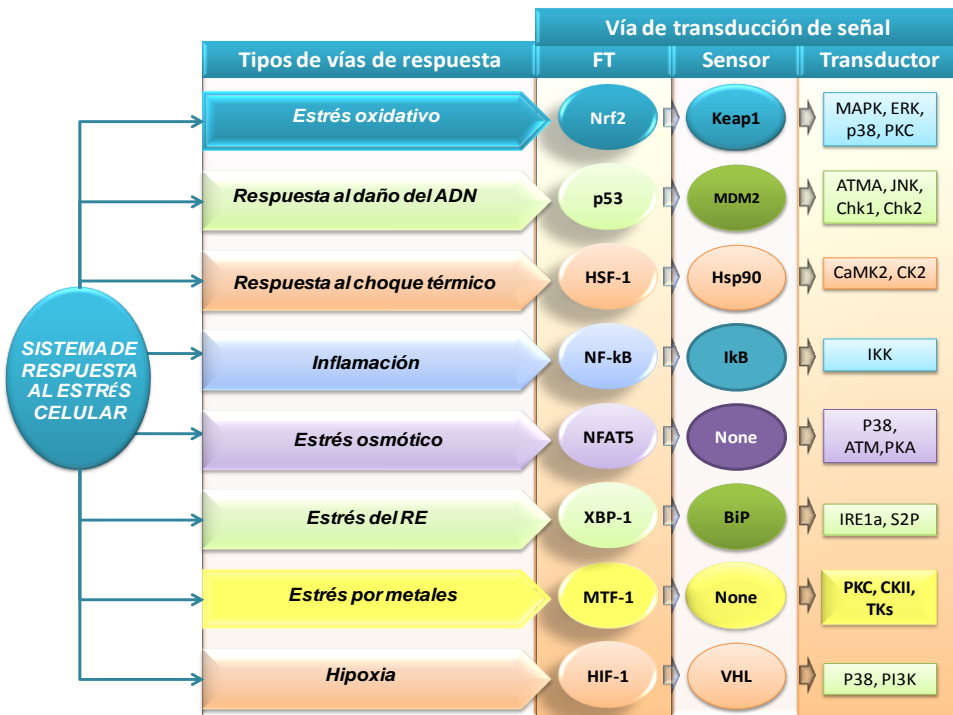


Fig. 21. Principales vías de respuesta al estrés celular y ejemplo de algunos de sus componentes básicos.

Hemos señalado que las sustancias oxidantes incluyen a especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, tales como Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), Radical hidroxilo ($\bullet OH$), Radical Peroxilo ($ROO\bullet$), Radicales orgánicos ($RO\bullet, R\bullet, R-S\bullet$), Ácido hipocloroso ($HOCl$), Ozono (O_3), Oxígeno singlete (1O_2), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y Óxido nítrico (NO). Las fuentes de estas moléculas oxidantes pueden ser endógenas, como las derivadas del metabolismo mitocondrial, acción de los peroxisomas y activación de la inflamación; o por el contrario, pueden provenir de fuentes exógenas tales como la exposición a radiación ionizante y xenobióticos (contaminantes ambientales, agentes terapéuticos y demás compuestos generados de la industria química) (Ma, 2010).

Son diversas las agresiones celulares causadas por los ROS y RNS. A nivel de las membranas, especies desencadenantes de oxidación, tales como el radical hidroxilo, extraen átomos de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados para generar radicales lipídicos, que al reaccionar con el oxígeno originan radicales

que finalmente se degradan formando aldehídos reactivos altamente electrofílicos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-nonenal (HNE), capaces de interactuar covalentemente con proteínas, formando aductos con residuos de cisteína, lisina o histidina (Esterbauer *et al.*, 1991). Adicionalmente, el daño oxidativo mediado por ROS y RNS en las proteínas, produce fragmentación de cadenas polipeptídicas, oxidación de la mayoría de los residuos presentes y la aparición de entrecruzamientos (Stadtman, 2006). Por otro lado, el DNA también es un blanco molecular de estas especies reactivas, cuya acción genera modificaciones en bases, azúcares, proteínas de unión al ADN, mutaciones, errores de replicación e inestabilidad genómica, siendo la formación de 8-hidroxi-deoxi-guanosina, la lesión al DNA más estudiada (Valavanidis *et al.*, 2009).

Dada la relevancia de los efectos tóxicos generados durante condiciones de estrés oxidativo, la célula cuenta con múltiples mecanismos intracelulares de defensa y adaptación, principalmente mediados por factores de transcripción. De hecho, en las dos últimas décadas ha sido demostrada la influencia moduladora del estado redox en gran parte de las rutas clásicas de activación de la transcripción. Así, el estado redox es modulador de sistemas transductores de señales mediados por factores de transcripción tales como el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), proteína activadora 1 (AP-1), β -catenina, Proteína de respuesta temprana al crecimiento 1 (Egr-1), FOXO, receptor glucocorticoide (GR), Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1A), p53, PAX-5, Factor nuclear κ B (NF- κ B), factor estimulador corriente arriba (USF1) y el Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) (Brigelius-Flohe and Flohe 2011).

Entre estos, la vía de señalización Nrf2/Keap1/ARE (Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2/ proteína 1 asociada kelch-like ECH-1 / Elemento de respuesta antioxidante) ha sido una ruta de respuesta adaptativa al estrés oxidativo ampliamente investigada, emergiendo como una vía de señalización centinela capaz de inducir una amplia y diversa batería de genes, las cuales de forma colectiva favorecen la supervivencia celular frente a la toxicidad generada por la exposición a diversas moléculas electrofílicas u oxidantes (Klaassen and Reisman, 2010). Una síntesis del origen y los efectos del estrés oxidativo son presentados en la Figura 22.

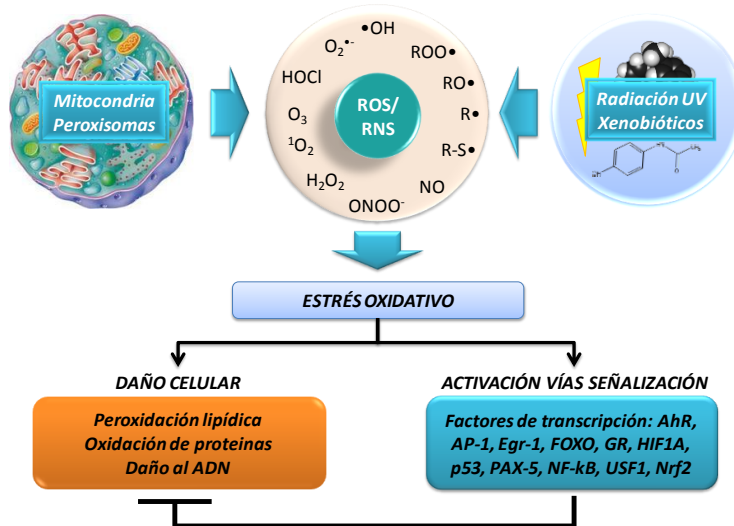
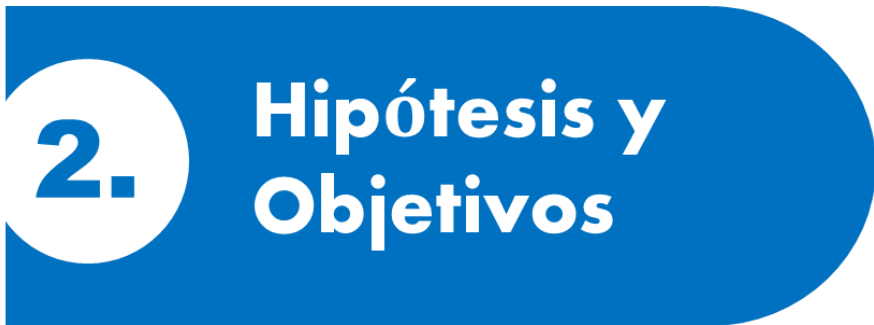


Figura 22. Origen y efectos del estrés oxidativo

La vía Nrf2/Keap1/ARE, puede ser inducida por estrés oxidativo, estrés en el retículo endoplasmático, así como por moléculas pequeñas (inductores) estructuralmente diversas, tanto de origen endógeno como exógeno. Los inductores pueden ser divididos en 10 categorías principales: difenoles, fenilendiaminas y quinonas; aceptores Michael; isotiocianatos; 1,2-ditioil-3-tionas; hidroperóxidos; compuestos trivalentes de arsénico; iones de metales pesados; mercaptanos vecinales; carotenoides y compuestos de selenio. Adicionalmente, complejos de hemo, lipoproteínas oxidadas, moléculas tales como CO, NO, ONOO⁻, HOCl, •OH, H₂O₂, O₃ y las condiciones de isquemia, hiperoxia e hipoxia, han sido registrados como otros factores capaces de activar la expresión de genes regulados por esta vía de señalización (Brigelius-Flohe and Flohe, 2011; Hur and Gray, 2011; Tkachev *et al.*, 2011).

La vía de transducción de señales Nrf2/Keap1/ARE controla la expresión de múltiples proteínas citoprotectoras de características diversas en respuesta a estresores exógenos. La expresión de estas moléculas puede ser cuantificada y empleada como biomarcador de la activación de Nrf2. Por ejemplo, la evaluación de NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1); Glutacion-S-transferasas (GSTs); Hemoxigenasa 1 (HO-1 ó HMOX1) y Metalotioneínas (MTs), para el caso específico de los contaminantes asociados al polvillo de carbón, permite proponer mecanismos de toxicidad y seleccionar biomarcadores para continuar avanzando en la elucidación de efectos patológicos en la biota expuesta (Kensler *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2009).



2. Hipótesis y Objetivos

2.1

HIPÓTESIS

La exposición a contaminantes derivados del polvillo de carbón genera modificaciones en la integridad del genoma, cambios en la homeostasis transcripcional y alteraciones en el desarrollo embrionario.

2.2

OBJETIVOS

2.2.1 General

Determinar los efectos genotóxicos y transcripcionales asociados con la exposición a contaminantes derivados de la minería de carbón en ratones silvestres, células HepG2 y embriones de Pez Cebra.

2.2.2 Específicos

Valorar el perfil transcripcional de genes implicados con vías de respuesta al estrés celular, daño al DNA, y metabolismos de xenobióticos en ratones silvestres provenientes de zonas mineras carboníferas.

Estimar el potencial citotóxico, genotóxico y los cambios transcripcionales de un extracto de polvillo de carbón en un sistema *in vitro* (células HepG2).

Establecer las alteraciones en el desarrollo embrionario producidas por un extracto de polvillo de carbón, usando embriones de *Danio rerio*.

3.

Trabajos Experimentales

Heavy metals in wild mice from coal mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and metal exposure.

Angélica Guerrero-Castilla¹, Jesús Olivero-Verbel^{1*}, José Marrugo-Negrete²

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences. Environmental and Computational Chemistry Group. University of Cartagena, Cartagena, Colombia.

²Water, Applied and Environmental Chemistry Group. University of Cordoba. Montería, Colombia.

*Corresponding Author. Jesus Olivero-Verbel. Ph.D Environmental and Computational Chemistry Group. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Cartagena. Campus of Zaragocilla. Cartagena, Colombia. E-mail: joliverov@unicartagena.edu.co.

Originalmente publicado en: Mutation Research 762 (2014) 24–29.

Abstract

Coal mining is a source of pollutants that impact environmental and human health. This study examined metal content and the transcriptional status of gene markers associated with oxidative stress, metal transport and DNA damage, in livers of wild mice collected near coal mining operations, in comparison with those obtained from a reference site. *Mus musculus* specimens were caught from La Loma and La Jagua, two coal mining sites at the north of Colombia, as well as from Valledupar (Cesar Department), a city located 100 km north the mines. Liver concentrations of Hg, Zn, Pb, Cd, Cu and As were determined by differential stripping voltammetry, and real-time PCR was used to measure gene expression. Compared to the reference group (Valledupar), concentrations of Cd, Cu and Zn were significantly greater in animals living near mining areas. In exposed animals, the mRNA expression of NQO1, MT1, SOD1, MT2, and DDIT3 was 4.2-, 7.3-, 2.5-, 4.6- and 3.4-fold greater in coal mining sites, respectively, than in the reference site ($p < 0.05$). These results suggest that activities related to coal mining may generate pollutants that could be impacting the biota, inducing the transcription of biochemical markers related to oxidative stress, metal exposure, and DNA damage. These changes may be in part linked to metal toxicity, and could have implications for the generation of chronic diseases. Therefore, it is essential to implement preventive measures to minimize the effects of coal mining on its nearby environment to protect human health.

Keywords: Environmental Pollution, gene expression, differential stripping voltammetry.

1. Introduction

Coal is a fossil fuel, considered as one of the two main energy sources used in the world [1]. However, it is well known that coal mining has negative impacts in the environment and in human health during all stages of the process [2]. In developing countries, coal-mining areas are characterized by socioeconomic disadvantages and riskier health behaviors, leading to environmental degradation and reduced life quality [3]. Several studies have reported a direct relationship between coal production and increased mortality, associated with cardiopulmonary diseases and kidney damage, in workers and residents near coal mines [4-7], as well as greater risk of hypertension- and chronic obstructive pulmonary disease-related hospitalization [8]. Other studies have pointed out the link between coal mining and the prevalence of neural tube defects in these areas [9].

Although many chemicals have been detected as pollutants derived from coal mining, dust particles, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heavy metals and fluorine, have been identified as major pollutants originating from this process [10]. These pollutants may exert changes in the mRNA expression of genes involved in cellular functioning such as xenobiotic metabolism and

transport, inflammation, cell growth, cellular differentiation, and specific adaptive stress response pathways, among others [11]. Metal exposure, in particular, may lead to the disruption of signaling events involved in regulation of cellular proliferation and DNA repair, modulating genes such as the DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3), Xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC), cyclin D1 (CCND1) and the myelocytomatosis oncogene (MYC) [12]. These chemicals may also be responsible for the generation of oxidative stress, with the consequent activation of cytoprotective genes, such as glutathione peroxidase 3 (GPX3), NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1), metallothionein I (MT-I), and superoxide dismutase 1 (SOD1) [13-15]. On the other hand, the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) is the most important cellular response induced by PAHs [16,17]. This response initiates the activation of a battery of genes such as the cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1), which in turn, increases the toxicity of PAHs by forming reactive molecules that produce DNA adducts, UDP glucuronosyltransferase (UGT1A2), and Glutathione-S-transferase (GSTA1) [18].

The combined effects of the mixture of chemicals leached by coal particles may induce a sustained cellular stress and damage that could lead to the development of a number of diseases in exposed organisms. Accordingly, it is not surprising that cancer, chronic lung and cardiovascular diseases are considered the main toxic effects of coal mining, emerging from a common context of oxidative stress and DNA damage, derived from released pollutants [5,19,20]. The aim of the present study was to determine the concentrations of several metals in liver tissue, as well as the status of different molecular markers (oxidative stress, metal exposure, DNA damage, xenobiotic metabolism) in mice (*Mus musculus*) from areas with coal mining operations, comparing them to a reference site where these activities are not performed.

2. Materials and Methods

2.1 Collection of specimens and extraction of tissue sample

Mus musculus specimens were collected in 2010 and 2011 using medium-size Sherman live traps (H.B. Sherman Traps, Inc, Tallahassee, FL, USA), placed inside houses at two different locations within the coal mining area at the Department of Cesar, Colombia: La Jagua (10°31'19"N, 73°18'56"W) and La Loma (10°23'58"N, 75°30'9"W). Mice were also captured from a reference site, Valledupar (10°28'06"N, 73°15'04"W), the capital city of the Department (approx. 100 km far from the coal mining area), in a neighborhood with urban features similar to those observed in coal mining areas. Specimens were equally processed and used for comparative purposes. A description of the characteristics of animals captured in sampling locations is shown in Figure 1. Mice were anesthetized with sodium pentobarbital until deep anaesthesia and

then euthanized by exsanguination. Liver was removed and a section immediately stored in RNALater® (Qiagen, California, USA) for gene expression analysis. An additional section (500 -700 mg) was stored in empty tubes and kept at -20°C for metal analysis.

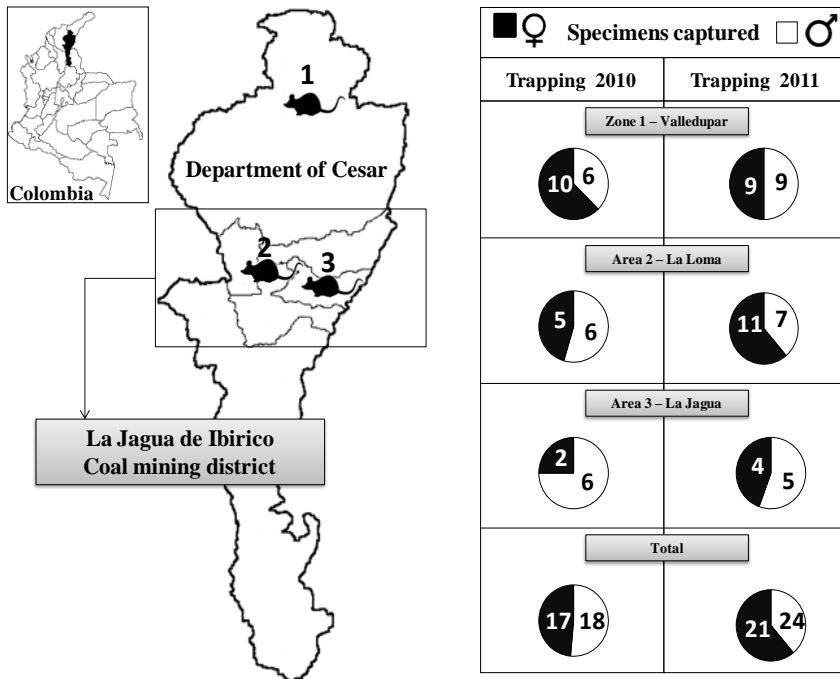


Fig. 1. General characteristics of *Mus musculus* specimens captured in study areas during 2010 and 2011.

2.2 Metal analysis

A liver sub-sample between 80 and 150 mg, accurately weighed to 0.1 mg, was digested with 3 mL nitric acid at 100°C for 30 min. Once at room temperature, the cold sample was added 1 mL hydrogen peroxide (H₂O₂) and digested again for 1 hour in a Memmert thermostatic bath.

The concentrations of Zn, Pb, Cu and Cd were determined by differential stripping voltammetry (DPASV) using a Metrohm (Herisav, Switzerland) trace analyzer model 746 VA processor, in combination with a Metrohm model VA 747 Stand. This stand consisted of a dropping mercury electrode (HMDE), a silver/silver chloride/potassium chloride reference electrode, and a platinum auxiliary electrode under Metrohm Application Bulletin 231/2e. The analysis of

As and Hg was performed by DPASV using a gold electrode as working electrode under Metrohm Application Bulletin 96/5e and 226/2e, for arsenic and mercury, respectively [21-23].

The reagents used in the analysis were: stock solutions (1 g/L) of Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, As⁵⁺, and Hg²⁺. NaOH, KCl, HCl, NaCl, Na₂H₂EDTA, and HClO₄ were Suprapur or analytical quality. The solution to be analyzed was prepared employing 10 mL of sample diluted with 1 mL of KCl, CH₃COOH as supporting electrolyte (buffer), adjusting the pH to 4.6 ± 0.2. Standard solutions were utilized as follows: Zn²⁺ =10 mg/L, Pb²⁺=0.5 mg/L, Cu²⁺ =2.5 mg/L and Cd²⁺=0.1 mg/L.

In the case of As, the solution contained 10 mL of sample diluted with 10 mL 30% HCl as supporting electrolyte, together with 1 mg/L As(V) standard solution. Hg analysis was performed with 10 mL of diluted sample and 1 mL of supporting electrolyte (0.35 g NaCl and 1.50 g of Na₂H₂EDTA, dissolved in 500 mL of ultrapure water, 22 mL of 60% HClO₄ and decanted to 1L), adding a standard solution of Hg²⁺ = 1 mg/L. The conditions of analysis for each metal are shown in Table 1. The detection limit (S/N=3) for studied metals was 0.05 µg/g, with the exception of Pb for which this was 0.025 µg/g. Quality control was performed by triplicate analysis of a standard reference material (DOLT-4, Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals; National Research Council Canada). Accuracy, expressed as recovery average, ranged between 94.1% and 103.6%, and precision, as variation coefficient varied between 3.4% and 7.1%.

Table 1. Experimental conditions for voltammetric analysis of Zn (II), Cd(II), Pb(II), Cu(II), As(V) and Hg(II).

Working electrode	Zn (II), Cd(II), Pb(II), Cu(II)	As(V)	Hg(II)
	HMDE	RDE-Au	RDE-Au
Ed	-1.15	-1.2	0.37
Ef	0.05	0.3	0.7
td	90	10	90
tr	10	2	5
dE/dt	0.06	0.02	0.02
ΔE	0.05	0.05	0.05
t	0.02	0.02	0.04
v	0.03	0.04	0.03
r	2000	2000	2000

Ed: Deposition potential (V/Ag, AgCl, KCl. sat); Ef: Final potential (V/Ag, AgCl, KCl (sat); td: Deposition time (s); tr: Delay time before potential sweep (s); dE/dt: potential scan rate (V/s); ΔE: amplitude of superposed press [Pulse width overlay] (V); t: Pulse duration (s); v: Pulse repetition; r: Stirring rate (rpm);

HMDE: Hanging mercury drop electrode [Hg electrode]-Au; RDE: Rotating gold electrode. Experimental peak potential (V/Ag, AgCl, KCl (sat)): 0050±0002 As (V), +0.60±0.007 Hg (II), -0.98± 0.005 Zn (II), -0.56±0.01 Cd (II), -0.38±0.02 Pb (II), -0.10±0.005 Cu(II).

2.3 Gene expression assays

RNA was isolated from the liver using RNeasy® Mini Kit (Quiagen, California, USA) as described by the manufacturer. The concentration of RNA was determined by spectrophotometry (A260) and purity was assessed by the A260:A280 ratio (1.9 – 2.0). The integrity of RNA was checked by visual inspection of 28S and 18S ribosomal RNA on an agarose gel. Aliquots of RNA samples of RNA were stored at -80°C until analysis.

For each sample, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). The resultant cDNA was used as the template in a 20 µL PCR reaction containing 10 pmol each of forward and reverse gene-specific primers. Real time-PCR was conducted utilizing a StepOne® System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reactions were performed in MicroAmp optical 48-well reaction plates (Applied Biosystems) using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). PCR conditions were as follows: Initial denaturation and enzyme activation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min. In total, 12 genes were analyzed, including two housekeeping genes. Gene names, accession numbers, forward and reverse primer sequences, as well as amplicon sizes are listed in Table 2. The selection of these biomarkers was based on their widespread use to study the molecular effects of pollutant mixtures on various species considered sentinel organisms. Transcriptional changes in chosen genes have received special attention as they account for the evaluation of oxidative stress, PAH exposure, DNA damage, and metallothionein-related metal transport [24-25]. Changes in gene expression were determined using GAPDH and RPS19 as reference genes (housekeeping), and the comparative CT (ΔΔCT) method was utilized to determine the relative target quantity. All experiments were run by duplicates and negative controls contained no cDNA [26-28].

2.4 Statistical analysis

The data are presented as the mean±SE. Differences between two means was assessed utilizing t-test. In the case of comparisons for more than two groups, ANOVA was employed with log-transformed data, followed by Tukey multiple comparisons test. When normality was not achieved in the data sets after transformation, Kruskal Wallis was used instead, followed by Dunn’s multiple-comparison test. Significance was set at p<0.05. All statistics were performed by means of GraphPad Prism 5.0.

3. Results

3.1 Metal analysis

Concentrations of Pb, Cd, As, Hg, Zn and Cu in the liver of feral mice (*Mus musculus*) collected in Valledupar, La Jagua and La Loma in 2010 are shown in Table 3. Compared with Valledupar, La Jagua presented higher levels of Cu and Cd, whereas La Loma showed greater concentrations of Cu and Zn. In 2011, samples were collected only in Valledupar and La Loma, and the results are shown in Table 4. Similarly to the observations in 2010, samples collected in La Loma showed higher Zn concentrations than those from Valledupar. In addition, the samples from La Loma showed significantly higher levels of Cd compared with the reference site.

3.2 Gene expression

Analysis of hepatic mRNA expression revealed that mice living in areas located near coal mines presented a gene expression profile that was different from that in samples from the reference site (Valledupar). In 2010 these changes were detected for the expression of genes associated with oxidative stress, metal transport and DNA damage (Table 5, top panel). The mRNA expression of NQO1 (up to 2.2-fold), MT1 (up to 7.3-fold) and MT2 (up to 3.7-fold) in mice from La Jagua, were significantly higher compared to Valledupar. Animals from La Loma, the other coal-extraction area, showed decreased expression of GPX3 (33.3-fold) and MYC (20-fold) when compared to the reference site. In contrast, SOD1 (up to 2.5-fold) and DDIT3 (up to 3.4-fold) were over-expressed. CCND1, CYP1A1, and DMT1 expression, were unchanged in mice captured around mining areas in 2010.

The rodents collected in 2011 showed similar results to those from 2010 (Table 5, bottom panel). The expression of MT1 mRNA (up to 4.6-fold) in La Jagua was significantly higher than the reference site, and MYC showed decreased expression (about 6.2-fold). Compared with Valledupar, NQO1 (up to 4.2-fold), MT1 (up to 4.5-fold) and MT2 (up to 4.6-fold) in La Loma, were overexpressed, while the expression of CCND1 and CYP1A1 was diminished (about 7.1- and 12.5-fold lower, respectively). The expression of DDIT3, SOD1, and DMT1 GPX3, did not present significant differences between groups with any of the two housekeeping genes used. Interestingly, when data from 2010 and 2011 were pooled, the gene expression profile still showed some significant differences for several genes between sampling sites (Supplementary Table 1). In particular, when both housekeeping genes are considered, compared to the reference site, hepatic NQO1 mRNA was overexpressed in mice from La Loma, whereas MT2 was overexpressed for both mining sites. In contrast, only GPX3 was found to be down-regulated in mice from La Loma.

4. Discussion

This study showed that compared to Cd, Cu and Zn in liver tissue of mice collected around coal-mining areas was higher than in mice collected at a reference site. However, no significant changes were detected for pollutants such as As, Hg and Pb. It has been stated that coal-mining operations are linked to exposure to particular metals [29,30], and once those have reached soils and aquatic ecosystems, they impose a health risk to inhabitants of impacted areas [31]. Metals such as Pb, Cd, Hg, Mn, Ni, Cr, as well as the metalloid As, have been reported as major hazardous elements in different types of coal [32]. In fact, soil samples from coal mining regions have been found polluted by As, Mn, Zn, Pb and Ti [33]. Similarly, the analysis of drinking and irrigation waters from an area near a coal mine in Bangladesh, confirmed the presence of Mn, Cu, Co, Zn, Pb, Sr and Ni, as a result of contamination by acid mine drainage, thereby affecting human and ecosystem health [34]. Moreover, it has been reported that up to 85% of the children living in towns adjacent to coal mines may have toxic serum levels of Cd ($> 0.5 \mu\text{g/dL}$) [35]. Environmental Cd has been proven to induce damage primarily to the kidneys and liver [36], involving an oxidative stress-mediated mechanism [37]. In addition, the presence of other metals such as Pb and Cu, has been involved in the progression of the toxicity by this metal [38].

Cd, Cu and Zn belong to the group of heavy metals. However, Cu and Zn are required by mammals, whereas Cd is considered a toxic element. In general, toxic heavy metals are usually related to the development of various types of cancer, neurodegeneration, reproductive disorders, diabetes, chronic renal diseases, lung and liver pathologies, among others [39,40]. Usually these elements have the potential to induce damage in the genetic material through different molecular mechanisms, such as oxidative stress [13, 41-45], blocking of DNA repair processes [46,47] and alterations in the regulation of cell proliferation [48,49]. These effects are likely to occur through the Haber-Weiss and Fenton reactions, generating hydrogen peroxide and hydroxyl radicals [41,42]. The production of ROS, not only causes tissue damage. In the lung, it activates transcription factors such as the nuclear factor kappa-B and activator protein 1, which induce the transcription of inflammatory cytokines, chemokines and growth factors associated with the formation of lung damage and fibrosis, characteristic of the coal worker's pneumoconiosis, the major occupational lung disease associated to coal mining [50].

The exposure of heavy metals and other pollutants related with coal-mining activities, results in transcriptional activation of cytoprotective genes, also known as rapid stress-response genes [29,51]. Among the intracellular pathways activated upon environmental stress, oxidative and DNA damage are common features of several toxic agents, such as heavy metals, polynuclear aromatic hydrocarbons and particulate material [52-54]. In this work, some biomarkers

related to cellular stress responses were significantly overexpressed in hepatic tissue of mice captured in coal-mining areas.

It has been shown that metal-induced changes in mRNA expression of NQO1, a marker overexpressed in mice living near coal mining operations, involves the transcription factor NRF2 (Nuclear factor erythroid 2 - related factor 2) and the antioxidant response elements (ARE) [52]. NRF2 activation has been related to the overexpression of metallothioneins and NQO1 [55,56]. In this study, not only NQO1 (up to 2.2-fold), but MT1 (up to 7.3-fold) and MT2 (up to 3.7-fold) were overexpressed in exposed mice, probably suggesting that coal-mining derived pollutants may activate the Nrf2 pathway to promote oxidative stress. Moreover, the fact that MT2 was overexpressed independently from variables such as the sampling site and the time of specimen collection, give this gene an advantage as a biomarker of probably exposure to coal mining operations in the biota. However, additional studies are necessary to confirm this hypothesis.

The induction of DDIT3 was observed in the liver of mice exposed to coal mining in La Loma. This gene is frequently up-regulated in response to cellular stress and DNA damage [56], and this may indicate that signaling pathways linked to DNA damage could be targets of coal mining-derived pollutants. On the other hand, the overexpression of DDIT3 may probably be related to the high levels of Zn found in hepatic tissue. Zn is an essential structural component for important antioxidant defense proteins and DNA repair enzymes, characteristic that reinforces the role of Zn in the maintenance of genome integrity [57].

In 2010, small, but not significant changes in CYP1A1 expression were observed in La Jagua, probably due to PAH exposure. However, the general tendency for this gene was to be down-regulated. It is known that induction of CYP1A1 is mediated by AhR, promoting oxidative DNA damage [58-60]. However, the significant low CYP1A1 expression observed in La Loma could be associated with development of concomitant inflammatory processes [62,63]. It is clear that additional studies are required to determine expression of other genes involved in Phase I/II metabolism in hepatic tissue of animals exposed to coal mining. On the other hand, genes such as CCND1, DMT1 and SOD did not show significant differences in expression between groups, suggesting that coal exposure induces a specific but complex gene expression profile, probably linked to the nature of the mineral composition.

As expected, results presented here may show the differential effects of environmental sampling conditions on both hepatic gene expression profile and metal content in the liver. During 2010, mice collection was conducted at the middle of a Niña period in the study area, whereas the 2011 campaign occurred after the massive rain and flooding period had finished. This means that during the last specimen sampling, most of the pollution may have been washed away,

and this was reflected in the lower metal concentrations found in the liver (See Tables 3 and 4). Moreover, it is worth it to mention that if data presented here showed that exposed mice are impacted during heavy rainy seasons, the situation under dry conditions should be extremely critical, and deserves future investigations.

As the discussion detailed here has been performed for pooled data, that is, without discriminating by sex, it was decided to reanalyze the data considering this variable. The results are presented in Supplementary Table 2. Interestingly, compared to the reference group, NQ01 (2011), MT1 (2010 and 2011) and MT2 (2011) were overexpressed in exposed individuals, even when data were separated by sex. These findings may highlight that for these particular genes, the sex-linked variability of the expression in the experimental units, was not big enough to limit the detection of significant molecular effects entirely induced by the environmental conditions of the sampling site. Accordingly, this information should encourage continuing using wild organisms to assess molecular changes derived from environmental exposure to pollutants. In some cases, as depicted here, the magnitude of the effects may be large enough to make visible the effects of the pollution in the biota, even if the examined sample is not homogenous in terms of size or sex.

In short, mice living near coal mining operations may be exposed to complex mixtures of environmental pollutants that alter their biochemical and cellular status. Animals collected from these industrial areas in Colombia presented greater hepatic concentrations of some metals, such as Cu, Cd and Zn, than those from a reference site. These findings appeared together with variations in mRNA expression of genes related to oxidative stress, metal transport and DNA damage. These data are the first to show liver gene expression changes in wild mice exposed to coal mining. Accordingly, preventive measurements should be taken to reduce human and environmental health risks derived from these activities.

Acknowledgements:

The authors thank Barbara Arroyo, Liliana Carranza, Lina Bertel, Karen Franco, Bertha Gastelbondo, Monica Moreno, Leonor Cervantes and Homer Corrales for their assistance during the experiments. This research was supported by the Government of the Department of Cesar, Valledupar (Grant 1235/09), the University of Cartagena, Cartagena, and the Administrative National Department of Science, Technology and Innovation of Colombia, Bogota, Colombia (Colciencias) (Grants 110749326186 and 1112-493-26226).

Table 2. Primer sequences for Real-Time PCR.

Gene name	Gene symbol	Entrez Gene ID	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Amplicon size
<i>Oxidative Stress</i>					
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	<i>NQO1</i>	18104	CAATCAGCGTTCGGAATTACGA	GAAGAGCCCTGATTGTACTGGC	76 pb
Superoxide dismutase 1	<i>SOD1</i>	15368	GGAGATAGAGCGCAACAAGC	GACATGGCCTTCTGGTATGG	105 pb
Glutathione peroxidase 3	<i>GPX3</i>	14778	CCTTTTAAGCAGTATGCAGGCA	CAAGCCAAATGGCCCAAGTT	185 pb
<i>PAH exposure</i>					
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP1A1</i>	13076	TCTCGTGGAGCCTCATGTACCT	TGATTGGCAGAGATCGGCA	90 pb
<i>DNA damage</i>					
DNA-damage inducible transcript 3	<i>DDIT3</i>	13198 17869	TATCTCATCCCCAGGAAACG	AAACAGAGTGGTCAGTGCCC	218 pb
Myelocytomatosis oncogene	<i>MYC</i>		AGTGCATTGACCCCTCAGTGGTCTTTCCC	AACGTCTTGGAACGTCAGAGGAGGAACGAGCTG	547 pb
Cyclin D1	<i>CCND1</i>	12443	ACCCTGACACCAATCTCCTCAAC	CAGAAGGAGATTGTGCCATCCA	116 pb
<i>Metal Transporters</i>					
Metallothionein 1	<i>MT1</i>	17748	AATGTGCCAGGGCTGTGT	GCTGGGTTGGTCCGATACTATT	110 pb
Metallothionein 2	<i>MT2</i>	17750	CCTGTGCCTCCGATGGAT	ACTTGTGCGGAAGCCTCTTTG	152 pb
Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters)	<i>DMT1</i>	18174	AGGAAGTGCGGGAAGCCAATAAGTA	ACACGACAAAGACATTGATGATGAA	87 pb
<i>Housekeeping</i>					
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	14433	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	TGAAGGGGTCGTTGATGGC	124 pb
Ribosomal protein S29	<i>RPS29</i>	20090	TCTACTGGAGTCACCCACGGAA	GGAAGCACTGGCGGCACA	114 pb

Table 3. Concentrations of metals ($\mu\text{g/g}$, fw) in the liver of *Mus musculus* collected in Valledupar, La Jagua and La Loma in 2010.

Metals	Reference site	Mining area	
	Valledupar	La Jagua	La Loma
As	0.34 \pm 0.06	0.35 \pm 0.10	0.24 \pm 0.08
Cu	4.38 \pm 1.33	22.29 \pm 7.82*	13.84 \pm 2.01*
Cd	0.58 \pm 0.14	2.36 \pm 0.86*	0.55 \pm 0.27
Hg	0.19 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03
Pb	0.17 \pm 0.06	0.18 \pm 0.03	0.35 \pm 0.08
Zn	4.68 \pm 1.33	2.20 \pm 0.87	16.73 \pm 4.73*

*. Significant difference ($p < 0.05$) compared to the reference site.

Table 4. Concentrations of metals ($\mu\text{g/g}$, fw) in the liver of *Mus musculus* collected in Valledupar and La Loma in 2011.

Metals	Reference site	Mining area
	Valledupar	La Loma
As	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
Cu	1.85 \pm 0.31	1.39 \pm 0.15
Cd	0.04 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02*
Hg	0.16 \pm 0.05	0.33 \pm 0.06
Pb	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01
Zn	1.74 \pm 0.13	2.53 \pm 0.20*

*. Significant difference ($p < 0.05$) compared to the reference site.

Table 5. Hepatic mRNA expression of different biochemical markers in mice from coal mining areas, collected in 2010 (top panel) and 2011 (bottom panel). Oxidative stress (GPX3– Glutathione peroxidase 3; NQO1 – NAD(P)H dehydrogenase, quinine 1; SOD1– Superoxide dismutase 1), metal transport (MT1 - metallothionein 1; MT2 - metallothionein 2, DMT1 (SLC11A2) - solute carrier family 11 proton-coupled divalent metal ion transporters, member 2), DNA damage (CCND1 - cyclin D1; MYC -v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog; DDIT3 - DNA-damage-inducible transcript 3) and PAH exposure (CYP1A1 - Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1). Gene expression was normalized to GAPDH and RPS29. *. Significant difference (p <0.05) compared to the reference site.

Pathway	Gen	Relative gene expression to GAPDH (Mean ± SE)			Relative gene expression to RPS29 (Mean ± SE)		
		Reference site	Coal mining areas		Reference site	Coal mining areas	
		Valledupar	La Jagua	La loma	Valledupar	La Jagua	La loma
2010							
Oxidative stress	NQO1	1.00 ± 0.10	1.94 ± 0.33*	1.13 ± 0.17	1.00 ± 0.12	2.20 ± 0.39*	0.93 ± 0.17
	SOD1	1.00 ± 0.10	1.43 ± 0.36	2.55 ± 0.38*	1.00 ± 0.10	1.45 ± 0.30	1.91 ± 0.27*
	GPX3	1.00 ± 0.17	0.61 ± 0.15	0.05 ± 0.02*	1.00 ± 0.17	0.68 ± 0.20	0.03 ± 0.01*
PAH metabolism	CYP1A1	1.00 ± 0.20	1.66 ± 0.51	0.74 ± 0.14	1.00 ± 0.16	2.37 ± 1.10	0.62 ± 0.14
	DDIT3	1.00 ± 0.15	1.11 ± 0.28	3.40 ± 0.84*	1.00 ± 0.17	1.26 ± 0.64	2.53 ± 0.50*
DNA damage	MYC	1.00 ± 0.27	2.01 ± 0.74	0.09 ± 0.02*	1.00 ± 0.25	1.41 ± 0.58	0.05 ± 0.01*
	CCND1	1.00 ± 0.16	0.98 ± 0.27	2.61 ± 0.82	1.00 ± 0.14	1.13 ± 0.33	1.25 ± 0.27
Metal Transport	MT1	1.00 ± 0.22	6.16 ± 2.38*	1.03 ± 0.35	1.00 ± 0.24	7.30 ± 2.44*	0.93 ± 0.42
	MT2	1.00 ± 0.21	2.96 ± 1.22*	1.30 ± 0.40	1.00 ± 0.22	3.74 ± 1.12*	0.72 ± 0.14
	DMT1	1.00 ± 0.10	0.86 ± 0.12	0.72 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.07 ± 0.28	0.54 ± 0.01

2011

Oxidative stress	NQ01	1.00 ± 0.12	0.14 ± 0.04	4.24 ± 0.42*	1.00 ± 0.10	0.10 ± 0.02	1.74 ± 0.17*
	SOD1	1.00 ± 0.08	3.44 ± 2.57	1.10 ± 0.08	1.00 ± 0.04	1.99 ± 1.35	0.40 ± 0.02
	GPX3	1.00 ± 0.11	0.82 ± 0.10	2.05 ± 0.21*	1.00 ± 0.17	0.58 ± 0.20	0.70 ± 0.01
PAH metabolism	CYP1A1	1.00 ± 0.49	0.67 ± 0.14	0.20 ± 0.04*	1.00 ± 0.46	0.38 ± 0.05	0.08 ± 0.01*
DNA damage	DDIT3	1.00 ± 0.10	1.30 ± 0.37	2.28 ± 0.32*	1.00 ± 0.13	0.72 ± 0.16	0.79 ± 0.10
	MYC	1.00 ± 0.16	0.28 ± 0.21	1.63 ± 0.23	1.00 ± 0.20	0.16 ± 0.10*	0.66 ± 0.11
	CCND1	1.00 ± 0.17	1.10 ± 0.25	0.37 ± 0.05*	1.00 ± 0.18	0.52 ± 0.09	0.14 ± 0.02*
Metal Transport	MT1	1.00 ± 0.30	4.56 ± 0.31*	4.52 ± 0.76*	1.00 ± 0.27	2.93 ± 0.66*	2.01 ± 0.39*
	MT2	1.00 ± 0.27	1.41 ± 0.2	4.63 ± 0.82*	1.00 ± 0.24	0.93 ± 0.14	1.66 ± 0.30*
	DMT1	1.00 ± 0.08	0.68 ± 0.07	0.79 ± 0.07	1.00 ± 0.07	0.46 ± 0.03	0.31 ± 0.03

Supplementary Table 1. Hepatic mRNA expression of different biochemical markers in mice from a reference site and coal mining areas. Data have been pooled for 2010 and 2011 sampling campaigns. Oxidative stress (GPX3- Glutathione peroxidase 3; NQO1 - NAD(P)H dehydrogenase, quinine 1; SOD1- Superoxide dismutase 1), metal transport (MT1 - metallothionein 1; MT2 - metallothionein 2, DMT1 (SLC11A2) - solute carrier family 11 proton-coupled divalent metal ion transporters, member 2), DNA damage (CCND1 - cyclin D1; MYC -v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog; DDIT3 - DNA-damage-inducible transcript 3) and PAH exposure (CYP1A1 - Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1). Gene expression was normalized to GAPDH and RPS29. *. Significant difference (p <0.05) compared to the reference site.

Pathway	Gen	Relative gene expression to GAPDH (Mean ± SE)			Relative gene expression to RPS29 (Mean ± SE)		
		Reference site	Coal mining areas		Reference site	Coal mining areas	
		Valledupar	La Jagua	La loma	Valledupar	La Jagua	La loma
Oxidative stress	NQO1	1.00 ± 0.16	0.33 ± 0.06	4.53 ± 0.77*	1.00 ± 0.17	0.26 ± 0.04	1.99 ± 0.33*
	SOD1	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.13	1.47 ± 0.11	1.00 ± 0.09	0.82 ± 0.01	0.71 ± 0.06
	GPX3	1.00 ± 0.24	0.95 ± 0.41	0.12 ± 0.02*	1.00 ± 0.21	1.53 ± 0.81	0.11 ± 0.01*
PAH exposure	CYP1A1	1.00 ± 0.23	1.25 ± 0.22	0.44 ± 0.06	1.00 ± 0.21	1.08 ± 0.24	0.23 ± 0.03*
DNA damage	DDIT3	1.00 ± 0.18	1.07 ± 0.19	2.25 ± 0.33*	1.00 ± 0.13	0.93 ± 0.19	1.20 ± 0.16
	MYC	1.00 ± 0.19	0.84 ± 0.36	1.07 ± 0.21	1.00 ± 0.19	0.42 ± 0.15	0.72 ± 0.17
	CCND1	1.00 ± 0.12	2.46 ± 0.51*	1.11 ± 0.21	1.00 ± 0.11	2.02 ± 0.43	1.01 ± 0.33
Metal Transport	MT1	1.00 ± 0.29	3.11 ± 1.15	1.37 ± 0.29	1.00 ± 0.22	2.72 ± 0.77	0.80 ± 0.15
	MT2	1.00 ± 0.19	1.82 ± 0.54*	3.02 ± 0.55*	1.00 ± 0.15	2.43 ± 0.63*	1.72 ± 0.29*
	DMT1	1.00 ± 0.07	0.75 ± 0.06	0.80 ± 0.06	1.00 ± 0.09	0.64 ± 0.08	0.39 ± 0.03

Supplementary Table 2. Hepatic mRNA expression of different biochemical markers in mice collected from a reference site and coal mining areas, during two sampling years. Oxidative stress (GPX3- Glutathione peroxidase 3; NQO1 - NAD(P)H dehydrogenase, quinine 1; SOD1- Superoxide dismutase 1), metal transport (MT1 - metallothionein 1; MT2 - metallothionein 2, DMT1 (SLC11A2) - solute carrier family 11 proton-coupled divalent metal ion transporters, member 2), DNA damage (CCND1 - cyclin D1; MYC -v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog; DDIT3 - DNA-damage-inducible transcript 3) and PAH exposure (CYP1A1 - Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1). Gene expression was normalized to GAPDH and RPS29. *. Significant difference (p <0.05) compared to the reference site. ^a. Significant difference (p <0.05) between males and females. 2A. Result in the La Jagua during 2010. 2B. Result in the Jagua during 2011. 2C. Result in the Jagua during 2010. 2D Result in the Loma 2011.

Supplementary Table 2A

GEN	VALEDUPAR (Reference site)				COAL MINING AREA			
					LA JAGUA - 2010			
	F		M		F		M	
	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29
NQO1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.5	1.9 ± 0.6	1.5 ± 0.3
SOD1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.03	2.3 ± 0.7*	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3
GPX3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.4	1.2 ± 0.5	1.5 ± 1.0
MT-I	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	8.3 ± 7.8*	5.8 ± 5.2*	11.6 ± 5.7*	11.5 ± 4.0*
MT-II	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	2.3 ± 2.0	2.5 ± 1.8	6.9 ± 3.7	4.2 ± 1.4
DMT1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.4
CCND1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.4 ± 1.0	1.9 ± 0.9	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
DDIT3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.9	3.0 ± 2.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.4
MYC	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.8	2.5 ± 1.9	1.7 ± 0.9	2.7 ± 2.0
CYP1A1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.3 ± 0.8	1.8 ± 0.6	0.6 ± 0.2	1.3 ± 0.7

Supplementary Table 2B

GEN	VALLEDUPAR (Reference site)				COAL MINING AREA			
	LA JAGUA - 2011							
	F		M		F		M	
	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29
NQO1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.04
SOD1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.05*	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2
GPX3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.05a	0.4 ± 0.05a	1.3 ± 0.4a	0.8 ± 0.2a
MT-I	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	4.9 ± 1.1	2.2 ± 0.3	2.4 ± 1.0	2.4 ± 0.9
MT-II	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.2
DMT1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.1*	0.4 ± 0.05*
CCND1	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.3
DDIT3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.7	0.9 ± 0.3
MYC	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.05 ± 0.02*	0.05 ± 0.02*a	0.01 ± 0.003*	0.3 ± 0.2a
CYP1A1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.6	2.7 ± 0.7a	1.4 ± 0.4a	0.3 ± 0.03a	0.2 ± 0.1a

Supplementary Table 2C

GEN	VALLEDUPAR (Reference site)				COAL MINING AREA			
	LA LOMA - 2010							
	F		M		F		M	
	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29
NQO1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.3
SOD1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.8 ± 0.6*	1.8 ± 0.3*	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.4
GPX3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.04 ± 0.02*	0.03 ± 0.01*	0.02 ± 0.01*	0.02 ± 0.01*
MT-I	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.3
MT-II	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	3.5 ± 2.0	1.7 ± 0.9	1.1 ± 0.6	0.6 ± 0.2
DMT1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1
CCND1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	3.8 ± 1.5*	3.2 ± 1.7	1.6 ± 0.6	1.0 ± 0.2
DDIT3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	5.8 ± 1.6* ^a	4.4 ± 1.0* ^a	1.6 ± 0.4 ^a	1.3 ± 0.2 ^a
MYC	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.1 ± 0.04* ^a	0.1 ± 0.03* ^a	0.01 ± 0.003* ^a	0.02 ± 0.003* ^a
CYP1A1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.05*	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1

Supplementary Table 2D

GEN	VALLEDUPAR (Reference site)				COAL MINING AREA			
	LA LOMA - 2011							
	F		M		F		M	
	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29	GAPDH	RPS29
NQO1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	4.1 ± 0.4*	1.4 ± 0.2	4.3 ± 0.9*	1.6 ± 0.2
SOD1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.02*	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.03*
GPX3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.1a	0.5 ± 0.09*a	2.8 ± 0.5*a	0.9 ± 0.2a
MT-I	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	5.8 ± 1.5*	1.5 ± 0.4	4.0 ± 1.0*	1.9 ± 0.5
MT-II	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.9 ± 0.6*	1.3 ± 0.3	4.2 ± 1.2*	1.7 ± 0.4
DMT1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.05*	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.03*
CCND1	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.04	0.1 ± 0.02*	0.2 ± 0.03*	0.1 ± 0.01*
DDIT3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.5 ± 0.4	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2
MYC	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1a	1.7 ± 0.9	1.0 ± 0.3a
CYP1A1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.6	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.03*	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.02*

References

1. IEA, Key World Energy Statistics 2012. OECD/IEA, Paris, 2012. <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf>
2. M.A. Palmer, E.S. Bernhardt, W.H. Schlesinger, K.N. Eshleman, E. Foufoula-Georgiou, M.S. Hendryx, A.D. Lemly, G.E. Likens, O.L. Loucks, M.E. Power, P.S. White, P.R. Wilcock, Science and regulation: Mountaintop mining consequences, *Science* 5962 (2010) 148-149.
3. K.J. Zullig, M. A Hendryx, Comparative analysis of health-related quality of life for residents of U.S. counties with and without coal mining, *Public. Health. Rep.* 125 (2010) 548-555.
4. M. Hendryx, M.M. Ahern, Relations between health indicators and residential proximity to coal mining in West Virginia, *Am. J. Public. Health.* 98 (2008) 669-671.
5. M. Hendryx, E. Fedorko, J. Halverson, Pollution sources and mortality rates across rural-urban areas in the United States, *J. Rural. Health.* 26 (2010) 383-391.
6. M. Hendryx, E. Fedorko, A. Anesetti-Rothermel, A geographical information system-based analysis of cancer mortality and population exposure to coal mining activities in West Virginia, United States of America, *Geospat. Health.* 4 (2010) 243-256.
7. M. Hendryx, K.J. Zullig, Higher coronary heart disease and heart attack morbidity in Appalachian coal mining regions, *Prev. Med.* 49 (2009) 355-359.
8. M. Hendryx, M.M. Ahern, T.R. Nurkiewicz, Hospitalization patterns associated with Appalachian coal mining, *J. Toxicol. Environ. Health.* 70 (2007) 2064-2070.
9. Liao Y., Wang J., Wu J., Driskell L., Wang W., Zhang T., Xue G., Zheng X. Spatial analysis of neural tube defects in a rural coal mining area, *Int. J. Environ. Health. Res.* (2010), 20, 439-450.
10. G.Miller, The Effect of Coal Usage on Human Health and the Environment, in: G Miller (Eds.), *Coal Energy Systems*, Elsevier, Academic Press, New York, 2005, pp.77-122.

11. S.O. Simmons, C.Y. Fan, R. Ramabhadran, Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening, *Toxicol. Sci.* 111 (2009) 202-225.
12. J. Ding, G. He, W. Gong, W. Wen, W. Sun, B. Ning, S. Huang, K. Wu, C. Huang, M. Wu, W. Xie, H. Wang, Effects of nickel on cyclin expression, cell cycle progression and cell proliferation in human pulmonary cells, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18 (2009) 1720-1729.
13. D. Beyersmann, A. Hartwig, Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms, *Arch. Toxicol.* 82 (2008) 493-512.
14. M.D. Mattie, J.H. Freedman, Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) 293-301.
15. P.G. Wells, Y. Bhuller, C.S. Chen, W. Jeng, S. Kasapinovic, J.C. Kennedy, P.M. Kim, R.R. Laposa, G.P. McCallum, C.J. Nicol, T. Parman, M.J. Wiley, A.W. Wong, Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 354-366.
16. C. Achten, T. Hofmann, Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - a hardly recognized source of environmental contamination, *Sci. Total Environ.* 40 (2009) 2461-2473.
17. S.C. Moldoveanu, Toxicological and Environmental Aspects of Polycyclic Aromatic, in: *Pyrolysis of Organic Molecules with Applications to Health and Environmental Issues*, Elsevier B.V. (Eds), New York, 2010, pp. 693-699.
18. J.J. Michaelson, S. Trump, S. Rudzok, C. Gräbsch, D.J. Madureira, F. Dautel, J. Mai, S. Attinger, K. Schirmer, M. Von Bergen, I. Lehmann, A. Beyer, Transcriptional signatures of regulatory and toxic responses to benzo-[a]-pyrene exposure, *BMC Genomics.* 12 (2011) 502
19. R.A. Pinho, F. Bonatto, M. Andrades, M.L. Frota, C. Jr Ritter, F. Klamt, F. Dal-Pizzol, J.M. Uldrich-Kulczynski, J.C. Moreira, Lung oxidative response after acute coal dust exposure, *Environ. Res.* 96 (2004) 290-297.
20. Y. Tuluçe, H. Ozkol, I. Koyuncu, H. Ine, Increased occupational coal dust toxicity in blood of central heating system workers, *Toxicol. Ind. Health.* 27 (2011) 57-64.

21. P. Ostapczuk, P. Valenta, H. Rützel, H.W. Nürnberg, Application of differential pulse anodic stripping voltammetry to the determination of heavy metals in environmental samples, *Sci Total Environ.* 60 (1987) 1-16.
22. M.N. Rashed, M.M. Ahmed, A.F. Al-Hossainy, S.M. Abd, Trends in speciation analysis of some heavy metals in serum of patients with chronic hepatitis C and chronic hepatitis B using differential pulse adsorptive stripping voltammetric measurement and atomic absorption spectrophotometry, *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 24 (2010) 138-145.
23. M. Trevisani, M. Cecchini, L. Taffetani, L. Vercellotti, R. Rosmini, Quantification of lead and cadmium in poultry and bird game meat by square-wave anodic-stripping voltammetry, *Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 28 (2011) 180-188.
24. A. Sarkar, D. Ray, A.N. Shrivastava, S. Sarker, Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring, *Ecotoxicology*, 15 (2006) 333-340.
25. B. Sen, B. Mahadevan, D.M. DeMarini, Transcriptional responses to complex mixtures: a review, *Mutat. Res.*, 636 (2007) 144-177.
26. M. Arya, IS. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, HR. Patel, Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 5 (2005) 209-219.
27. M.A. Valasek, J.J. Repa, The power of real-time PCR, *Adv. Physiol. Educ.* 29 (2005) 151-159.
28. F. Wang, J. Wang, D. Liu, Y. Su, Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine, *Anal Biochem.* 399 (2010) 211-217.
29. M. Saeedi, L.Y. Li, M. Salmanzadeh, Heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons: Pollution and ecological risk assessment in street dust of Tehran, *J Hazard Mater.* 15 (2012) 227-228.
30. D. Mamurekli, Environmental impacts of coal mining and coal utilization in the UK. *Acta Montanistica Slovaca Ročník.* 15 (2010) 134-144.
31. M. Keating, *Cradle to Grave: The Environmental Impacts from Coal*, Clean Air Task Force (Eds), Boston. 2001 pp 1-9.

32. R.J. Saunders, N.A. Paul, Y. Hu, R. de Nys, Sustainable sources of biomass for bioremediation of heavy metals in waste water derived from coal-fired power generation, *PLoS One*. 7 (2012) e36470.
33. Z. Wang, L. Chai, Z. Yang, Y. Wang, H. Wang, Identifying sources and assessing potential risk of heavy metals in soils from direct exposure to children in a mine-impacted city, Changsha, China, *J. Environ. Qual.* 39 (2010) 1616-1623.
34. M.A. Bhuiyan, M.A. Islam, S.B. Dampare, L. Parvez, S. Suzuki, Evaluation of hazardous metal pollution in irrigation and drinking water systems in the vicinity of a coal mine area of northwestern Bangladesh, *J. Hazard. Mater.* 179 (2010) 1065-1077.
35. G. Yapici, G. Can, A.R. Kiziler, B. Aydemir, I.H. Timur, A. Kaypmaz, Lead and cadmium exposure in children living around a coal-mining area in Yatağan, Turkey, *Toxicol. Ind. Health*. 22 (2006) 357-362.
36. A. Sanchez-Chardi, C. Penarroja-Matutano, M. Borrás, J. Nadal, Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part III: structural alterations. *Environ Res.* 109 (2009) 960-967.
37. K.C. Wu, J.J. Liu, C.D. Klaassen, Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury, *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 (2012) 14-20.
38. J. Liu, W. Qu, M.B. Kadiiska, Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238 (2009) 209-214.
39. Y.W. Chen, C.Y. Yang, C.F. Huang, D.Z. Hung, Y.M. Leung, S.H. Liu, Heavy metals, islet function and diabetes development, *Islets*. 1 (2007) 169-176.
40. L. Järup, Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68 (2003) 167-182.
41. C.A. Cohn, R. Laffers, S.R. Simon, T. O'Riordan, M.A. Schoonen, Role of pyrite in formation of hydroxyl radicals in coal: possible implications for human health, *Part. Fibre. Toxicol.* 3 (2006) 16.
42. C.A. Cohn, S.C. Fisher, B.J. Brownawell, M.A. Schoonen, Adenine oxidation by pyrite-generated hydroxyl radicals, *Geochem. Trans.* 11 (2010) 2.
43. S.S. Leonard, J.J. Bower, X. Shi, Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses, *Mol. Cell. Biochem.* 255 (2004) 3-10.

44. S.N. Mattagajasingh, B.R. Misra, H.P. Misra, Carcinogenic chromium (VI)-induced protein oxidation and lipid peroxidation: implications in DNA-protein crosslinking, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 987-997.
45. S. Nemmiche, D. Chabane-Sari, M. Kadri, P. Guiraud, Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion, *Toxicol. In Vitro.* 25 (2011) 191-198.
46. K. Piatek, T. Schwerdtle, A. Hartwig, W. Bal, Monomethylarsonous acid destroys a tetrathiolate zinc finger much more efficiently than inorganic arsenite: mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 600-606.
47. J.R. Whiteside, C.L. Box, T.J. McMillan, S.L. Allinson, Cadmium and copper inhibit both DNA repair activities of polynucleotide kinase, *DNA Repair.* 9 (2010) 83-89.
48. K. Salnikow, A. Zhitkovich, Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 28-44.
49. K.P. Nickens, S.R. Patierno, S. Ceryak, Chromium genotoxicity: A double-edged sword, *Chem. Biol. Interact.* 188 (2010) 276-288.
50. R.J. McCunney, P. Morfeld, S. Payne, What component of coal causes coal workers' pneumoconiosis?, *J. Occup. Environ. Med.* 51 (2009) 462-71.
51. M. Saeedi, L.Y. Li, M. Salmanzadeh, Heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons: Pollution and ecological risk assessment in street dust of Tehran, *J Hazard Mater.* 15 (2012) 227-228.
52. B. Mahadevan, R.D. Snyder, M.D. Waters, R.D. Benz, R.A. Kemper, R.R. Tice, Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environ Mol Mutagen.* 52 (2011) 339-354.
53. S.O. Simmons, C.Y. Fan, K. Yeoman, J. Wakefield, R. Ramabhadran, NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent, *Curr. Chem. Genomics.* 5 (2011) 1-12.
54. P. Møller, P.H. Danielsen, K. Jantzen, M. Roursgaard, S. Loft, Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles, *Crit. Rev. Toxicol.* 43 (2013) 96-118.

55. N. Verma, M. Pink, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke, Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity, *Proteomics*. 12 (2012) 1731-1755.
56. X. He, M.G. Chen, Q. Ma, Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 1375-1383.
57. L.Y. Sun, A.F. Bokov, A. Richardson, R.A. Miller, Hepatic response to oxidative injury in long-lived Ames dwarf mice, *FASEB J.* 25 (2011) 398-408.
58. R. Sharif, P. Thomas, P. Zalewski, M. Fenech, The role of zinc in genomic stability, *Mutat Res.* 733 (2012) 111-121.
59. C. Costa, S. Catania, R. De Pasquale, R. Stancanelli, G.M. Scribano, A. Melchini, Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation, *Toxicology* 271 (2010) 83-86.
60. M.S. Lee, S. Magari, D.C. Christiani, Cardiac autonomic dysfunction from occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Occup. Environ. Med.* 68 (2011) 474-478.
61. J.H. Park, D. Mangal, A.J. Frey, R.G. Harvey, I.A. Blair, T.M. Penning, Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29725-29734.
62. N. Gharavi, A.O. El-Kadi, Role of nitric oxide in downregulation of cytochrome P450 1a1 and NADPH: Quinone oxidoreductase 1 by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 2795-2807.
63. M.M. Ghanem, L.A. Battelli, B.F. Law, V. Castranova, M.L. Kashon, J. Nath, A.F. Hubbs, Coal dust alters beta-naphthoflavone-induced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation in alveolar type II cells, *Part. Fibre. Toxicol.* 6 (2009) 21.

Altered gene expression in HepG2 cells exposed to a methanolic coal dust extract

Angelica Guerrero-Castilla¹, Jesus Olivero-Verbel^{1*}

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences. Environmental and Computational Chemistry Group. University of Cartagena, Cartagena, Colombia.

*Corresponding Author. Jesus Olivero-Verbel. Ph.D Environmental and Computational Chemistry Group. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Cartagena. Campus of Zaragocilla. Cartagena, Colombia. E-mail: joliverov@unicartagena.edu.co.

Originalmente publicado en: Environmental Toxicology and Pharmacology 38 (2014) 742 - 750.

Abstract

Exposure to coal dust has been associated with different chronic diseases and mortality risk. This airborne pollutant is produced during coal mining and transport activities, generating environmental and human toxicity. The aim of this study was to determine the effects of a coal dust methanolic extract on HepG2, a human liver hepatocellular carcinoma cell line. Cells were exposed to 5-100 ppm methanolic coal extract for 12 hours, using DMSO as control. MTT and Comet assays were used for the evaluation of cytotoxicity and genotoxicity, respectively. Real time PCR was utilized to quantify relative expression of genes related to oxidative stress, xenobiotic metabolism and DNA damage. Coal extract concentrations did not induce significant changes in HepG2 cell viability after 12 hours exposure; however, 50 and 100 ppm of the coal extract produced a significant increase in genetic damage index with respect to negative control. Compared to vehicle control, mRNA CYP1A1 (up to 163 fold), NQO1 (up to 4.7 fold), and GADD45B (up to 4.7 fold) were up regulated, whereas PRDX1, SOD, CAT, GPX1, XPA, ERCC1 and APEX1 remained unaltered. This expression profile suggests that cells exposed to coal dust extract shows aryl hydrocarbon receptor-mediated alterations, changes in cellular oxidative status, and genotoxic effects. These findings share some similarities with those observed in liver of mice captured near coal mining areas, and add evidence that living around these industrial operations may be negatively impacting the biota and human health.

Key words: Genotoxicity, Comet assay, Transcriptional changes, NQO1, CYP1A1, GAPDD45B.

1. Introduction

Coal dust is a well-known pollutant, and its mining produces negative environmental and human health impacts during all stages of the productive chain (Palmer et al., 2010); (Zullig and Hendryx, 2010). Several studies have reported a direct relationship between coal production and increased mortality, associated with cardiopulmonary diseases and kidney damage, in workers and residents near coal mines (Hendryx, 2009;Hendryx and Ahern, 2008;Hendryx and Ahern, 2009;Hendryx et al., 2007;Hendryx et al., 2010;Hendryx and Zullig, 2009;Zullig and Hendryx, 2011). Other studies have pointed out the link between coal mining and the prevalence of neural tube defects, and other birth-related problems in these areas (Ahern et al., 2011; Liao et al., 2010).

Dust particles, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heavy metals and fluorine, among many others, have been identified as concern pollutants derived from coal mining (Finkelman, 2007). Several studies have established the genotoxic effect of this mineral and its related pollutants by using genotoxicity assays, such as the comet assay and the micronucleus test, as analyzed in human

and environmental biota exposed to coal mining (Jose et al., 2010;Leon et al., 2007;Leon-Mejia et al., 2011). Moreover, investigations performed with wild mice living near coal mining operations in Colombia, showed that these organisms presented greater hepatic concentrations of some metals, such as Cu, Cd and Zn, than those from reference sites. These findings appeared together with changes in mRNA expression of genes related to oxidative stress, metal transport and DNA damage (Guerrero-Castilla et al., 2014). As presented here, the combined effects of the mixture of chemicals leached by coal particles may induce a sustained cellular stress and damage that could lead to the development of a number of diseases in exposed organisms. Accordingly, it is not surprising that cancer, chronic lung and cardiovascular alterations are considered the main toxic effects of coal mining, emerging from a common context of oxidative stress and DNA damage derived from released pollutants (Hendryx et al., 2010;Pinho et al., 2004;Tuluca et al., 2011).

Taking in account that several of the transcriptional changes observed in wild mice were found in the hepatic tissue, the aim of this study was to determine if a coal dust methanolic extract may have similar impact on an in vitro model using human hepatoma HepG2 cells. These cells are of great relevance in toxicological studies to detect cytotoxic and genotoxic substances, as they are able to activate and detoxify xenobiotics (Mersch-Sundermann et al., 2004); moreover, in toxicogenomics applications HepG2 cells perform well in comparison to primary human hepatocytes (Jetten et al., 2013).

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of coal dust methanolic extract

The coal dust extract was prepared according to (Coronado-Posada et al., 2013). Briefly, a coal sample was obtained from a mine in La Loma, at the Department of Cesar, Colombia, and powdered until obtaining dust particles with average size of ~75 µm. The coal dust sample was extracted for 12 h with methanol in a Soxhlet apparatus, and then concentrated to dryness by rotary evaporation. The composition of this extract has been published elsewhere (Coronado-Posada et al., 2013), and it contains several organic compounds including PAHs and derivatives. Moreover, it is known methanol can extract un-substituted PAHs and PAH-derivates from dust particles, in particular oxy- and nitro-PAHs, as well as hydroxy- and carboxyl-PAHs (Totlandsdal et al., 2012; Barrado-Olmedo et al., 2012). The solid extract was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) under sonication for 18 h, and then filtrated through Whatman paper before used for in vitro studies with HepG2 cells.

2.2 Cell culture and MTT bioassay

Human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (HB-8065/LOT:58987012), and maintained in

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), at 37°C under 5% CO₂.

The MTT assay was employed as a relative measure of cell viability (Samarakoon et al., 2010). Cells were seeded at 96-well micro-titer plates (5×10⁴ cells/well) and after incubation for 24 h at 37 °C, cells were treated with 5, 10, 50 and 100 ppm of coal extracts, and then incubated for additional 12 h at 37 °C in the presence of 5% CO₂. DMSO (0.5%) and a Triton X-100 (0.9%) solution were used as negative and positive controls, respectively. After incubation, cells were briefly washed with phosphate-buffered saline. Fresh medium (180 µL) was then placed in each well together with 20 µL of MTT solution (3 mg/mL), and the plate was incubated at 37° C for 4 h. The medium was then removed by aspiration and 100 µL DMSO/isopropanol was added per well. Optical density of each sample was measured with a microplate spectrophotometer reader Multiskan® Spectrum (Thermo Scientific, Barrington, USA) at 540 nm. Three independent MTT assays on 3 different days were performed, using ten replicates for each tested concentration and controls. The results are expressed as percentage of cellular viability with respect to negative control.

2.3 Comet Assay

The neutral comet assay was carried out as previously described (Cabarcas-Montalvo et al., 2012). Briefly, cells were seeded at 6-well micro-titer plates (5×10⁵ cells/well). After incubation for 24 h at 37 °C, cells were treated with each 5, 10, 50 and 100 ppm of coal extract and incubated for 12 h at 37 °C in 5% CO₂. Treated cells with DMSO (0.5%) and a K₂Cr₂O₇ (1%) solution were used as negative and positive controls, respectively. Cells from cultures were deposited on a CometSlide™ (Trevigen, Gaithersburg, MD) and immersed in a lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4°C for 1 hour. Subsequently, the slides were incubated in freshly made neutral buffer (1 M Tris and 3 M sodium acetate) for 30 minutes and the nuclei electrophoresed for 60 minutes at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA. The slides were then submerged in ammonium acetate and ethanol, and the gels were stained for 30 min with SYBR Green (Trevigen, Gaithersburg, MD). Images were captured with a fluorescence microscope (Olympus America Inc., USA) and 100 cells were analyzed per sample. Cells were scored from the class 0 (undamaged) to class 4 (maximally damaged) according to the tail intensity (size and shape) for each sample and group, and the results were presented in percentage (%). Thus, a Genetic damage index (GDI) of the each group was obtained by using the following formula: (% Class 0 cells*0)+(% Class 1 cells *1)+(% Class 2 cells *2)+(% Class 3 cells *3)+(% Class 4 cells *4)(Cabarcas-Montalvo et al., 2012).

2.4 Gene expression assays

Cells were counted and seeded (5 x 10⁵ cells/well) to 96-well tissue culture plates. After 24 h, cells were exposed to 5, 10, 50 and 100 ppm of coal extract for

12 hours, using DMSO (0.5%) as vehicle control. RNA was isolated from the HepG2 cells using RNeasy® Mini Kit (Qiagen, California, USA) as described by the manufacturer. The concentration of RNA was determined by spectrophotometry (A260), and purity was assessed by the A260:A280 ratio (1.9 – 2.0). The integrity of RNA was checked by visual inspection of 28S and 18S ribosomal RNA on an agarose gel. Aliquots of RNA samples of RNA were stored at -80°C until analysis.

For each sample, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). The resultant cDNA was employed as the template in a 20 µL PCR reaction, containing 10 pmol each of forward and reverse gene-specific primers. Real time-PCR was conducted utilizing a StepOne® System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reactions were performed in MicroAmp optical 48-well reaction plates (Applied Biosystems) using SYBR® GreenI PCR Master Mix (Applied Biosystems). Conditions for PCR were as follows: Initial denaturation and enzyme activation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15s (denaturation) and 60°C for 1 min (annealing/extension). In total, 14 genes were analyzed, including markers of oxidative stress, DNA damage and xenobiotic metabolism. Gene names, function, accession numbers, forward and reverse primer sequences, as well as amplicon sizes are listed in Table 1.

Changes in gene expression were determined using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta-2-microglobulin (B2M) and hydroxymethylbilanesynthaseas (HMBS) as reference genes (housekeeping), and the comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method was utilized to estimate the relative mRNA amount of the target genes. All experiments were run by duplicates and negative controls contained no cDNA (Arya et al., 2005; Valasek and Repa, 2005).

2.5 Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm SE. Comparisons between means were performed using Anova. In those cases where normality was not achieved in the data sets after transformation, Kruskal Wallis was used instead. In all cases, appropriate multiple comparison tests followed Anova analysis. Significance was set at $p < 0.05$. All statistics were performed using GraphPad Prism Software (Version 5.0).

3. Results

3.1 Cytotoxic and Genotoxic effects of coal extract

The results of the MTT assay on HepG2 cells exposed to the coal extract are shown in Figure 1. After 12 h exposure, coal extract concentrations did not induce significant changes on HepG2 cell viability. The comet assay revealed that HepG2 cells exposed to the coal extract presented concentration-dependent

genotoxic damage (Table 2). Damage extent, classified as class 0 and class 1, was significantly different in all treatment groups when compared to the negative control. This effect was not observed for Class 2, 3 and 4. In terms of GDI, significant differences were observed between 50 and 100 ppm coal extract treatments and the control.

3.2 Relative expression of cellular response biomarker to pollutants

Expression profile of genes related to oxidative stress, DNA damage and xenobiotic metabolism, using three different housekeeping genes, is showed in Table 3. Compared to vehicle control, mRNA of NAD(P)H dehydrogenase quinone1/NQO1 (up to 3.5 fold), DNA damage-inducible gene 45 β /GADD45B (up to 4.7 fold) and Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1/CYP1A1 (up to 163 fold), were significantly overexpressed at coal extract concentrations of 50 and 100 ppm. PRDX1, SOD, CAT, GPX1, XPA, ERCC1, and APEX1 showed no statistical variations under treatment conditions.

4. Discussion

Results from MTT bioassay showed no significant differences between the viability of treated and untreated cells, meaning that the coal extract does not target cell membrane. However, the comet assay indicated significant DNA damage in cells exposed to the highest concentrations of coal dust extract (50 and 100 ppm), suggesting the DNA-damaging potential of this material, fact that could have significant consequences for short- and long-term effects in environmental health. It has been reported that blood cells of rodents and reptiles collected from the surroundings in coal mining areas showed DNA damage (Cabarcas-Montalvo et al., 2012). This finding has also been detected in anuran amphibians from coal mining sites when compared to reference animals (Zocche JJ et al., 2013).

Genotoxic effects induced by the coal extract on HepG2 cells, as demonstrated by the comet assay, may be related with the composition of the coal dust extract. Coronado-Posada et al. (2013) found that the chemical composition of the coal dust extract used in this study comprise at least 142 different chemicals, including well known environmental pollutants such as PAHs. In fact, Tarantini et al. (2009) observed similar DNA damage, as addressed by the comet assay, in HepG2 cells treated with both urban and industrial mixtures containing 0.16 μ M benzo[a]pyrene (BaP), a PAH representative.

The presence of PAHs in coal is the result of the biogenesis and structure of this sedimentary rock (Achten and Hofmann, 2009). The concentration of extractable PAHs depends on coal rank and origin; for example, high volatile bituminous rank, such as the coal dust sample assessed in this study, is associated with elevated concentrations of PAHs; however, alkylated 2-3 ring PAHs dominate in

all coals independently of their rank and origin (Laumann et al., 2011). These chemicals represent a class of toxicological compounds that have been related with a variety of hazardous effects, including genotoxicity, alterations in cell signaling, inflammatory diseases, autoimmune disorders, atherosclerosis and cancer (Henkler et al., 2012).

On the other hand, no significant changes were observed in mRNA expression of genes related to oxidative stress, in contrast to those registered for genes associated with DNA damage and AhR-activation signaling, which were overexpressed. Although PAHs, such as those found in the coal extract (Coronado-Posada et al., 2013), can induce oxidative stress in HepG2 and other cell types (Castorena-Torres et al., 2008), it is also known that in some cases, the extent of the PAHs-mediated oxidative damage may be counteracted by cellular anti-oxidant defense mechanisms (Liu et al., 2001). Reactive oxygen species (ROS) produced by the action of CYP1A1 may derive from PAH-quinones, secondary metabolites of PAHs, that promote redox cycling leading to ROS formation (Bock, 2012; Miranda et al., 2006). An alternative hypothesis could be that the presence of antioxidant molecules in the extract, for instance, polyphenolic chemicals, may be abrogating the resulting ROS (Vijaya-Padma et al., 2014).

Moreover, PAHs are known to be involved in the activation of the Keap1/Nrf2/ARE (Kelch-like ECH-associated protein 1/Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/Antioxidant Response Element), and aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathways. The overexpression of NQO1 (Phase II detoxification enzyme) in HepG2 cells exposed to the coal extract may derive from these two distinct, but overlapping, regulation mechanisms (Bock, 2012; Kohle and Bock, 2007). NQO1 is highly inducible in responses by many chemicals (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010) and its gene product is a prototype cytoprotective enzyme (Dinkova-Kostova and Talalay, 2008) containing response elements for binding to the transcription factors Nrf2 and AhR (Kohle and Bock, 2009).

The increase of the NQO1 expression as a result of the Keap1/Nrf2/ARE pathway activation is considered an adaptive response that occurs during the exposure to electrophilic or oxidative compounds (Osburn and Kensler, 2008). In response to oxidative stress, generated by electrophiles and reactive oxygen species, Nrf2 is liberated from its cytoplasmic repressor Keap1, and translocated into the nucleus (Itoh et al., 2003), where it acts as a transcription factor binding to ARE sequences located in the promoter of target genes, such as NQO1 (Hayes et al., 2000; Stewart et al., 2003; Venugopal and Jaiswal, 1996). In vitro studies have suggested the activation of this pathway by benzo(a)pyrene (Hockley et al., 2007; Niestroy et al., 2011), probably through the downregulation the Keap1 (Nguyen et al., 2010), although it has been found that the activation of AhR by

PAHs may directly induce Nrf2 by increasing its transcription (Miao et al., 2005). Moreover, upon AhR activation by PAHs or related molecules, AhR translocates to the nucleus where it is associated with its partner protein Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). The heterodimer binds to XREs (xenobiotic response elements) with the consensus sequence 5'-T/GCGTG-3' in the regulatory region of target genes, including again NQO1 (Beischlag et al., 2008).

The strong overexpression of CYP1A1 observed in this study, even at the lowest tested concentration (5 ppm), is evidence of the activation of AhR (Barouki et., 2012) in HepG2 cells, as a response to the presence of PAHs in the coal dust extract, as reported by Coronado-Posada et al. (2013). The levels of induction of CYP1A1 elicited by PAHs in different whole animal and cellular models are variable. For instance, 75 mg/Kg of benzo[a]pyrene, a representative PAH, given i.p. once, to rats may increase hepatic CYP1A1 up to 1700 times (Chanyshv et al., 2014). On the other hand, HepG2 cells treated by several hours with 1 μ M benzo[a]pyrene produced approximately between 10 and 25-fold induction of CYP1A1 mRNA (Wu et al., 2003; Zhang et al., 2011). These values are quite comparable with those measured during HepG2 cells exposure to 5 ppm of coal extract as shown in this work (17.2 – 23.2-fold).

CYP1A1 plays a pivotal role in PAH metabolism, catalyzing its oxidation toward primary epoxide (Schwarz et al., 2001). Electrophilic PAH metabolites can covalently bind to DNA, potentially inducing mutagenesis and contributing to cancer susceptibility (Henkler et al., 2012). Thus, the CYP1A1 overexpression observed in this work, likely leading to PAH oxidation to reactive metabolites, may suggest an association with a genotoxic potential of the coal extract, even at low concentrations (Table 3). In fact, overexpression of GADD45B was registered in HepG2 cells treated with 50 and 100 ppm of coal extract, concentrations at which the induction of CYP1A1 was in average 163-fold greater than in the vehicle-control. GADD45B is rapidly induced upon DNA damage, and recognized as a sensor that modulates the response of mammalian cells to genotoxic and physiological stress, as well as the process of tumor formation and progression (Cretu et al., 2009; Liebermann et al., 2011; Tront et al., 2010).

Other genes such as XPA, ERCC1 and APEX1, with critical roles for nucleotide excision repair (NER) and whose induction is crucial to counteract DNA damage, no were overexpressed in this study. One possible hypothesis to explain these findings is that the coal extract decreases the cell NER capacity, likely by interactions between diverse signals and cellular effects elicited by individual pollutants present in this complex mixture. Similar behavior was reported in studies carried out in HepG2 cells exposed to of benzo(a)pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126). Both pollutants alone could effectively increase

XPA expression, but their co-exposure was associated to reduction of the expression of this gene (Wei et al., 2009).

At this point it should be emphasize that, some, but not all, of the biochemical features observed in mice from coal mining areas (Guerrero-Castilla et al., 2014) were detected in vitro with HepG2 cells. Major communalities were DNA damage, as detected by the comet assay, and overexpression of oxidative-stress related genes. However, in contrast with our data, hepatic CYP1A1 was downregulated in those mice, probably suggesting that some cross-talk mechanisms may be taking place during coal dust exposure, perhaps involving different cellular systems, organs or pollutants, as observed by other authors (Darwish et al., 2013; Anwar-Mohamed and El-Kadi, 2008).

Conclusions

HepG2 cells exposed to non-cytotoxic concentrations of coal dust extract showed genotoxic damage and activation of AhR and DNA repair signaling pathways. These findings share some similarities with those observed in wild mice living near coal mining areas, and provide evidence that these operations may release pollutants impacting both biota and human health.

Acknowledgements:

This research was supported by the University of Cartagena, Cartagena, and the Administrative Department of Science, Technology and Innovation of Colombia, Colciencias, Bogota, Colombia (Grant 110749326186).

Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Table 1. Overview of genes and RT-PCR primer sequences.

Gene name	Gene symbol	Entrez Gene ID	Molecular/Biological Function	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	AmpliconSize (pb)
<i>Oxidative Stress</i>						
Peroxirredoxine	PRDX1	5052	Oxidoreductase and peroxiredoxin activities. oxidative stress response.	CAGCCTGTCTGACTACAAAGGA	CCAGTCCTCCTGTTTCTTAGG	206
Superoxide dismutase 1	SOD	6647	Destroys radicals. Converts superoxide to hydrogen peroxide.	GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG	CCACAAGCCAAACGACTTCC	227
Catalase	CAT	847	Converts hydrogen peroxide to water and oxygen.	TGGAGCTGGTAACCCAGTAGG	CCTTTGCCTTGGAGTATTTGGTA	209
Glutathione peroxidase 1	GPX1	14778	Detoxification of hydrogen peroxide.	CCTTTTAAGCAGTATGCAGGCA	CAAGCCAAATGGCCCAAGTT	185
<i>Phase II Enzyme</i>						
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQ01	1728	Quinone detoxification. Regulated via Nrf2/keap1/ARE and AhR.	TGGCTTCCAAGTCTTAGAACCT	AGTGTGCCCAATGCTATATGTC	49
<i>Xenobiotic Metabolism</i>						
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	1543	Metabolize some PAHs to carcinogenic intermediates. Oxidizes a variety of structurally unrelated compounds.	TCCTGGAGACCTCCGACACT	CTTCAAACCTGTGTCTCTTGTTGTG	78
<i>DNA Damage</i>						
Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta.	GADD45B	4616	Overexpressed after stressful growth arrest conditions or exposure to DNA-damaging agents.	TACGAGTCGGCCAAGTTGATG	GGATGAGCGTGAAGTGGATTT	115

Xeroderma pigmentosum, complementation group A Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	XPA	<u>2073</u>	Involved in DNA excision repair.	CCAGGACCTGTTATGGAATTTGA	GCTTCTTGACTACCCCAAACCTTC	317
	ERCC1	<u>2067</u>	Nucleotide excision repair pathway.	CCTTATTCCGATCTACACAGAGC	TATTGGCGTAGGTCTGAGGG	76
APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	APEX1	<u>328</u>	Functions as a apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease in the DNA base excision repair pathway of DNA lesions induced by oxidative and alkylating agents.	CAATACTGGTCAGCTCCTTCG	TGCCGTAAGAAACTTTGAGTGG	88

Housekeeping

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	2597	Catalyzes the oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate in glycolysis.	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87
Beta-2-microglobulin	B2M	567	Component of the class I major histocompatibility complex.	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	GGCATCTTCAAACCTCCATG	97
Hydroxymethylbilane synthase	HMBS	3145	Catalyzes the tetrapolymerization of porphobilinogen.	TGCAACGGCGGAAGAAAA	ACGAGGCTTTCAATGTTGCC	113

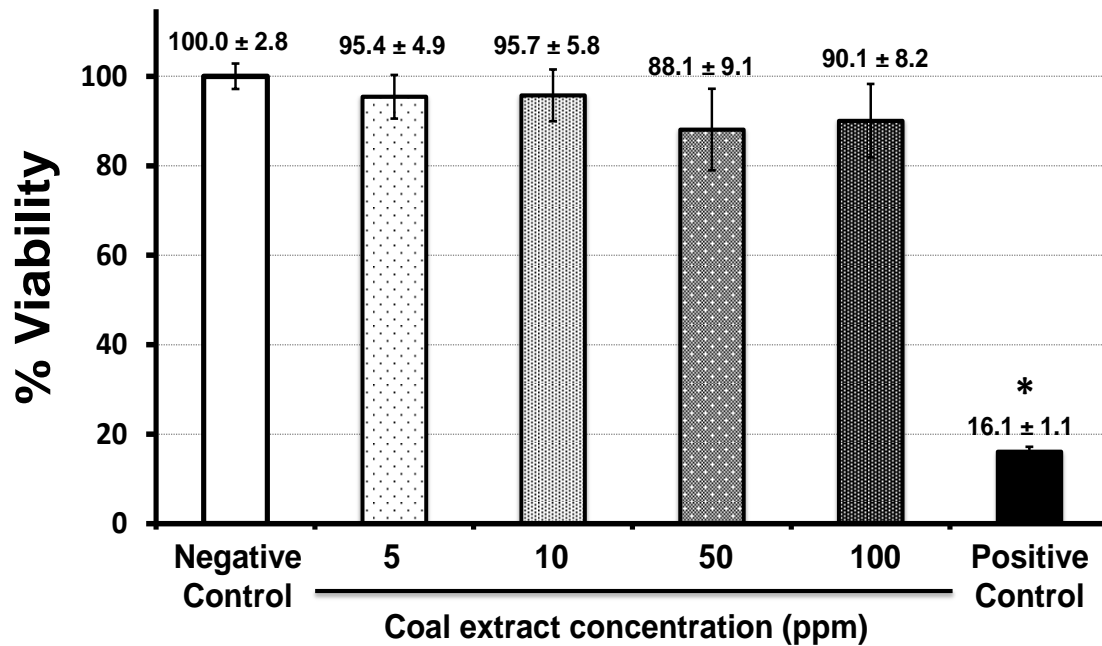


Fig. 1 Effects of the methanolic coal extract on cell viability of HepG2 cells using the MTT assay. *. Significant difference (p < 0.05) compared to the control group.

Table 2. Percentage of comet types and genetic damage index (GDI) found in HepG2 cells treated with the coal extract. Type of Cells: Class 0, no visible DNA migration from the nucleoid. Class 1, minimal DNA migration with an intact nucleoid. Class 2, moderate DNA migration with reduction in the size of the nucleoid. Class 3, extensive DNA migration with only a remaining pinpoint nucleoid. Class 4, complete migration of DNA into a comet tail with no visible nucleoid. *. Significant difference ($p < 0.05$) compared to the negative control group.

Treatment	Classification of cells (%) in the comet assay					Genetic Damage Index (GDI)
	Undamaged DNA (Class 0)	Damaged DNA (% of cells)				
		Class 1	Class 2	Class 3	Class 4	
Negative Control	78.98 ± 2.65	21.03 ± 2.65	0	0	0	21.03 ± 2.65
5 ppm	48.061 ± 6.58*	51.94 ± 6.58*	0	0	0	51.94 ± 6.58
10 ppm	50.62 ± 6.58*	49.09 ± 6.59*	0.29 ± 0.18	0	0	49.67 ± 6.59
50 ppm	21.74 ± 3.53*	77.49 ± 3.40*	0.7645 ± 0.34	0	0	79.02 ± 3.67*
100 ppm	34.32 ± 6.84*	63.61 ± 6.46*	2.042 ± 1.25	0.03 ± 0.03	0	67.78 ± 7.42*
Positive Control	10.35 ± 4.50*	63.49 ± 4.58*	11.08 ± 2.85*	15.08 ± 4.02*	0	130.9 ± 13.27*

Table 3. Expression profile of genes related to oxidative stress, xenobiotic metabolism and DNA damage on HepG2 cells treated with 5, 10, 50 and 100 ppm of coal extract. Gene expression was normalized with GAPDH, B2M and HMBS. *. Significant difference (p<0.05) compared to the negative control group.

		Relative Gene Expression normalized with three Housekeeping														
Pathway	Gen	GAPDH					B2M					HMBS				
		Contr ol Grou p	Coal Extract Exposed Group				Contr ol Grou p	Coal Extract Exposed Group				Contr ol Grou p	Coal Extract Exposed Group			
			5 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm		5 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm		5 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm
Oxidativ e stress	PRDX1	1.00 ± 0.18	0.46 ± 0.19	0.69 ± 0.04	1.81 ± 1.86	1.76 ± 0.09	1.00 ± 0.08	0.62 ± 0.24	0.90 ± 0.05	1.16 ± 1.05	1.79 ± 0.07	1.00 ± 0.16	0.48 ± 0.18	0.65 ± 0.03	1.44 ± 1.57	1.83 ± 0.09
	SOD	1.00 ± 0.09	0.54 ± 0.22	0.82 ± 0.05	0.99 ± 0.15	0.95 ± 0.08	1.00 ± 0.06	0.75 ± 0.23	1.05 ± 0.05	0.91 ± 0.12	0.96 ± 0.06	1.00 ± 0.09	0.76 ± 0.13	0.79 ± 0.07	0.88 ± 0.12	1.07 ± 0.19
	CAT	1.00 ± 0.15	0.90 ± 0.12	0.94 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0.86 ± 0.10	1.00 ± 0.31	0.71 ± 0.19	0.83 ± 0.02	0.89 ± 0.21	0.87 ± 0.16	1.00 ± 0.16	0.90 ± 0.15	0.95 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0.86 ± 0.10
	GPX1	1.00 ± 0.06	1.20 ± 0.17	1.04 ± 0.04	1.22 ± 0.04	1.32 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.66 ± 0.57	1.36 ± 0.07	1.27 ± 0.16	1.49 ± 0.09	1.00 ± 0.06	1.14 ± 0.12	0.99 ± 0.05	1.12 ± 0.05	1.16 ± 0.08
Phase II Enzyme	NQO1	1.00 ± 0.21	1.06 ± 0.32	2.48 ± 0.61	3.47 ± 0.57*	4.42 ± 0.32*	1.00 ± 0.10	1.39 ± 0.33	3.22 ± 0.56*	3.40 ± 0.54*	4.54 ± 0.28*	1.00 ± 0.14	1.72 ± 0.39	2.50 ± 0.61	3.25 ± 0.48*	4.70 ± 0.27*
PAH metabol ism	CYP1A 1	1.00 ± 0.31	17.17 ± 7.06	43.71 ± 6.40	163.3 ± 21.56 *	162.3 ± 14.21 *	1.00 ± 0.43	23.20 ± 10.14	47.67 ± 5.04	128.7 ± 11.77 *	142.3 ± 3.83*	1.00 ± 0.47	20.65 ± 3.13	35.00 ± 4.86	122.5 ± 15.00 *	152.1 ± 20.35 *
DNA damage	GAAD4 5B	1.00 ± 0.10	1.39 ± 0.13	1.68 ± 0.13	3.02 ± 0.28*	3.91 ± 0.36*	1.00 ± 0.10	1.15 ± 0.12	1.28 ± 0.03	3.33 ± 0.30*	4.30 ± 0.30*	1.00 ± 0.03	1.50 ± 0.13	1.80 ± 0.13	3.62 ± 0.59*	4.71 ± 0.55*
	XPA	1.00 ± 0.26	0.49 ± 0.21	0.61 ± 0.06	1.25 ± 0.37	1.05 ± 0.21	1.00 ± 0.18	0.72 ± 0.22	0.85 ± 0.07	1.11 ± 0.14	1.11 ± 0.14	1.00 ± 0.22	0.79 ± 0.19	0.65 ± 0.08	1.21 ± 0.34	1.19 ± 0.16
	ERCC1	1.00 ± 0.16	0.52 ± 0.22	0.74 ± 0.08	0.97 ± 0.17	0.92 ± 0.11	1.00 ± 0.05	0.72 ± 0.22	0.96 ± 0.08	0.88 ± 0.08	0.94 ± 0.05	1.00 ± 0.13	0.75 ± 0.15	0.71 ± 0.07	0.87 ± 0.15	1.03 ± 0.16
	APEX1	1.00 ± 0.13	0.98 ± 0.10	0.97 ± 0.09	0.90 ± 0.17	0.78 ± 0.02	1.00 ± 0.10	0.81 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.03	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.11	1.01 ± 0.03	1.04 ± 0.14	0.94 ± 0.03

References

- Achten, C., Hofmann, T. 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - a hardly recognized source of environmental contamination. *Sci. Total. Environ.* 407, 2461-2473.
- Ahern, M.M., Hendryx, M., Conley, J., Fedorko, E., Ducatman, A., Zullig, K.J. 2011. The association between mountaintop mining and birth defects among live births in central Appalachia, 1996-2003. *Environ. Res.* 111, 838-846.
- Anwar-Mohamed, A., El-Kadi, A.O. 2008. Down-regulation of the carcinogen-metabolizing enzyme cytochrome P4501a1 by vanadium. *Drug. Metab. Dispos.* 36, 1819-1827.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 5, 209-219.
- Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., Coumoul, X. 2012. The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 27, 3-8.
- Barrado-Olmedo, A.I., Pérez-Pastor, R.M., García-Alonso, S., 2012. An evaluation of uncertainty associated to analytical measurements of selected polycyclic aromatic compounds in ambient air. *Talanta* 101, 428-434.
- Beischlag, T.V., Luis, M.J., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 18, 207-250.
- Bock, K.W. 2012. Ah receptor- and Nrf2-gene battery members, modulators of quinone-mediated oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Pharmacol.* 83, 833-838.
- Cabarcas-Montalvo, M., Olivero-Verbel, J., Corrales-Aldana, H. 2012. Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. *Sci. Total. Environ.* 416, 208-214.
- Castorena-Torres, F., Bermúdez de León, M., Cisneros, B., Zapata-Pérez, O., Salinas, J.E., Albores, A. 2008. Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549. *Toxicol. In Vitro.* 22, 411-421.

Chanyshev, M.D., Kosorotikov, N.I., Titov, S.E., Kolesnikov, N.N., Gulyaeva, L.F., 2014. Expression of microRNAs, CYP1A1 and CYP2B1 in the livers and ovaries of female rats treated with DDT and PAHs. *Life Sci.* 103, 95-100.

Coronado-Posada, N., Cabarcas-Montalvo, M., Olivero-Verbel, J. 2013. Phytotoxicity assessment of a methanolic coal dust extract in *Lemna minor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 27-32

Cretu, A., Sha, X., Tront, J., Hoffman, B., Liebermann, D.A. 2009. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer. Ther.* 7, 268-276.

Darwish, W.S., Ikenaka, Y., Ishizuka, M. 2013. Biological responses of xenobiotic metabolizing enzymes to lead exposure in cultured H4IIE rat cells. *Jpn. J. Vet. Res.* 61, Suppl :S48-S53.

Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food. Res.* 52, Suppl 1:S128-S138.

Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P. 2010. NAD(P)H,quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 116-123.

Finkelman, R.B. 2007. Health impacts of coal, facts and fallacies. *Ambio.* 36, 103-106.

Guerrero-Castilla, A., Olivero-Verbel, J., Marrugo-Negrete, J. 2014. Heavy metals in feral mice from coal-mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metal. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 762, 24-29.

Hayes, J.D., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G.J., Wolf, C.R., Yamamoto, M. 2000. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 33-41.

Hendryx, M., Ahern, M.M., Nurkiewicz, T.R. 2007. Hospitalization patterns associated with Appalachian coal mining. *J. Toxicol. Environ. Health.* 70, 2064-2070.

Hendryx, M., Ahern, M.M. 2008. Relations between health indicators and residential proximity to coal mining in West Virginia. *Am. J. Public. Health.* 98, 669-671.

- Hendryx, M., Ahern, M.M. 2009. Mortality in Appalachian coal mining regions, the value of statistical life lost. *Public. Health. Rep.* 124, 541-550.
- Hendryx, M., Fedorko, E., Anesetti-Rothermel, A. 2010. A geographical information system-based analysis of cancer mortality and population exposure to coal mining activities in West Virginia., United States of America. *Geospat. Health.* 4, 243-256.
- Hendryx, M., Zullig, K.J. 2009. Higher coronary heart disease and heart attack morbidity in Appalachian coal mining regions. *Prev. Med.* 49, 355-359.
- Hendryx, M. 2009. Mortality from heart, respiratory, and kidney disease in coal mining areas of Appalachia. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 82, 243-249.
- Henkler, F., Stolpmann, K., Luch, A. 2012. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, bulky DNA adducts and cellular responses. *EXS.* 101, 107-131
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Te, P.R., Workman, P., Giddings, I., Phillips, D.H. 2007. AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797-1810.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., Yamamoto, M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8, 379-391.
- Jetten, M.J., Kleinjans, J.C., Claessen, S.M., Chesne, C., van Delft, J.H. 2013. Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol. In. Vitro.* 27, 2031-2040.
- Jose, Z.J., Dimer, L.D., Paganini, D.A., Carvalho, F., Avila, M.R., Dos Santos, C.E., Appel, B.L., Ferraz, D.J., de Andrade, V.M. 2010. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin. Brazil. *Environ. Res.* 110, 684-691.
- Kohle, C., Bock, K.W. 2007. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1853-1862.
- Kohle, C., Bock, K.W. 2009. Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes., and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem. Pharmacol.* 77, 689-699.

Laumann,S, Micic, V., Kruge, MA., Achten, C., Sachsenhofer, R.F., Schwarzbauer, J., Hofmann, T. 2011. Variations in concentrations and compositions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coals related to the coal rank and origin. *Environ. Pollut.* 159, 2690-2697.

Leon, G., Perez, L.E., Linares, J.C., Hartmann, A., Quintana, M. 2007. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat. Res.* 630, 42-49.

Leon-Mejia, G., Espitia-Perez, L., Hoyos-Giraldo, LS., Da, S.J., Hartmann, A., Henriques, J.A., Quintana, M. 2011. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci. Total. Environ.* 409, 686-691.

Liao, Y., Wang, J., Wu, J., Driskell, L., Wang, W., Zhang, T., Xue, G., Zheng, X. 2010. Spatial analysis of neural tube defects in a rural coal mining area. *Int. J. Environ. Health. Res.* 20, 439-450.

Liebermann, D.A., Tront, J.S., Sha, X., Mukherjee, K., Mohamed-Hadley, A., Hoffman, B. 2011. Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Crit. Rev. Oncog.* 16, 129-140.

Liu, L., Bridges, R.J., Eyer, C.L. 2001. Effect of cytochrome P450 1A induction on oxidative damage in rat brain. *Mol. Cell. Biochem.* 223, 89-94.

Mersch-Sundermann, V., Knasmuller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology.* 198, 329-340.

Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., Batist, G. 2005. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway, direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280, 20340-20348.

Miranda, C.L., Chung, W.G., Wang-Buhler, J.L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W.M., Buhler, D.R. 2006. Comparative in vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from beta-naphthoflavone-treated rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 80, 101-108.

Nguyen, P.M., Park, M.S., Chow, M., Chang, J.H., Wrischnik, L., Chan, W.K. 2010. Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1 message. *Toxicol. Sci.* 116, 549-561.

Niestroy, J., Barbara, A., Herbst, K., Rode, S., Van, L.M., Roos, P.H. 2011. Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-

pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicol. In Vitro.* 25, 671-683.

Osburn, W.O., Kensler, T.W. 2008. Nrf2 signaling, an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659, 31-39.

Palmer, M.A., Bernhardt, E.S., Schlesinger, W.H., Eshleman, K.N., Fougoula-Georgiou, E., Hendryx, M.S., Lemly, A.D., Likens, G.E., Loucks, O.L., Power, M.E., White, P.S., Wilcock, P.R. 2010. Science and regulation. Mountaintop mining consequences. *Science* 327, 148-149.

Pinho, R.A., Bonatto, F., Andrades, M., Frota, M.L., Ritter, C., Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Uldrich-Kulczynski, J.M., Moreira, J.C. 2004. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ. Res.* 96, 290-297.

Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W.H., Roots, I. 2001. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* 22, 453-459.

Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., Alam, J. 2003. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J. Biol. Chem.* 278, 2396-2402.

Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J.L., Douki, T, 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat. Res.* 671, 67-75.

Tront, J.S., Huang, Y., Fornace, A.J., Hoffman, B., Liebermann, D.A. 2010. Gadd45a functions as a promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress. *Cancer. Res.* 70, 9671-9681.

Tuluze, Y., Ozkol, H., Koyuncu, I., Ine, H. 2011. Increased occupational coal dust toxicity in blood of central heating system workers. *Toxicol. Ind. Health.* 27, 57-64.

Valasek, M.A., Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29, 151-159.

Venugopal, R., Jaiswal, A.K. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93,14960-14965.

Vijaya-Padma, V., Kalai-Selvi, P., Sravani, S. 2014. Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. *Mol. Biol Rep.* 2014 Feb 25. [Epub ahead of print]

Wei, W., Zhang, C., Liu, A.L., Xie, S.H., Chen, X.M., Lu, W.Q. 2009. PCB126 enhanced the genotoxicity of BaP in HepG2 cells by modulating metabolic enzyme and DNA repair activities. *Toxicol Lett.* 189, 91-95.

Wu, S.J., Spink, D.C., Spink, B.C., Kaminsky, L.S., 2003. Quantification of CYP1A1 and 1B1 mRNA in polycyclic aromatic hydrocarbon-treated human T-47D and HepG2 cells by a modified bDNA assay using fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 312, 162-166.

Zhang, R., Sun, J., Ma, L., Wu, X., Pan, G., Hao, H., Zhou, F., A.J., Lui, C., Ai, H., Shang, L., Gao, H., Peng, Y., Wan, P., Wu, H., Wang, G., 2011. Induction of cytochromes P450 1A by tanshinones in human HepG2 hepatoma cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 252, 18-27.

Zocche, J.J., Damiani, A.P., Hainzenreder, G., Mendonça, R.Á., Peres, P.B., Santos, C.E., Debastiani, R., Dias, J.F., Andrade, V.M. 2013. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 194-201.

Zullig, K.J., Hendryx, M. 2010. A comparative analysis of health-related quality of life for residents of U.S. counties with and without coal mining. *Public. Health. Rep.* 125, 548-555.

Zullig, K.J., Hendryx, M. 2011. Health-related quality of life among central Appalachian residents in mountaintop mining counties. *Am. J. Public. Health.* 101, 848-853.

Toxic effects of coal dust extract on embryonic development of Zebrafish

Angélica Guerrero-Castilla¹, Jesus Olivero-Verbel^{1*}, Imelda T. Sandoval², David A. Jones²

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences. Environmental and Computational Chemistry Group. University of Cartagena, Cartagena, Colombia.

²Department of Oncological Sciences. Huntsman Cancer Institute. University of Utah. Salt Lake City, Utah, USA.

*Corresponding Author. Jesus Olivero-Verbel. Ph.D Environmental and Computational Chemistry Group. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Cartagena. Campus of Zaragocilla. Cartagena, Colombia. E-mail: joliverov@unicartagena.edu.co.

[Submit to Toxicological Sciences](#)

Abstract

In this study, we evaluated the phenotypic alterations and changes in gene expression generated in zebrafish embryos exposed to coal extracts. Samples of coal dust obtained from a coalmine in La Loma, Colombia were extracted with methanol in a Soxhlet apparatus. We dissolved the solid extract in dimethyl sulfoxide for biological assays. Lethal and phenotypical alterations were monitored using an Olympus SZX12 stereomicroscope and analyzed by *in situ* hybridization. RT-PCR and RNA sequencing were employed to determine the alterations in gene expression associated with the observed phenotypes. The coal extract showed a 24hpf-LC50 of 223.68 mg L⁻¹ (SE: 29.48) and a 48/72hpf-LC50 of 161.55 mg L⁻¹ (SE: 17.16). Using the induction of acute toxicity as read-out, we identified morphological and physiological embryo-toxic effects in a concentration-dependent manner. We determined three phenotypes in embryos exposed to methanolic coal extract (P1, P2 and P3). All phenotypes showed shortening of brain regions; defects in the formation of the spine and somites; defects in the location and size of heart tube; and overexpression of *cyp1a1*, *gstp2* and *nqo1*. Gene expression profile analysis by RNA sequencing identified alterations, in all three phenotype groups, of several genes related to the composition of intermediate filaments, oxidation-reduction process, calcium ion binding, focal adhesion, and ECM-receptor interaction pathway. These findings provide evidence that pollutants from coal mining can cause severe alterations in embryonic development of vertebrate organisms, which could lead to poor health of biota and humans exposed to such toxins.

Keywords: coal dust, zebrafish embryos, RNASeq, *in situ* hybridization.

1. Introduction

The exploitation of fossil fuels is a major activity for the development of human society and technological advancement. However, the extraction, transport and use of these energy sources involve environmental and human health risks (Smith et al., 2013; Wilkinson et al., 2007). Coal is not an exception, especially because it is the second largest source of fossil energy in the world (Alpern Boris and Lemos de Sousa M.J., 2002) and the most polluting in all stages of the production process (Mamurekli, 2010).

Mice living near coal mines in Colombia showed alterations to their biochemical and cellular status (Guerrero-Castilla et al., 2014), and HepG2 cells exposed to non-cytotoxic concentrations of coal dust extract showed genotoxic damage and activation of AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) and DNA repair signaling pathways (Guerrero-Castilla and Olivero-Verbel, 2014). In order to determine the embryo-toxic potential of pollutants from coal dust for this study, we evaluated the phenotypic alterations and changes in gene expression generated in developing zebrafish embryos exposed to coal extracts.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of coal dust methanolic extract.

Samples of coal dust were obtained from a coalmine in La Loma, at the Department of Cesar, Colombia. Coal researchers extracted particles for 12 hours with methanol in a Soxhlet apparatus, and then concentrated by rotary evaporation. The solid extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) under sonication, then filtrated and used for studies with zebrafish embryos (Coronado-Posada et al., 2013).

2.2 Zebrafish maintenance and exposures embryos.

Zebrafish (*Danio rerio*) wild-type TU (WT) were maintained at standard laboratory conditions of twenty-eight degrees Celsius on a 14 hour light/10 hour dark photoperiod (Fishman et al., 1997). Fertilized embryos were collected following natural spawning either in 1X E3 medium (286 mg/l NaCl, 13 mg/l KCl, 48 mg/l CaCl₂•2H₂O, 40 mg/l MgSO₄, 0.01% methylene blue) or 2X PTU (1X E3 medium, 30.4 mg/dL phenylthiourea) and allowed to develop at 28.5 degrees Celsius. Embryos with proper and sequential development at four hours post-fertilization (hpf) were selected for exposures and were arrayed in 96-well plate (1 embryo per well) in 300 µL of culture medium. To evaluate the embryotoxicity of methanolic coal extract, the embryos were exposed to 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, and 5000 mg L⁻¹ of the extract. We used ten replicates to evaluate the methanolic coal extract effect.

2.3 Evaluation of lethality and phenotypical alterations.

At 24, 48, 72, and 144 hpf, the embryos were evaluated for lethal or phenotypical alterations using an Olympus SZX12 stereomicroscope (Olympus, Hamburg, Germany) and DP Manager software. Embryos were assessed for malformations of head, eyes, spinal cord (chorda), tail and tail tip, deformity of yolk, cardiac abnormalities, pericardial and yolk sac edema, and growth retardation (Nagel, 2002).

2.4 In situ hybridization.

To characterize the phenotypes induced by methanolic coal extracts on embryos harvested at 32 hpf, a series of in situ hybridization experiments were carried out utilizing digoxigenin-labeled antisense RNA probes against various regulatory genes involved in development and differentiation. The harvested embryos were fixed overnight at four degrees Celsius in 4% paraformaldehyde and 1X sucrose buffer on a rotator. Fixed embryos were rinsed in PBS, the

chorions removed with fine forceps, and dehydrated by successive washes in EtOH/PBST, EtOH and MeOH.

We performed in situ hybridizations for: *dlx2* (distal-less homeobox gene 2) forebrain and pharyngeal arches marker; *otx2* (orthodenticle homeobox 2) midbrain marker; *fgf8* (fibroblast growth factor) midbrain/hindbrain boundary marker; *ta* (T, brachury homolog a) notochord marker; *myod1* (myogenic differentiation 1) somite marker; *nkx2.5* (NK2 homeobox 5) heart- cardiac progenitor marker, and *myl7* (myosin, light chain 7, regulatory) heart marker. Embryos were photographed with an Olympus SZX12 digital camera.

2.5 RNA extraction, reverse transcription, and real time quantitative PCR.

With the aim to evaluate the expression of genes related to activation of aromatic hydrocarbon receptor and oxidative stress, RNA of fifty embryos of each phenotype found was isolated using RNeasy® Mini Kit as described by the manufacturer (Qiagen, California, USA). The concentration and purity of RNA was determined by spectrophotometry. For each sample, one μ g of total RNA was reverse transcribed using SuperScript First-Strand System (Invitrogen, Carlsbad, CA). We used cDNA as a template in a 10 μ L PCR reaction containing 10 pmol each of forward and reverse gene-specific primers. Real time-PCR was conducted utilizing a LightCycler® 480 real-time PCR system (Roche, Basel, Switzerland). The reactions were performed in a 96-well plate using 10X primer-probe mix and LightCycler® 480 Probes Master 2X PCR. In total, we analyzed five genes; Table 1 lists their names, accession numbers, forward and reverse primer sequences, as well as amplicon sizes.

The changes in gene expression were determined using *eef1a1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) as housekeeping gene, and the comparative CT ($\Delta\Delta$ CT) method was utilized to determine the relative target quantity. All experiments were run in triplicates and negative controls contained no cDNA (Arya et al., 2005; McCurley and Callard, 2008; Valasek and Repa, 2005).

2.6 RNA sequencing and data analyses.

Triplicate (for control, bad tail, and bad embryo phenotypes) or duplicate (for bad yolk phenotype) biological replica samples were prepared and sequenced using Illumina HiSeq 2000 (Illumina). We aligned raw data using Novoalign (Novocraft) against the Zv9 genome build containing known and theoretical splice junctions from Ensemble transcript annotation. After converting splice junction matches to genomic coordinates, the Defined Region Differential Sequence (Useq) was used to identify differentially expressed genes. GO term analysis was performed using Go-Elite Version 1.2 Beta

(http://www.genmapp.org/go_elite/) on gene sets limited by an estimated FDR value of 100 and 1.5 fold difference.

2.7 Statistical analysis.

Lethal concentrations at 50% (LC50) were calculated with StatPlus software using probit analysis (Finney method). Comparisons between means were performed using One-way analysis of variance (ANOVA) except when data did not pass the normality test; in those cases, Kruskal-Wallis was used instead. In all cases, appropriate multiple comparison tests followed ANOVA and Kruskal-Wallis analysis. GraphPad Prism software was used for statistical analyses. All statistical analyses were performed with a significance level of $p < 0.05$. Standard Error (SE).

3. Results

3.1 Characterization of phenotypes induced by coal extract on zebrafish embryos.

The results of mortality and phenotypical alterations of embryos exposed to doses of 1–5000 mg L⁻¹ of coal extract at 24 and 48/72 hpf (at 48 and 72 hpf the results are the same) are shown in Figures 1A and 1B. Concentrations between 50 and 250 mg L⁻¹ are related to high mortality rates and malformations after checking the embryos at 24, 48 and 72 hpf. At 500 mg L⁻¹, less than 20% of the embryos survived past 24 hpf, and none remained alive at 48 hpf. All embryos exposed to a concentration of 5000 mg L⁻¹ coal extract died within 24 hpf. The control group presented normal embryonic development (Kimmel et al., 1995). The coal extract showed a 24hpf-LC50 of 223.68 mg L⁻¹ (SE: 29.48) and a 48/72hpf-LC50 of 161.55 mg L⁻¹ (SE: 17.16).

For analyzing phenotypical alterations, we selected embryos exposed to 100 mg L⁻¹ of coal extract to replicate massively diverse phenotypic embryos. We determined three phenotypes in the embryos exposed to methanolic coal extract. Figure 2A shows these phenotypes: Phenotype 1, 2 and 3 (P1, P2 and P3). The prominent features to classify the embryos in each fenotipo were: P1, deformations in yolk; P2: deformations in tail ; P3, embryos with that had black gel-like substance inside the chorion with visibly smaller embryos.

In all phenotypes, exposure to coal extract caused embryonic malformations, such as tail and head malformation and alterations in cardiac function, including pericardial edema, slower heartbeat and blood pooling. To further characterize the developmental defects observed in treated embryos, we performed in situ hybridization for some common developmental markers (Figure 2B). The

shortening of brain regions were demonstrated with the decreased expression of *dlx2*, *otx2* and *fgf8*, (marker of forebrain, midbrain and hindbrain, respectively) in all phenotypes generated after exposure of embryos to coal extract compared with WT embryos. Moreover, we confirmed a tail formation abnormality with the atypical expression of *ta* in all phenotypes. Defects in the formation of the spine and somites were also evidenced after establishing shortened expression of *myod1* in all phenotypes.

On the other hand, both *nkx2.5* and *myl7* expression were found to be decreased in all phenotypes, proving defects in the location and size of heart tube of treated embryos, as compared to WT. P1 and P3 embryos had higher percentage of alterations in cardiac tube location. Figure 2C shows the heart tube location in different phenotypes characterized.

3.3 Expression of genes related with activation of AhR and oxidative stress.

All the phenotypes showed a significant overexpression of *cyp1a1* (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1), *gst_p2* (glutathione S-transferase, pi 2) and *nqo1* (NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1). Additionally, no significant increases of *ahr2* (aryl hydrocarbon receptor 2) and *arnt* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) were found in the three types of embryos studied. Figure 3 shows the results of relative quantification of these genes that evidence activation of pathways involved in cellular stress response caused by the presence of contaminants in the coal extract.

3.4 Deep RNA sequencing of the zebrafish phenotypes transcriptome.

In this study, we observed a large number of differentially expressed genes when comparing phenotypes and WT embryos. Over 50% of the changes is involved in transcriptional inactivation events (downregulation). Figure 4 shows the distinct gene expression patterns in the three phenotypes based on the number of genes up-regulated and down-regulated with respect to WT samples. In addition, we found 19 genes that were similar expressed in all 3 phenotype groups (Table 2). The genes *and1*, *and2*, *apoa4*, *c6h17orf67*, *crybb1*, *crybb1l1*, *crybb1l2*, *dct*, *krt23*, and *mylpfb* were downregulated in all phenotypes, in contrast, *cyp1a*, *cyp1b1*, *cyp1c1*, *gstp1*, *im:7150988*, *lonrf1l*, *slc16a9b*, *sult6b*, and *tiparp* were up-regulated.

Using ontology analysis at $FDR > 100$, $P < 0.05$, $Z \text{ Score} > 1.96$, we found significant expression changes in several categories when compared with controls. In the three categories, phenotypes were common gene alterations to the composition of the intermediate filaments, oxidation-reduction process, response to chemical stimulus and calcium ion binding. Besides, the biological pathways of ECM-receptor interaction and focal adhesion were altered in all embryos after exposure to coal extract. Table 3 shows the number of ontology categories

involved and gene number with altered transcription in each. A more detailed list showing the most important cellular components, molecular function, biological processes, biological functions and pathway of each phenotype are presented in Tables 4, 5 and 6.

Furthermore, after analyzing the set of genes differentially expressed in the different phenotypes, we found case-specific ontologies. The P1 embryos expression results provide strong evidence of changes in myosin filament (GO:0032982), Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (KEGG-dre00980), glutathione metabolism (KEGG-dre00480) and tight junction (KEGG-dre04530). For P2 embryos, the redundancy of several genes in three processes related to aromatic and nitrogen compound metabolism (GO:0046483; GO:0006807; GO:0006725) was a remarkable aspect, as well the iron ion binding function (GO:0005506). Finally, in the case of P3 embryos, alteration in gene expression involved in transmembrane transport (GO:0055085), phosphofructokinase activity (GO:0008443), and fructose and mannose metabolism:KEGG- was specific to this phenotype.

4. Discussion

We identified acute toxicity in zebrafish embryos in a time-dependent and dose-dependent manner. Coronado-Posada (2013), after analysis of the coal extract used in this study, reported at least 142 different chemicals, of which 14.7% are PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbon). This complex mixture of contaminants present in the coal extract, could explain the diversity of morphological and transcriptomic effects in the head, body and heart of embryos treated in this study.

Although various effects were observed in embryos exposed to coal extract, cardiotoxicity, probably linked to the presence of PAHs in the extract, was a common feature to all embryos independent of their phenotype. The PAHs, receptor agonists aromatic hydrocarbons, have been known to cause various malformations (Incardona et al., 2004) and lethal heart defects (Brown et al., 2015) in fish exposed during their embryonic state.

The intracellular mechanisms mediating cardiotoxicity in embryos exposed to PAHs are not yet clearly known. Recent studies in embryos treated with benzo(a)pyrene and fluoranthene, suggest that PAHs may affect cellular Ca(2+) levels and subsequently cardiac muscle function in an AHR2 (Aryl hydrocarbon receptor 2)-dependent mechanisms (Jayasundara et al., 2015). However, other studies have reported that the cardiotoxicity in zebrafish embryos exposed to benzo[k]fluoranthene and phenanthrene is mediated by matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) in a pathway that is AHR2-independent (Incardona et al., 2011; Zhang et al., 2013b). In this study, we found low

expression of *nkx2.5* and *myl7* in embryos exposed to coal extract. We considered both genes essential in the development of the cardiovascular system, in fact, negative regulation of *Nkx2.5* has been previously reported as a pathway involved in embryo-cardiotoxicity generated by PAHs through activation of AhR (Incardona et. 2011; Zhang et al, 2012).

Regarding brain alterations in embryos exposed to coal extract, decreased expression of *dlx2*, *otx2* and *fgf8* were observed. These findings could be possibly linked to brain malformations, considering that *dlx2a* is necessary for hindbrain neural crest survival, contributes in the differentiation of sensory ganglia and participates in conjunction with *dlx1a* in maturation of the arch cartilage elements (Sperber et al., 2008). In addition, *otx2* is an essential gene associated with midbrain-hindbrain boundary region during vertebrate brain development and the *fgf8* expression is critical to development and survival of GABAergic and glutamatergic neurons and the forebrain and hindbrain formation (Zhang et al., 2013a).

On the other hand, abnormalities of the tail and spine also were observed in all phenotypes of embryos exposed to coal dust extract (Figure 2A and 2B), with similarities to those that were reported in the first generation of larvas exposed to benzo[a]pyrene (Corrales et al., 2014). This would be linked with the atypical expression of *ta* and *myod* found in this study, whereas both genes are key participants in the formation of normal tail and spine of zebrafish.

Transcriptome analysis of genes associated with xenobiotic metabolism and oxidative stress showed that all phenotypes generated by exposure to coal extract had a significant overexpression of *cyp1a1* (p 57 fold), *ahr2* (Up 4 fold), *gstp2* (Up 20 fold) and *nqo1* (Up 53 fold). These results were consistent with those previously observed effects in HepG2, (Guerrero-Castilla and Olivero-Verbel, 2014). In accordance with these findings, coal extract exposure would trigger oxidative imbalance in biological systems, with subsequent cellular damage that would allow development of a wide range of pathologies (Halliwell and Gutteridge 2007).

Additionally, RNA sequence analysis showed that the three phenotypes overexpress other genes such as *cyp1b1*, *cyp1c1*, *gstp1*, *sult6b1*, *tiparp*, *lonrf1*, and *slc16a9b*, that are related to xenobiotic metabolism. The enzymatic activity of cytochromes P450 (CYPs) is one of the first steps in the metabolism of xenobiotic like PAHs, which are activated by carcinogens. Therefore, the activity of CYP enzymes and its expression, have been used as important biomarkers in assessing environmental exposure to various pollutants (Lee and Yang, 2008). The induction of *cyp1a1*, *cyp1b1* and *cyp1c1*, observed in this study, in conjunction with increases in the expression of *ahr2*, *nqo1*, *gstp1* and *gstp2*, suggests that AhR activation could be postulated as the major intracellular

mechanism which mediate the toxic effects caused by exposure to pollutants from coal dust during vertebrate development.

The *tiparp* gene, also overexpressed in embryos exposed to coal extract, has been described as a biomarker for the activation of AhR (Lam et al. 2008; Li et al, 2013.) and has been recently confirmed as a ligand-induced repressor of AHR, similar to *ahrr* (*ahr* repressor) (MacPherson et al., 2014). Additionally, increases in expression of *slc16a9b*, and *sult6b1*, as observed in this study, have been reported in zebrafish embryos exposed to PAH (Lam et al. 2008; Li et al, 2013; Goodale et al, 2013). This suggests that these genes could be useful biomarkers for assessing the activation of AhR in biological systems exposed to coal extract.

Our RNAseq data also revealed that the expression of *and1*, *and2*, *apoa4*, *crybb1*, *crybb1/1* *crybb1/2*, *dct*, *mylpfb*, and *krt23* was significantly lower in zebrafish embryos exposed to coal extract. We can link the decrease of *and1* and *and2* in embryos to alterations in the development of the pectoral fins (Zhang et al., 2010). Moreover, the recognized function of *Mylpfb* in the development of cardiac muscle composition (Wang et al., 2007) and its low expression observed in embryos link this gene with cardiotoxicity mechanisms generated by coal extract.

All alterations listed, jointly with low levels of *apoa4*, *dct*, and *krt23*, suggest that exposure to coal extract affects multiple cellular processes, including lipid transport, melanin synthesis, keratin metabolism, oxidation-reduction processes, xenobiotic metabolism and biomolecules biosynthesis, among others. In all phenotypes generated by exposure to coal extract, genomic ontology analysis showed that intermediate filaments, redox processes, response to stimuli chemicals, calcium metabolism pathways, ECM-receptor interaction and focal adhesion were the processes and components cellular with the largest number of differentially expressed genes.

Intermediate filaments (IF) provide the support for plasma membrane and is composed of a superfamily of proteins including various types of keratins and neurofilament proteins, among others (Eriksson et al., 2009). We found between 10% and 19% of gene precursors of the protein altered. Most of these changes were observed in genes of various keratins (*krt18*, *krt1-19d*, *krt4*, *krt5*, *krtt1c19e*, *krt17*, *krt92*, *krt97*), which mainly comprise the intermediate filament of epithelium (Eriksson et al., 2009). Disruptions in intermediate filaments have been linked to most degenerative diseases of the skin, muscle and neurons (Guharoy et al., 2013). Mutations in *krt1*, *krt5*, *krt10* and *krt14* have been linked to skin diseases, while some gene variants of *krt8*, and *krt19* *krt18*, are related to the development of various liver disorders (Toivola et al., 2015).

In BY embryos, we found changes in gene expression of *nefm*. This gene encodes a component of neurofilaments and has been reported as a biomarker of neuronal injury and neurodegenerative disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's, and Parkinsons disease (Hägmark et al., 2014; Laser-Azogui et al., 2015). Several studies have linked exposure to environmental pollutants such as particulate material (Calderón-Garcidueñas et al., 2015; Palacios et al., 2014), metals (Colin-Barenque et al., 2015; Fulgenzio et al., 2014), and organic compounds such as PAHs and organochlorine (Costa et al., 2014; Steenland et al., 2014) with neurological damage, neuropathy, attention deficits, cognitive disorders, alterations in neural development and neurodegeneration. Accordingly, the low expression of *nefm* reported in this study, along with alterations *dlx2*, *otx2* and *fgf8* as detected by in situ hybridization, revealed that exposure to pollutants from coal mining could lead to neurological disorders in humans and animals exposed.

The origin of neuronal damage, as well as multiple pathology, including cancer, diabetes, inflammation, hormone disorders, immunological, among others, has been also widely associated with the presence of oxidative stress in biological systems (Indo et al., 2015). Our results clearly show that exposure to coal extract generates an oxidative imbalance in embryos. In addition to the overexpression *gstp2* and *nqo1*, RNAseq analysis shows a significant reduction of the expression of *nos1* (nitric oxide synthase 1, neuronal), a key regulatory gene in the developing of zebrafish spine and whose decrease could explain the phenotypic changes observed in the body of the embryos (Bradley et al., 2010).

Similar to the effect reported in zebrafish exposed to PAHs (Jayasundara et al., 2015), several genes involved in calcium binding were differentially expressed in embryos treated with coal extract. Among these, low levels of transcripts *mylpf* (myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle b) *casq1* (calsequestrin 1), *capn3* (calpain 3), *pvalb1* (parvalbumin 1) and *pvalb2* (parvalbumin 2), are most important. These results together with the low expression of *nkx2.5* and *myl7* observed in in situ hybridization assays, suggest the hypothesis that the mixture of pollutants contained in coal extract carried a negative regulation on the transcription of key genes in cardiogenesis and gene precursors of calcium binding protein which are essential for cardiac muscle contraction.

Alterations in the transcription of genes involved with extracellular matrix (ECM) -receptor interaction and focal adhesion, were also observed in all embryos exposed to coal extract. Among these, the decrease in the expression of some genes encoding collagen, such as, *col1a1a* (collagen, type I, alpha 1a), *col1a1b* (collagen, type I, alpha 1b), and *col1a2* (collagen, type I, alpha 2) were the most important. Considering that collagen participates actively in organogenesis and in maintaining tissue structure and function (Jessen, 2014),

the transcriptomic alterations mentioned could be linked with the appearance of aberrant phenotypes generated in embryos exposed to coal extract (Duran et al, 2011;. Jessen, 2014).

In conclusion, exposure to coal extract generated phenotypic aberrations in zebrafish embryos, mainly characterized by alterations in the morphology of the head, tail, body and heart. Overexpression pattern of *cyp1*, *ahr2*, *nqo1*, *gstp1* and *gstp2*, among other genes, suggests that the mixture of pollutants from coal dust, induce oxidative stress and activation of AhR. However, the diversity of genomic alterations found suggest that probably there are AhR-independent toxicity mechanisms. Moreover, genes associated with intermediate filaments, calcium binding, ECM-receptor interactions and focal adhesion were altered in all embryos exposed to coal extract. These findings, together with overexpression of genes related with oxidative stress reported in wild mice from coal mines (Guerrero-Castilla et al., 2014) and activation of AhR and DNA repair pathways in cells exposed to extract coal (Guerrero-Castilla and Olivero-Verbel, 2014), show that the pollutants associated with coal mining, impact not only the health of biota and humans exposed, but also cause severe alterations in embryonic development of vertebrate organisms.

Acknowledgements

This research was supported by Huntsman Cancer Institute, Utah University and the Administrative National Department of Science, Technology and Innovation of Colombia, Bogota, Colombia (Colciencias) (Grant 110749326186).
quantification of these genes that evidence activation pathways cellular stress response caused by the presence of contaminants in the coal extract.

Table 1. RT-PCR Primer Sequences

Gene name	Gene	Entrez	Forward	Reverse	Amplicon
NAD(P)H dehydrogenase,	<i>nq01</i>	NM_205542.1	AGCCTTCATGGAGACATCAAC	AGAAACGCAGCACTCCATTC	61
Glutathione S-transferase pi 2	<i>gstp2</i>	NM_001020513.1	CTGGCGGACAAAGAGCAG	AGGCAGCTGTCCAAAGAGAC	99
Cytochrome P450 1A1	<i>cyp1a1</i>	AF210727.2	AAAGACACCTGCGTGTGTGTA	GAGGGATCCTTCCACAGTTCT	68
Aryl hydrocarbon receptor 2	<i>ahr2</i>	NM_131264.1	GAAGAAGCCCGTTCAGAAAA	GGGTTGGATTTCCACACCATC	60
Aryl hydrocarbon receptor	<i>arnt</i>	NM_001007789.1	ACCAACACCAACGTCAAGC	GGCTGTTTTTCATAGGGTGCT	88
Eukaryotic translation	<i>eef1a1</i>	AY422992.1	CCTTCGTCCCAATTCAGG	CCTTGAACCAGCCCATGTT	72

Table 2. Genes with similar expression in all phenotypes compared with WT embryos. Genes up-regulated are presented as positive values; genes down-regulated are presented as negative values. P1, P2 and P3: Phenotypes 1, 2 and 3 respectively. P < 0.05.

Gene name	Gene symbol	Biological Process / Molecular Function	Fold change		
			P1	P2	P3
Actinodin1	<i>and1</i>	Cartilage development	-2.86	-2.64	-5.06
Actinodin2	<i>and2</i>	Cartilage development	-2.93	-4.23	-6.31
Apolipoprotein A-IV	<i>apoa4</i>	Lipid binding	-2.79	-3.03	-3.33
Chromosome 17 open reading frame 67	<i>c6h17orf67</i>	No data available	-2.60	-2.60	-3.10
Crystallin, beta B1	<i>crybb1</i>	Proteins of vertebrate eye lens	-2.97	-3.12	-4.31
Crystallin, beta B1, like 1	<i>crybb11</i>	Proteins of vertebrate eye lens	-2.88	-3.33	-4.76
Crystallin, beta B1, like 1	<i>crybb12</i>	Proteins of vertebrate eye lens	-2.87	-3.01	-5.00
Cytochrome P450, family 1, subfamily A	<i>cyp1a</i>	Cellular aromatic compound metabolic process	10.89	12.33	12.60
Cytochrome P450, family 1, subfamily B,	<i>cyp1b1</i>	Oxidation-reduction process	5.88	9.41	10.26
Cytochrome P450, family 1, subfamily C,	<i>cyp1c1</i>	Oxidation-reduction process	4.00	7.88	8.22
Dopachrome tautomerase	<i>dct</i>	Metal ion binding / melanin synthesis	-3.02	-2.93	-3.69
Glutathione S-transferase pi 1	<i>gstp1</i>	Glutathione transferase activity	3.40	3.66	4.18
Im:7150988	<i>im:7150988</i>	No data available	4.27	4.86	5.29
Keratin 23 (histone deacetylase)	<i>krt23</i>	Intermediate filament proteins	-4.08	-4.17	-6.32
LON peptidase N-terminal domain and	<i>lonrf1</i>	Proteolysis / ATP-dependent peptidase activity	3.43	3.54	3.68
Myosin light chain, phosphorylatable,	<i>mylpfb</i>	Calcium ion binding	-4.35	-3.49	-4.90
Solute carrier family 16	<i>slc16a9b</i>	Transmembrane transport / Integral component of	3.21	3.47	5.65
Sulfotransferase family, cytosolic, 6b,	<i>sult6b1</i>	Cellular response to xenobiotic stimulus /	4.58	6.38	7.24
TCDD-inducible poly(ADP-ribose)	<i>tiparp</i>	Cellular response to xenobiotic stimulus / NAD+	2.22	3.54	3.77

Table 3. Number of genes differentially expressed compared to controls (WT) in the main ontologies generated for each phenotype. FDR>100, P<0.05, Z Score>1.96.

Ontology type	Number of ontology categories / Number of differentially expressed genes		
	Phenotype 1	Phenotype 2	Phenotype 3
Cellular component	3 / 15	3 / 23	4 / 36
Molecular function	5 / 69	10 / 90	8 / 57
Biological process	3 / 32	9 / 107	5 / 40
Pathway – KEGG	6 / 28	3 / 13	3 / 12

Table 4. Cellular components, molecular function, biological processes, biological functions and pathway altered in phenotype 1 compared with WT. FDR>100, P<0.05, Z Score>1.96.

Ontology Type	Ontology Name	ID	Z score	P	Number Gene	Percent Gene	Symbols Gene changed
Cellular	Intermediate filament	GO:0005882	14.8603724	0.029	9	18.37	<i>krt18 krt1-19d krt4 krt5 nefm krtt1c19e krt17 krt92 krt97c8a c8b c9</i>
	Membrane attack complex	GO:0005579	14.4957647	0.029	3	50	
	Myosin filament	GO:0032982	10.1060956	0.029	3	25	<i>myhz1.1 myhz1.2 myhz1.3</i>
	DNA photolyase activity	GO:0003913	10.1060956	0.029	3	25	<i>cry-dash cry1a cry5</i>
Molecular function	Heme binding	GO:0020037	6.9252469	0.029	8	5.44	<i>cyb5a cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1 hbae3 hbbe1.1 nos1</i>
	Oxidoreductase activity	GO:0016705	5.2197365	0.029	7	3.95	<i>cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1 egln3 nos1 tyrp1b</i>
	Calcium ion binding	GO:0005509	4.7971148	0.029	16	2.13	<i>CASQ1 (1 of 2) CDH26 MYLPF (2 of 2) actn3a actn3b atp2a1 capn3 eef2k myl1 mylz2</i>
	Morphogen activity	GO:0016015	4.2160213	0.029	35	1.34	<i>CNDP1 TYRP1 (1 of 2) atp2a1 capn3 ces2 ckma ckmb ckmt1 cry5 ctsl</i>
Biological process	Response to chemical stimulus	GO:0042221	7.3388331	0.029	14	3.90	<i>c9 cry1a cyb5a cyp26a1 fbp1b gstp1 im:7150988 mt2 nr0b2a pc per2 rbp4 sult6b1 tiparp</i>
	Response to light stimulus	GO:0009416	5.794846	0.029	4	7.14	<i>cry1a cry5 per2 tef</i>
	Oxidation-reduction	GO:0055114	4.1139677	0.029	14	1.96	<i>cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1 dao.1 egln3 grhprb hao1 mdh1b nos1 sardh smox tyrp1b zgc:92066</i>
Pathway	Arginine and proline metabolism	KEGG-dre00330	5.9240749	0.021	5	8.06	<i>ckma ckmt1 dao.1 nos1 odc1</i>
	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	KEGG-dre00980	5.2180846	0.021	3	10	<i>cyp1b1 gstp1 zgc:158387</i>
	ECM-receptor interaction	KEGG-dre04512	4.7905304	0.021	4	6.90	<i>col1a1a col1a1b col1a2 tnw</i>
	Focal adhesion	KEGG-dre04510	4.7153725	0.021	8	4.07	<i>MYLPF (2 of 2) actn3a actn3b col1a1a col1a1b col1a2 mylz2 t</i>
	Glutathione metabolism	KEGG-dre00480	4.4416778	0.021	3	7.69	<i>gstp1 odc1 zgc:158387</i>
	Tight junction	KEGG-dre04530	3.3521278	0.030	5	3.60	<i>MYLPF (2 of 2) actn3a actn3b myhz1.1 mylz2</i>

Table 5. Cellular components, molecular function, biological processes, biological functions and pathway altered in phenotype 2 compared with WT. FDR>100, P<0.05, Z Score>1.96.

Ontology Type	Ontology Name	ID	Z score	P	Number	Percent	Symbols Gene changed
Cellular component	Cytoskeleton	GO:0005856	4.0188745	0.0040	12	2.40	<i>krt18 plec krt1-</i>
	Membrane attack complex	GO:0005579	14.034285	0.0174	3	50	<i>c8a c8b c9</i>
	Intermediate filament	GO:0005882	12.700010	0.0174	8	16.33	<i>krt18 krt1-19d krt15 krt5 krtt1c19e krt17 krt92 krt97</i>
Molecular function	DNA photolyase activity	GO:0003913	13.133416	0.0174	4	33.33	<i>cry-dash cry1a cry2b cry5</i>
	Water transmembrane	GO:0005372	8.676529	0.0174	3	20	<i>aqp3a mipa mipb</i>
	Iron ion binding	GO:0005506	8.441404	0.0174	13	5.39	<i>cyb5a cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1 duox egln3 nos1</i>
	Oxidoreductase activity	GO:0016705	7.620565	0.0174	10	5.65	<i>PRDX1 cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1 egln3 nos1 p4h</i>
	Structural molecule activity	GO:0005198	6.912068	0.0174	14	3.82	<i>COL22A1 KRT18 (2 of 3) col1a1a col1a1b crygn2 krt1-</i>
	Electron carrier activity	GO:0009055	5.0918054	0.0174	7	4.07	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1 duox mt-cyb</i>
	Monoxygenase activity	GO:0004497	4.9272990	0.0174	5	4.95	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp26a1</i>
	Morphogen activity	GO:0016015	4.2827545	0.0174	37	1.42	<i>C11H1orf93 CNDP1 DHRS13 (3 of 5) FUT9 (15 of</i>
	Calcium ion binding	GO:0005509	3.6362915	0.0174	14	1.87	<i>CAPN3 (2 of 2) CASQ1 (1 of 2) CDH26 MYLPF (2 of</i>
	Biological process	Heterocycle metabolic	GO:0046483	3.1878044	0.0040	10	2.11
Nitrogen compound		GO:0006807	3.1878044	0.0040	10	2.11	<i>H1FO cry-</i>
Aromatic compound		GO:0006725	3.1878044	0.0040	10	2.11	<i>H1FO cry-</i>
Water transport		GO:0006833	8.676529	0.0174	3	20	<i>aqp3a mipa mipb</i>
Response to chemical stimulus		GO:0042221	8.248139	0.0174	16	4.46	<i>c9 cry1a cyb5a cyp26a1 duox foxq1a gstp1 im:7150988 mt2 nr</i>
Response to light stimulus		GO:0009416	7.1319498	0.0174	5	8.93	<i>Ob2a pc per2 rbp4 sult6b1 tiparp tp53</i>
Negative regulation of		GO:0009890	6.5025393	0.0174	6	6.60	<i>cry1a cry5 per2 tef tp53</i>
Oxidation-reduction		GO:0055114	6.975796	0.0174	20	2.80	<i>C11H1orf93 DHRS13 (3 of</i>
Appendage development		GO:0048736	6.404977	0.0367	3	11.54	<i>and1 and2 frem2a</i>
Organic substance transport		GO:0071702	5.222785	0.0174	7	4.22	<i>APOB (3 of 3) apoa4 aqp3a oca2 si:dkey-7f3.15 slc1a4 ttna</i>
Pathway	ECM-receptor interaction	KEGG-	5.217110	0.0375	4	6.90	<i>col1a1a col1a1b lamb4 tnw</i>
	Arginine and proline	KEGG-	5.002219	0.0375	4	6.45	<i>ckmt1 nos1 odc1 p4ha1b</i>
	Focal adhesion	KEGG-	5.103219	0.0375	5	2.54	<i>MYLPF (2 of 2) col1a1a col1a1b lamb4 tnw</i>

Table 6. Cellular components, molecular function, biological processes, biological functions and pathway altered in phenotype 3 compared with WT. FDR>100, P<0.05, Z-score>1.96.

Ontology	Ontology Name	ID	Z score	P	Number	Percent	Symbols Gene changed
Cellular component	Extracellular region	(GO:0005576	3.2703095	0.004	10	1.47	<i>ANGPTL4 WFIKKN1 agtl apoa4 col1a1b lamb4 p4ha1b si:dkey-7f3.15 thbs2b tnw</i>
	Cytoskeleton	(GO:0005856	3.1893790	0.009	8	1.60	<i>krt18 gys2 krt1-19d myhz1.1 myhz1.2 krtt1c19e krt17 krt97</i>
	Protein complex	(GO:0043234	2.3764378	0.009	13	1.04	<i>C7 (1 of 2) C7 (2 of 2) KRT18 (2 of 3) foxq1a hbbe1.1 krt1-</i>
	Intermediate	(GO:0005882	9.4266757	0.034	5	10.20	<i>krt18 krt1-19d krtt1c19e krt17 krt97</i>
Molecular function	Phosphofructokinase	(GO:0008443	11.301041	0.034	3	23.08	<i>pfkfb4 pfkma pfkmb</i>
	Water	(GO:0005372	10.483799	0.034	3	20	<i>aqp3a mipa mipb</i>
	Heme binding	(GO:0020037	8.3168036	0.034	8	5.44	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp2aa8 duox hbbe1.1 nos1</i>
	Oxidoreductase	(GO:0016705	7.4206952	0.034	8	4.52	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp2aa8 nos1 p4ha1b tyrp1b</i>
	Structural molecule	(GO:0005198	6.6590319	0.034	11	3.00	<i>CABZ01076094.1 COL22A1 KRT18 (2 of 3) col1a1b crygn2 krt1-19d lim2.4 si:dkeyp-</i>
	Electron carrier	(GO:0009055	6.4911926	0.034	7	4.07	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp2aa8 duox smox</i>
	Monooxygenase	(GO:0004497	6.1984896	0.034	5	4.95	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp2aa8</i>
	Calcium ion binding	(GO:0005509	4.1775983	0.034	12	1.60	<i>CAPN3 (2 of 2) CASQ1 (1 of 2) CDH26 EFHD1 MYLPP (2 of</i>
Biological process	Organic substance	(GO:0071702	5.5580587	0.034	6	3.61	<i>APOB (3 of 3) SLC13A4 apoa4 aqp3a si:dkey-7f3.15 slc7a3</i>
	Response to	(GO:0042221	4.5317112	0.034	8	2.23	<i>duox foxq1a gstp1 gys2 jim:7150988 rbp4 sult6b1 tiparp</i>
	Oxidation-reduction	(GO:0055114	4.3770963	0.034	12	1.68	<i>cyp17a1 cyp1b1 cyp1c1 cyp1c2 cyp2aa8 duox gys2 nos1 p4ha1b smox tyrp1b zgc:9206</i>
	Water transport	(GO:0006833	10.483799	0.034	3	20	<i>aqp3a mipa mipb</i>
	Transmembrane	(GO:0055085	3.8218477	0.034	11	1.53	<i>SLC13A4 abcb11a aqp3a mipa mipb ryr3 slc16a9a slc16a9b slc25a4 slc7a3 slco1d1</i>
Pathway KEGG	ECM-receptor	KEGG-	6.1142330	0.030	4	6.90	<i>col1a1b lamb4 tnw vtna</i>
	Fructose and	KEGG-	5.2503191	0.030	3	6.82	<i>pfkfb4 pfkma pfkmb</i>
	Focal adhesion	KEGG-	3.4974655	0.030	5	2.54	<i>MYLPP (2 of 2) col1a1b lamb4 tnw vtna</i>

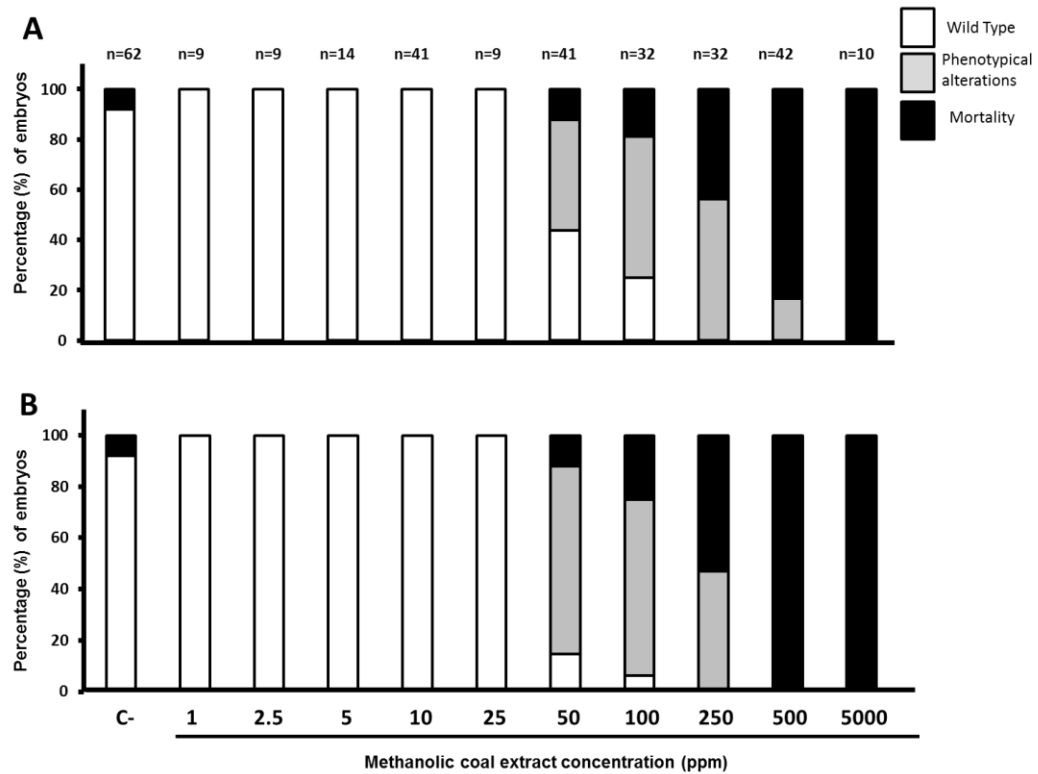


Fig. 1. A. Dose-response assessment of the methanolic coal extract in Zebrafish embryos at 24 hpf. (C-) Negative Control, DMSO 1%. B. Dose-response assessment of the methanolic coal extract in Zebrafish embryos at 48/72 hpf. (C-) Negative Control, DMSO 1%.

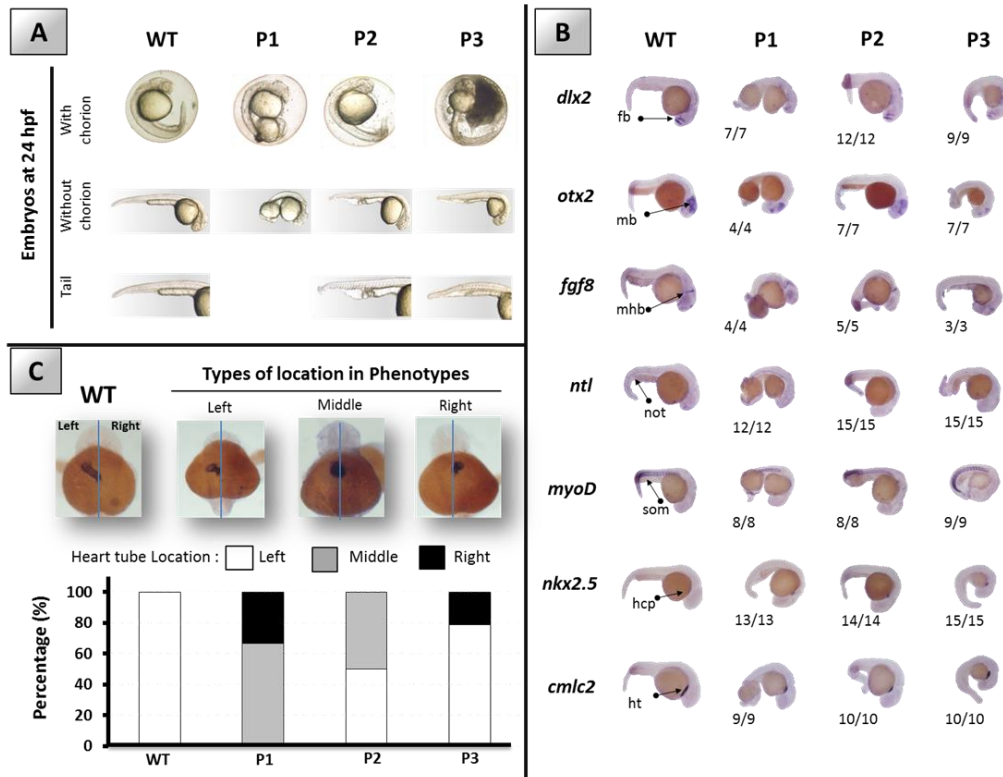
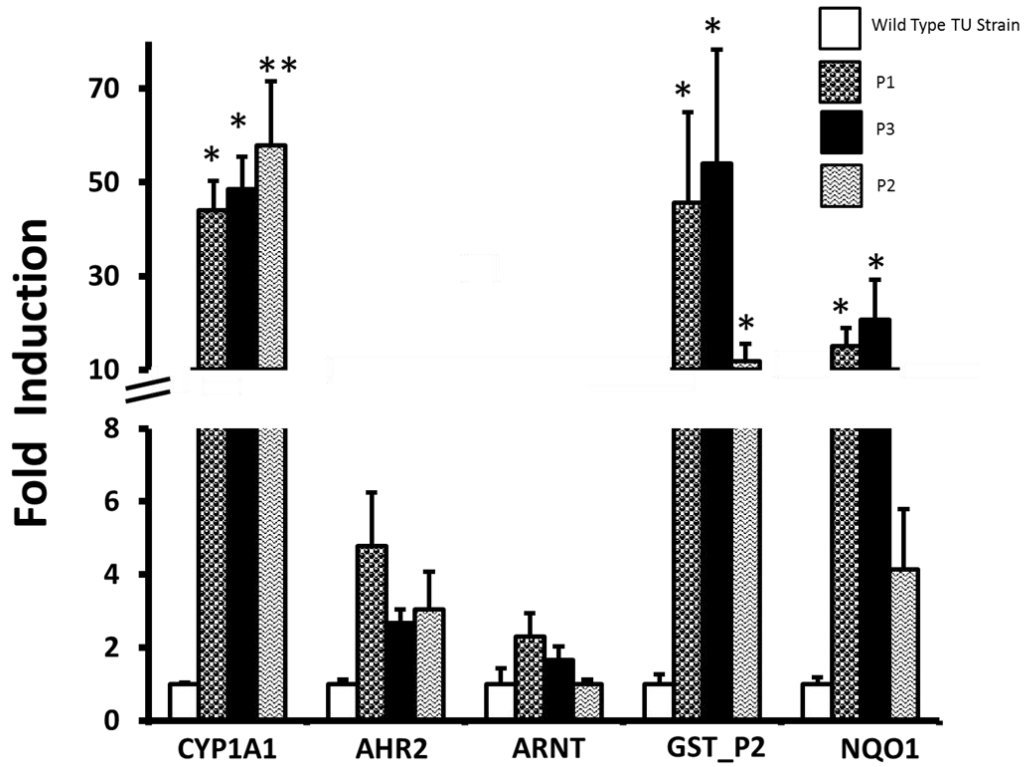


Fig. 2. A. Phenotypes generated in the embryos exposed to 100 ppm of methanolic coal extract 24 hpf. B. In situ hybridization analysis of BY, BT and BE embryos compared with control, WT. Brain markers: *dlx2*, *otx2*, *fgf8*. Tail and body markers: *ntl*, *myoD*. Cardiac System markers: *nkx2.5*, *cmlc2*. (fb, forebrain; mb, midbrain; mhb, mid/hindbrain boundary; hb, hindbrain); (not, notochord; som, somites; sc, spinal cord); (hcp, heart-cardiac progenitors; ht, heart). C. Location and developmental defects in the heart tube to three phenotypes generated from coal extract treatment. *cmlc2* expression was performed to determine the location left, middle or right of the heart tube. The graphic shows the percentage of embryos with different locations to each phenotype.



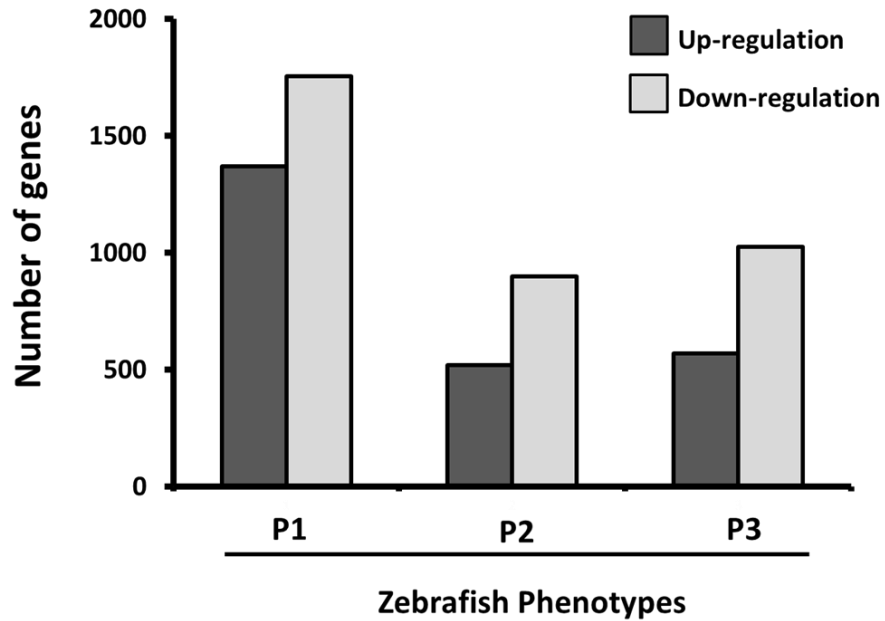


Fig. 4. Gene expression patterns in the three phenotypes of zebrafish embryos exposed to coal extract, based on the number of genes up-regulated and down-regulated respect to WT. FDR values > 100.

Reference List

- Alpern Boris, Lemos de Sousa M.J. (2002) Documented international enquiry on solid sedimentary fossil fuels; coal: definitions, classifications, reserves-resources, and energy potential. *International Journal of Coal Geology*, 50, 3-41.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert.Rev.Mol.Diagn.*, 5, 209-219.
- Bradley, S., Tossell, K., Lockley, R., McDearmid, J. R. (2010) Nitric oxide synthase regulates morphogenesis of zebrafish spinal cord motoneurons. *J.Neurosci.*, 30, 16818-16831.
- Brown, D. R., Clark, B. W., Garner, L. V., Di Giulio, R. T. (2015) Zebrafish cardiotoxicity: the effects of CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.*, 22, 8329-8338.
- Calderon-Garciduenas, L., Kulesza, R. J., Doty, R. L., D'Angiulli, A., Torres-Jardon, R. (2015) Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environ.Res.*, 137C, 157-169.
- Chen, J. Y., Chang, B. E., Chen, Y. H., Lin, C. J., Wu, J. L., Kuo, C. M. (2001) Molecular cloning, developmental expression, and hormonal regulation of zebrafish (*Danio rerio*) beta crystallin B1, a member of the superfamily of beta crystallin proteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 285, 105-110.
- Colin-Barenque, L., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O., Jimenez-Martinez, R., Bizarro-Nevaras, P., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Fortoul, T. I. (2015) Functional and morphological olfactory bulb modifications in mice after vanadium inhalation. *Toxicol.Pathol.*, 43, 282-291.
- Coronado-Posada, N., Cabarcas-Montalvo, M., Olivero-Verbel, J. (2013) Phytotoxicity assessment of a methanolic coal dust extract in *Lemna minor*. *Ecotoxicol.Environ.Saf.*, 95, 27-32.
- Corrales, J., Thornton, C., White, M., Willett, K. L. (2014) Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquat.Toxicol.*, 148, 16-26.
- Costa, L. G., Cole, T. B., Coburn, J., Chang, Y. C., Dao, K., Roque, P. (2014) Neurotoxicants are in the air: convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain. *Biomed.Res.Int.*, 2014, 736385.

Duran, I., Mari-Beffa, M., Santamaria, J. A., Becerra, J., Santos-Ruiz, L. (2011) Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Dev.Biol.*, 354, 160-172.

Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M., Goldman, R. D. (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J.Clin.Invest*, 119, 1763-1771.

Fishman, M. C., Stainier, D. Y., Breitbart, R. E., Westerfield, M. (1997) Zebrafish: genetic and embryological methods in a transparent vertebrate embryo. *Methods Cell Biol.*, 52, 67-82.

Fulgenzi, A., Vietti, D., Ferrero, M. E. (2014) Aluminium involvement in neurotoxicity. *Biomed.Res.Int.*, 2014, 758323.

Gavriouchkina, D., Fischer, S., Ivacevic, T., Stolte, J., Benes, V., Dekens, M. P. (2010) Thyrotroph embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. *PLoS.One.*, 5, e12542.

Goodale, B. C., Tilton, S. C., Corvi, M. M., Wilson, G. R., Janszen, D. B., Anderson, K. A., Waters, K. M., Tanguay, R. L. (2013) Structurally distinct polycyclic aromatic hydrocarbons induce differential transcriptional responses in developing zebrafish. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 272, 656-670.

Guerrero-Castilla, A., Olivero-Verbel, J. (2014) Altered gene expression in HepG2 cells exposed to a methanolic coal dust extract. *Environ.Toxicol.Pharmacol.*, 38, 742-750.

Guerrero-Castilla, A., Olivero-Verbel, J., Marrugo-Negrete, J. (2014) 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. *Mutat.Res.Genet.Toxicol.Environ.Mutagen.*, 762, 24-29.

Guharoy, M., Szabo, B., Contreras, M. S., Kosol, S., Tompa, P. (2013) Intrinsic structural disorder in cytoskeletal proteins. *Cytoskeleton (Hoboken.)*, 70, 550-571.

Haggmark, A., Mikus, M., Mohsenchian, A., Hong, M. G., Forsstrom, B., Gajewska, B., Baranczyk-Kuzma, A., Uhlen, M., Schwenk, J. M., Kuzma-Kozakiewicz, M., Nilsson, P. (2014) Plasma profiling reveals three proteins associated to amyotrophic lateral sclerosis. *Ann.Clin.Transl.Neurol.*, 1, 544-553.

Halliwell, B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr.Rev.*, 70, 257-265.

- Hou, H. H., Kuo, M. Y., Luo, Y. W., Chang, B. E. (2006) Recapitulation of human betaB1-crystallin promoter activity in transgenic zebrafish. *Dev.Dyn.*, 235, 435-443.
- Incardona, J. P., Collier, T. K., Scholz, N. L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 196, 191-205.
- Incardona, J. P., Linbo, T. L., Scholz, N. L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 257, 242-249.
- Indo, H. P., Yen, H. C., Nakanishi, I., Matsumoto, K., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Suenaga, S., Oki, M., Sato, T., Ozawa, T., Clair, D. K., Majima, H. J. (2015) A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J.Clin.Biochem.Nutr.*, 56, 1-7.
- Jayasundara, N., Van Tiem, G. L., Meyer, J. N., Erwin, K. N., Di Giulio, R. T. (2015) AHR2-Mediated Transcriptomic Responses Underlying the Synergistic Cardiac Developmental Toxicity of PAHs. *Toxicol.Sci.*, 143, 469-481.
- Jessen, J. R. (2014) Recent advances in the study of zebrafish extracellular matrix proteins. *Dev.Biol.* Dec 29. pii: S0012-1606(14)00652-6. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.12.022.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev.Dyn.*, 203, 253-310.
- Lam, S. H., Mathavan, S., Tong, Y., Li, H., Karuturi, R. K., Wu, Y., Vega, V. B., Liu, E. T., Gong, Z. (2008) Zebrafish whole-adult-organism chemogenomics for large-scale predictive and discovery chemical biology. *PLoS.Genet.*, 4, e1000121.
- Laser-Azogui, A., Kornreich, M., Malka-Gibor, E., Beck, R. (2015) Neurofilament assembly and function during neuronal development. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 32C, 92-101.
- Lee, H. S., Yang, M. (2008) Applications of CYP-450 expression for biomonitoring in environmental health. *Environ.Health Prev.Med.*, 13, 84-93.

Li, Z. H., Xu, H., Zheng, W., Lam, S. H., Gong, Z. (2013) RNA-sequencing analysis of TCDD-induced responses in zebrafish liver reveals high relatedness to in vivo mammalian models and conserved biological pathways. *PLoS.One.*, 8, e77292.

MacPherson, L., Ahmed, S., Tamblyn, L., Krutmann, J., Forster, I., Weighardt, H., Matthews, J. (2014) Aryl hydrocarbon receptor repressor and TiPARP (ARTD14) use similar, but also distinct mechanisms to repress aryl hydrocarbon receptor signaling. *Int.J.Mol.Sci.*, 15, 7939-7957.

Mamurekli, D. (2010) Environmental impacts of coal mining and coal utilization in the UK. *Acta Montanistica Slovaca Roènik*, 15, 134-144.

McCurley, A. T., Callard, G. V. (2008) Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC.Mol.Biol.*, 9, 102.

Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX.*, 19 Suppl 1, 38-48.

Palacios, N., Fitzgerald, K. C., Hart, J. E., Weisskopf, M. G., Schwarzschild, M. A., Ascherio, A., Laden, F. (2014) Particulate matter and risk of Parkinson disease in a large prospective study of women. *Environ.Health*, 13, 80.

Smith, K. R., Frumkin, H., Balakrishnan, K., Butler, C. D., Chafe, Z. A., Fairlie, I., Kinney, P., Kjellstrom, T., Mauzerall, D. L., McKone, T. E., McMichael, A. J., Schneider, M. (2013) Energy and human health. *Annu.Rev.Public Health*, 34, 159-188.

Sperber, S. M., Saxena, V., Hatch, G., Ekker, M. (2008) Zebrafish *dlx2a* contributes to hindbrain neural crest survival, is necessary for differentiation of sensory ganglia and functions with *dlx1a* in maturation of the arch cartilage elements. *Dev.Biol.*, 314, 59-70.

Steenland, K., Mora, A. M., Barr, D. B., Juncos, J., Roman, N., Wesseling, C. (2014) Organochlorine chemicals and neurodegeneration among elderly subjects in Costa Rica. *Environ.Res.*, 134, 205-209.

Toivola, D. M., Boor, P., Alam, C., Strnad, P. (2015) Keratins in health and disease. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 32C, 73-81.

Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005) The power of real-time PCR. *Adv.Physiol Educ.*, 29, 151-159.

Wang, Y., Szczesna-Cordary, D., Craig, R., Diaz-Perez, Z., Guzman, G., Miller, T., Potter, J. D. (2007) Fast skeletal muscle regulatory light chain is required for fast and slow skeletal muscle development. *FASEB J.*, 21, 2205-2214.

Wilkinson, P., Smith, K. R., Joffe, M., Haines, A. (2007) A global perspective on energy: health effects and injustices. *Lancet*, 370, 965-978.

Zhang, C., Ojiaku, P., Cole, G. J. (2013a) Forebrain and hindbrain development in zebrafish is sensitive to ethanol exposure involving agrin, Fgf, and sonic hedgehog function. *Birth Defects Res.A Clin.Mol.Teratol.*, 97, 8-27.

Zhang, J., Wagh, P., Guay, D., Sanchez-Pulido, L., Padhi, B. K., Korzh, V., Andrade-Navarro, M. A., Akimenko, M. A. (2010) Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature*, 466, 234-237.

Zhang, Y., Huang, L., Wang, C., Gao, D., Zuo, Z. (2013b) Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9. *Chemosphere*.

Zhang, Y., Wang, C., Huang, L., Chen, R., Chen, Y., Zuo, Z. (2012) Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat.Toxicol.*, 114-115, 119-124.



4. **Discusión
General**

En conjunto, los resultados obtenidos en ratones silvestres, células HepG2 y embriones de zebrafish, revelan que la exposición a los contaminantes derivados del polvillo de carbón altera el estado transcripcional de los sistemas biológicos y el desarrollo embrionario de vertebrados.

Ratones que viven cerca de zonas con operaciones mineras carboníferas podrían estar expuestos a una mezcla compleja de contaminantes ambientales que alteran su estado bioquímico y celular. Animales recolectados en áreas mineras del Nororiente Colombiano presentaron altas concentraciones hepáticas de los metales Cu, Cd y Zn, más que aquellos de los sitios de referencia. Estos hallazgos aparecen junto con variaciones en la expresión de mRNA de genes relacionados con estrés oxidativo, transporte de metales y daño al DNA. Estos datos son los primeros que muestran cambios en la expresión génica de ratones silvestres expuestos a minería de carbón.

Ha sido establecido que las operaciones mineras carboníferas están vinculadas con la exposición de metales, que generan un riesgo para salud de los habitantes de la zona, tras llegar a suelos y ecosistemas acuáticos aledaños (Keating, 2001). Metales tales como el Pb, Cd, Hg, Mn, Ni, Cr, así como el metaloide As, han sido reportados como los más peligrosos contaminantes en diferentes tipos de carbón (Saunders et al., 2012). De hecho, en muestras de suelo de regiones mineras carboníferas han sido encontrados niveles altos de As, Mn, Zn, Pb y Ti (Wang et al., 2010). De forma similar, el análisis de agua potable procedente de áreas cercanas a minas de carbón en Bangladesh, confirmó la presencia de Mn, Cu, Co, Zn, Pb, Sr y Ni, como resultado de contaminación por drenajes ácidos mineros que finalmente afectan la salud de los individuos y del ecosistema (Bhuiyan et al., 2010). Sumado a lo anterior, niveles séricos de Cd > 0.5 µg/dL, han sido reportados en niños que viven en zonas adyacentes a minas de carbón (Yapici et al., 2006). El Cd ambiental induce daño principalmente en riñones e hígado por estrés oxidativo (Sanchez-Chardi et al., 2009; Wu et al., 2012) y la presencia de otros metales tales como Pb y Cu, ha sido implicada con la progresión de la toxicidad por este metal (Liu et al., 2009).

Los metales Cd, Cu y Zn con altas concentraciones en el tejido hepático de los ratones capturados, están incluidos en el grupo de metales pesados. Sin embargo, Cu y Zn son requeridos por los mamíferos, mientras que Cd es considerado un elemento tóxico. En general, los metales pesados tóxicos son usualmente relacionados con el desarrollo de varios tipos de cáncer, neurodegeneración, desordenes reproductivos, diabetes, enfermedades crónicas renales y patologías pulmonares y hepáticas, entre otros (Chen et al., 2007; Jarup, 2003). Usualmente estos elementos tienen el potencial de inducir daño en el material genético a través de diferentes mecanismos moleculares, tales como estrés oxidativo (Bayersmann and Hartwing, 2008; Cohn et al., 2006; Cohn et al., 2010; Leonard et al., 2004; Mattagajasingh et al., 2008; Nemmiche et al., 2011), bloqueo de los

procesos de reparación de DNA (Piatek et al., 2008; Whiteside et al., 2010) y alteraciones en la regulación de la proliferación celular (Salnikow and Zhitkovich, 2008; Nickens et al., 2010). Estos efectos son vinculados a la acción del peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo producidos a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Cohn et al., 2006; Cohn et al., 2010). La producción de ROS, no sólo causa daño tisular. En el pulmón, estos activan factores de transcripción tales como el factor nuclear kappa-B y la proteína activadora 1, los cuales inducen la transcripción de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento asociados con daño pulmonar y la fibrosis característica de la pneumoconiosis del minero, principal enfermedad pulmonar asociada a la minería de carbón (McCunney et al., 2009).

La exposición de metales pesados y otros contaminantes relacionados con la minería de carbón resulta en la activación transcripcional de genes citoprotectores, también conocidos como genes de respuesta rápida frente a estresores [Saeedi et al., 2012; Mahadevan et al., 2011]. Entre las vías intracelulares activadas por contaminantes ambientales, el estrés oxidativo y el daño al DNA son los mecanismos comunes de varios agentes tóxicos, tales como metales pesados, hidrocarburos aromáticos polinucleares y material particular (Simmons et al., 2011; Moller et al., 2013; Verma et al., 2012). En este trabajo, algunos biomarcadores génicos relacionados con la respuesta frente al estrés celular fueron significativamente sobreexpresados en tejido hepático de ratones capturados en áreas mineras carboníferas.

Lo anterior fue evidenciado por la sobreexpresión de NQO1 en los ratones que habitan cerca a las áreas con operaciones mineras carboníferas. La expresión de este gen involucra al factor de transcripción NRF2 (Nuclear factor erythroid 2 – related factor 2) y al elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Simmons et al., 2011). La vía NRF2/ARE ha sido relacionada con la sobreexpresión de metalotioneinas y NQO1 (He et al., 2008). En este estudio, no sólo NQO1 (Incrementada hasta 2.2 veces), sino también MT1 (hasta 7.3 veces) y MT2 (Hasta 3.7 veces), fueron sobreexpresadas en ratones expuestos, probablemente sugiriendo que los contaminantes derivados del carbón podrían activar la vía NRF2/ARE y promover el estrés oxidativo. Adicionalmente, el hecho de que MT2 fue sobreexpresado independientemente del sitio de recolección de los ratones, representa una ventaja de este gen como biomarcador de exposición a operaciones mineras carboníferas en la biota expuesta. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para confirmar esta hipótesis.

La inducción de DDIT3 fue observada en el hígado de ratones expuestos a las minas de carbón de la Loma. Este gen es frecuentemente sobreexpresado en respuesta a estrés celular y daño al DNA (Sun et al., 2011) y podría indicar que vías de señalización vinculadas al daño al DNA estarían siendo blanco de los contaminantes derivados de la industria minera de carbón. Por otra parte, sería

probable que la sobreexpresión de DDIT3 esté relacionada con los altos niveles de Zn encontrados en el tejido hepático. El Zn tiene un rol importante en el mantenimiento de la integridad del genoma por ser componente estructural esencial para las proteínas antioxidantes y enzimas reparadoras del DNA (Sharif et al., 2012).

En 2010, pequeños, pero no significativos cambios en la expresión de CYP1A1 fueron observados en ratones capturados en La Jagua, probablemente debido a la exposición a PAH. Sin embargo, la tendencia general de este gen fue hacia la una regulación negativa. Es sabido que la inducción de CYP1A1 es mediada por AhR, promoviendo el daño oxidativo de DNA (Costa et al., 2011; Lee et al., 2011; Park et al., 2009). Sin embargo, la expresión significativamente baja de CYP1A1 observada en la Loma podría estar asociada con el desarrollo concomitante de procesos inflamatorios (Gharavi and El-Kadi, 2007; Ghanem et al., 2009). Estudios adicionales son requeridos para determinar la expresión de otros genes involucrados en el metabolismo de Fase I y II del tejido hepático de animales expuestos a las actividades mineras de carbón. Por otra parte, genes tales como CCND1, DMT1 y SOD, no mostraron diferencias significativas en su expresión, sugiriendo que la exposición al polvillo de carbón, induce un específico pero complejo perfil de expresión génica, probablemente vinculado con la naturaleza y composición del mineral.

Los resultados en los ratones silvestres podrían indicar un perfil de expresión de genes y contenido de metales diferente, de acuerdo con las condiciones ambientales del muestreo. Durante el 2010, el muestreo de los ratones fue realizado al inicio del periodo de lluvias asociado con el Fenómeno del Niño en el área de estudio, mientras que en el 2011 el muestreo fue realizado luego que cesaron todas las lluvias. Esto significa que durante el último muestreo la mayoría de los contaminantes fueron arrastrados por las lluvias, lo cual fue reflejado en los bajos niveles de concentración de metales encontrados en el tejido hepático (Ver Tablas 3 y 4 - Página 73). Teniendo en cuenta que los datos están asociados principalmente a condiciones de estación lluviosa, la situación bajo condiciones de tiempo seco podría ser extremadamente crítica, y requeriría futuras investigaciones.

Se decidió reanalizar los datos expresión en los ratones considerando la variable sexo. Los resultados son presentados en la Tabla suplementaria 2 (Página 76). Interesantemente, comparado con el grupo de referencia, NQ01 (2011), MT1 (2010 y 2011) y MT2 (2011) fueron sobreexpresados aún cuando los datos fueron separados por sexo. En este sentido, se puede resaltar que para estos genes particulares, la variabilidad de la expresión vinculada al sexo en las unidades experimentales no es una limitante para detectar efectos moleculares globales inducidos por las condiciones ambientales del sitio de muestreo. Consecuentemente, esta información permitiría continuar usando organismos

silvestres para evaluar cambios moleculares derivados de la exposición a contaminantes ambientales. En algunos casos, tal como el nuestro, la magnitud de los efectos de los contaminantes sobre la biota puede ser tan grande y marcada, que no son afectados por heterogeneidad de la muestra en términos de tamaño o sexo.

Con el fin de seguir profundizando en los efectos de la mezcla de contaminantes derivados del polvillo de carbón, fueron desarrollados estudios experimentales en células HepG2 y en embriones de zebrafish expuestos a un extracto de carbón preparado a partir de una muestra de este mineral, procedente de la mina La Loma (Departamento del Cesar- Colombia).

En las células HepG2, los resultados del ensayo MTT no mostraron diferencias significativas entre la viabilidad de células tratadas y no tratadas, lo que significa que el extracto de carbón no tiene como blanco a la membrana celular. Sin embargo, el ensayo cometa indica daño significativo al DNA en células expuestas a altas concentraciones del extracto de carbón (50 -100 ppm), sugiriendo un potencial daño al DNA, similar a lo observado en ratones (Cabarcas-Montalvo et al., 2012) y anfibios (Zocche JJ et al., 2013) de zonas mineras carboníferas cuando se comparan con animales de referencia.

El efecto genotóxico inducido en células HepG2 por el extracto de carbón, de acuerdo con el ensayo cometa, podría estar relacionado con la composición del extracto de carbón. Coronado-Posada et al. (2013), encontraron que la composición química del extracto de polvillo de carbón usada en este estudio, comprende por lo menos 142 compuestos químicos diferentes, incluyendo a los bien conocidos PAHs. De hecho, Tarantini et al. (2009) observó similar daño en HepG2 tratadas con mezcla de contaminantes urbanos e industriales y benzo[a]pyrene a concentraciones de 0.16 μM .

La presencia de PAHs en el carbón es el resultado de la biogénesis y estructura de esta roca sedimentaria (Achten and Hofmann, 2009). La concentración de PAHs extractables depende de la clasificación del carbón, por ejemplo, carbones bituminosos tal como el correspondiente al polvillo de carbón evaluado en este estudio, está asociado con elevadas concentraciones de PAHs; sin embargo PAHs con anillos 2-3 alquilados están presentes en todos los carbones independientemente de su origen o rango (Laumann et al., 2011). Estos químicos representan una clase de compuestos tóxicos que han sido relacionados con una variedad de efectos, incluyendo genotoxicidad, alteraciones en la señalización celular, enfermedades inflamatorias, desordenes autoinmunes, aterosclerosis y cáncer (Henkler et al., 2012).

Por otra parte, cambios no significativos fueron observados en la expresión de mRNA de genes relacionados con estrés oxidativo, en contraste con aquellos

asociados con el daño al DNA y activación del AhR, que fueron significativamente sobreexpresados. Aunque los PAHs, tales como los encontrados en el extracto de carbón (Coronado-Posada et al., 2013), pueden inducir estrés oxidativo en células HepG2 y otros tipos de células (Castorena-Torres et al., 2008), es también conocido que en algunos casos la magnitud del daño oxidativo mediado por PAHs puede ser contrarrestada por mecanismos celulares de defensa antioxidante (Liu et al., 2001). Especies reactivas de oxígeno producidas por la acción de CYP1A1 pueden derivar de PAH-quinonas, metabolitos secundarios de PAHs, que promueven reacciones de ciclación redox, permitiendo la formación de ROS (Bock, 2012; Miranda et al., 2006). Una hipótesis alternativa podría ser que la presencia de moléculas antioxidantes en el extracto, por ejemplo, compuestos polifenólicos, podrían contrarrestar los ROS generados (Vijaya-Padma et al., 2014).

Los PAHs son conocidos por estar involucrados en la activación de las vías de señalización del receptor de hidrocarburos aromáticos y la vía Keap1/Nrf2/ARE (Kelch-like ECH-associated protein 1/Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/Antioxidant Response Element). La sobreexpresión de NQO1 (Enzima de detoxificación de fase II) en células HepG2 expuestas al extracto de carbón, podría derivar de estos dos distintos pero simultáneos mecanismos de señalización (Bock, 2012; Kohle and Bock, 2007). La transcripción de NQO1 es altamente inducible en respuesta a muchos químicos (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010) y es considerada la enzima prototipo entre las citoprotectoras (Dinkova-Kostova and Talalay, 2008), considerando que su gen contiene elementos de respuesta antioxidantes y elemento de respuesta a xenobióticos que son esenciales para desencadenar las señales inducidas por las moléculas activadoras de las vías, Nrf2 y AhR respectivamente (Kohle and Bock, 2009).

El incremento en la expresión de NQO1 como resultado de la activación de Keap1/Nrf2/ARE, es considerado una respuesta adaptativa que ocurre durante la exposición a compuestos electrofílicos y oxidantes (Osburn and Kensler, 2008). En respuesta al estrés oxidativo generado por EROs y electrófilos, la molécula represora Keap1 es liberada desde Nrf2 en el citoplasma, así Nrf2 es traslocado hacia el núcleo (Itoh et al., 2003), donde actúa como un factor de transcripción uniéndose a secuencias tipo ARE localizadas en los promotores de genes blanco tales NQO1 (Hayes et al., 2000; Stewart et al., 2003; Venugopal and Jaiswal, 1996). Estudios *in vitro* han sugerido que la activación de la vía por el benzopireno (Hockley et al., 2007; Niestroy et al., 2011), ocurre probablemente a través de la regulación negativa de Keap1 (Nguyen et al., 2010), aunque también ha sido encontrado que la activación de AhR por PAHs puede directamente inducir incrementos en la transcripción de Nrf2 (Miao et al., 2005). Por otra parte, cuando AhR es activado, este receptor se trasloca al núcleo y se asocia con la proteína Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). El heterodímero se une a elementos de respuesta antioxidante, XREs (xenobiotic response

elements), correspondientes a la secuencia consenso 5'-T/GCGTG-3', en las regiones regulatorias de genes blanco, incluyendo NQO1 (Beischlag et al., 2008).

La fuerte sobreexpresión de CYP1A1 observada en este estudio, aún a las bajas concentraciones probadas (5ppm), evidencia la activación de AhR (Barouki et., 2012) en las células HepG2, como respuesta a la presencia de PAHs en el extracto de carbón, de acuerdo con lo reportado por Coronado-Posada et al. (2013). Los niveles de inducción de CYP1A1 generados por PAHs en organismos completos o modelos celulares son variables. Por ejemplo, 75 mg/Kg de benzopireno, genera in ratas incrementos hepáticos de CYP1A1, de hasta 1700 veces (Chanyshev et al., 2014). Por otra parte, células HepG2 tratadas por varias horas a un concentración de 1 μ M de benzopireno producen aproximadamente una inducción de CYP1A1 entre 10 y 25 veces (Wu et al., 2003; Zhang et al., 2011). Estos valores son comparables con los aumentos de CYP1A1 entre 17.2 y 23.2 veces a una exposición de 5 ppm del extracto de carbón.

La proteína CYP1A1 tiene un papel central en el metabolismo de PAH, al catalizar su oxidación a epóxidos (Schwarz et al., 2001). Estos metabolitos de PAH electrofílicos pueden unirse covalentemente al DNA y potencialmente inducir mutagénesis y contribuir a la transformación celular asociada al Cáncer (Henkler et al., 2012). Además, la sobreexpresión de CYP1A1 observada en este trabajo, podría sugerir una potencial asociación del extracto de carbón con genotoxicidad, aún a concentraciones de exposición bajas (Tabla 3 – página 94). De hecho, sobreexpresión de GADD45B, fue registrada en las células HepG2 tratadas con 50 y 100 ppm del extracto de carbón, concentraciones en las cuales la inducción de CYP1A1 fue en promedio unas 163 veces más alta que en los controles. GADD45B es rápidamente inducido por daño al DNA y es reconocido como un sensor que modula la respuesta de las células de los mamíferos a genotoxicidad y estrés fisiológico, así como a la presencia de formación y progresión de tumores (Cretu et al., 2009; Liebermann et al., 2011; Tront et al., 2010).

Otros genes tales como XPA, ERCC1 y APEX1, con papeles críticos en la reparación de nucleótidos y cuya inducción es crucial para contrarrestar el daño al DNA, no fueron sobreexpresados en este estudio. Una posible hipótesis para explicar estos hallazgos es que el extracto de carbón disminuya la capacidad de reparación de nucleótidos, por la interacción entre las diversas señales y efectos generados por los contaminantes individuales presentes en esta mezcla compleja. Similar comportamiento fue reportado en estudios realizados con células HepG2 expuestas a benzopireno y 3,3',4,4',5-pentachlorobifenilo. El tratamiento individual de las células con estos contaminantes incrementó la expresión de XPA, pero la coexposición en las células fue asociada con una reducción en la expresión de este gen (Wei et al., 2009).

Es importante destacar que algunas, pero no todas las características bioquímicas observadas en los ratones procedentes de zonas mineras (Guerrero-Castilla et al., 2014), fueron detectadas en los ensayos in vitro en el presente estudio. Las principales comunalidades fueron el daño al DNA, y la sobreexpresión de genes relacionados con estrés oxidativo. Sin embargo, en contraste con nuestros datos, la expresión hepática de CYP1A1 fue reducida en los ratones, probablemente sugiriendo que algunos mecanismos de señalización intracelular podrían entrecruzarse y depender de las condiciones de exposición y sistemas biológicos, tal como ha sido observado por otros autores (Darwish et al., 2013; Anwar-Mohamed and El-Kadi, 2008).

Por otra parte, la toxicidad aguda sobre embriones de zebrafish fue tiempo y dosis dependiente. La compleja composición del extracto de carbón reportada por Coronado-Posada et al., (2013), podría también explicar la multiplicidad de defectos morfológicos y transcriptómicos observados en cabeza, cola, columna vertebral y corazón, observados en los embriones tratados.

Si bien, fueron observados diversos efectos en los embriones expuestos al extracto de carbón, la cardiotoxicidad, probablemente vinculada con la presencia de PAHs en el extracto, fue un aspecto común, independientemente del fenotipo generado. Los PAHs, agonistas del receptor de hidrocarburos aromáticos, han sido conocidos por causar variadas malformaciones (Incardona et al., 2004) y defectos cardiacos letales (Brown et al., 2014), en peces expuestos durante su estado embrionario.

Los mecanismos intracelulares que median la cardiotoxicidad de PAHs en zebrafish no son claramente conocidos. Recientes reportes de embriones tratados con benzopireno y fluoranteno sugieren que estos compuestos, pueden afectar los niveles celulares de Ca^{2+} y subsecuentemente la función del músculo cardiaco, por un mecanismo AhR2 dependiente (Jayasundara et al., 2015). Sin embargo, otros estudios han encontrado que la cardiotoxicidad de embriones de zebrafish expuestos a benzofluoranteno y fenaltreno es mediada por metaloproteinasa-9 en una vía de señalización AhR2-independiente (Incardona et al., 2011;Zhang et al., 2013b). Nosotros encontramos baja expresión de *Nkx2.5* y *cmcl2* en los embriones expuestos al extracto de carbón. Ambos genes son considerados esenciales en el desarrollo del sistema cardiovascular, de hecho, la regulación negativa de *Nkx2.5* ha sido reportada como una vía involucrada en la cardiotoxicidad embrionaria generada por PAHs a través de la activación del receptor AhR (Incardona et al., 2011;Zhang et al., 2012).

Respecto a las alteraciones encefálicas en los embriones expuestos al extracto de carbón, disminuciones de la expresión de *dlx2*, *otx2* y *fgf8*, fueron observadas. Estos hallazgos podrían estar posiblemente vinculados con malformaciones

encefálicas, ya que el gen *dlx2a* contribuye a la supervivencia de la cresta neural del cerebro posterior de los peces, también es necesario para la diferenciación sensorial y en conjunto con *dlx1a* es importante para la maduración del cartílago (Sperber et al., 2008). Adicionalmente, *otx2* es un gen esencial en el desarrollo de la región media del cerebro de los vertebrados y la expresión de *fgf8* es crítica para el desarrollo de neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y la formación del cerebro anterior (Zhang et al., 2013a).

Por otra parte, anormalidades similares a las reportadas en la primera generación de larvas expuestas a benzopireno (Corrales et al., 2014), fueron observadas en cola y la columna de todos los fenotipos de embriones expuestos al extracto de carbón (Figura 2A y 2B- página 111), Estas alteraciones podrían estar relacionadas a la expresión atípica de *ntl* y *myoD* encontradas en este estudio, considerando que ambos genes son claves en la formación de la columna y la cola de zebrafish.

El análisis transcriptómico de genes asociados con metabolismo de xenobioticos y estrés oxidativo mostró que todos los fenotipos generados por la exposición al extracto de carbón tuvieron una sobreexpresión significativa de *cyp1a1* (hasta 57 veces), *ahr2* (hasta 4 veces), *gstp2* (hasta 20 veces) and *nqo1* (hasta 53 veces). Estos resultados fueron consistentes con los efectos observados previamente en HepG2, (Guerrero-Castilla and Olivero-Verbel, 2014). De acuerdo con estos resultados, la exposición al extracto de carbón desencadenaría un desequilibrio oxidativo en los sistemas biológicos con el subsecuente daño celular que permitiría el desarrollo de una amplia variedad de patologías (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Adicionalmente, el análisis de secuenciación de RNA (RNAseq) mostró que otros genes tales como *cyp1b1*, *cyp1c1*, *gstp1*, *sult6b1*, *tiparp*, *lonrf1* *yslc16a9b*, relacionados con el metabolismo de xenobioticos, también están sobreexpresados en los tres fenotipos. La actividad enzimática de los citocromos P450 es una de los primeros pasos en el metabolismo de xenobioticos tales como los PAHs, los cuales son activados a carcinógenos. Por esto, la actividad de las enzimas CYP450 y su expresión ha sido usada como un importante biomarcador en la evaluación de la exposición ambiental a varios contaminantes (Lee and Yang, 2008). La inducción de *cyp1a1*, *cyp1b1* y *cyp1c1*, observada en nuestro estudio, junto con incrementos en la expresión de *ahr2*, *nqo1*, *gstp1* y *gstp2*, sugiere que la vía AhR podría ser postulada como el mecanismo intracelular principal, que mediaría los efectos tóxicos generados por la exposición a los contaminantes derivados del polvillo de carbón durante el desarrollo de vertebrados.

El gen *tiparp*, sobreexpresado también en los embriones expuestos al extracto de carbón, ha sido descrito como biomarcador de la activación de AhR (Lam et

al., 2008; Li et al., 2013), y recientemente es descrito como un ligando del receptor de hidrocarburos aromáticos con efectos similares a la proteína represora AhR (AhR represor) (MacPherson et al., 2014). Adicionalmente, incrementos en la expresión de *sult6b1* y *slc16a9b*, tal como las observados en este estudio, han sido reportados también en embriones de zebrafish expuestos a PAH (Lam et al., 2008; Li et al., 2013; Goodale et al., 2013), sugiriendo que estos genes podrían ser otros biomarcadores útiles para evaluar la activación de AhR en sistemas biológicos expuestos al extracto de carbón.

Por otra parte, los ensayos de RNA-Seq revelaron que la expresión de *and1*, *and2*, *apoa4*, *crybb1*, *crybb1/1*, *crybb1/2*, *dct*, *krt23* and *mylpfb*, fue significativamente baja en los embriones de zebrafish expuestos al extracto de carbón. La disminución de *and1* y *and2* en los embriones, podría estar vinculada con alteraciones en el desarrollo de las aletas pectorales (Zhang et al., 2010). Por otra parte, la reconocida función de *mylpfb* en el desarrollo y composición del músculo cardíaco (Wang et al., 2007), junto con su baja expresión en los embriones, vinculan a este gen en los mecanismos de cardiotoxicidad generados por el extracto de carbón.

Todas las alteraciones mencionadas en conjunto con los niveles bajos de *apoa4*, *dct* y *krt23*, sugieren que la exposición al extracto de carbón afecta una multiplicidad de procesos celulares, incluyendo el transporte de lípidos, síntesis de melanina y metabolismo de queratina, procesos de oxidoreducción, metabolismo de xenobioticos y biosíntesis de diversas biomoléculas, entre otros. En todos los fenotipos de embriones generados por la exposición al extracto de carbón, el análisis de ontología genómica mostró que los componentes y procesos celulares con el mayor número de genes diferencialmente expresados son: los filamentos intermedios, procesos de oxidoreducción, respuesta a estímulos químicos, metabolismo del calcio, vías de interacción ECM-receptor y adhesión focal.

Los filamentos intermedios (IF), componentes del citoesqueleto, proveen el mecanismo de soporte para la membrana plasmática integrado por una superfamilia de proteínas incluyendo diversos tipos de queratinas y proteínas de neurofilamentos, entre otras (Eriksson et al., 2009). Nosotros encontramos que los embriones expuestos al extracto de carbón, poseen entre un 10% -19% de los genes precursores de estas proteínas alterados. La mayoría de estos cambios fueron observados en genes de diversas queratinas (*krt18*, *krt1-19d*, *krt4*, *krt5*, *krtt1c19e*, *krt17*, *krt92*, *krt97*) que integran principalmente los filamentos intermedios del epitelio (Eriksson et al., 2009). Disrupciones en los filamentos intermedios han sido vinculadas con la mayoría de enfermedades degenerativas de la piel, músculo y neuronas (Guharoy et al., 2013). Mutaciones en *krt1*, *krt5*, *krt10* and *krt14* han sido vinculadas con enfermedades epidermicas, mientras que algunas variantes de los genes *krt8*, *krt18* y *krt19* han sido relacionadas con

prediposición al desarrollo de diversos desórdenes hepáticos (Toivola et al., 2015).

En los embriones del fenotipo BY, pero no en los demás, fueron encontrados cambios en la expresión del gen *nefm*, que codifica un componente importante de los neurofilamentos. Este gen ha sido reportado como biomarcador de daño neuronal y trastornos neurodegenerativos como la esclerosis amiotrófica lateral y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, entre otras (Häggmark et al., 2014; Laser-Azogui et al., 2015). Muchos estudios han asociado la exposición ambiental de contaminantes tales como el material particulado (Calderón-Garcidueñas et al., 2015; Palacios et al., 2014), metales (Colín-Barenque et al., 2015; Fulgenzi et al., 2014) y compuestos orgánicos incluyendo PAHs y organoclorados (Costa et al., 2014; Steenland et al., 2014) con daño neurológico, neuropatías, déficit de atención, alteraciones cognitivas, alteraciones en el desarrollo neuronal y neurodegeneración. En este sentido, la baja expresión de *nefm* reportada en este estudio, junto con las alteraciones de *dlx2*, *otx2* y *fgf8* detectadas por hibridación *in situ*, revelan que la exposición a los contaminantes derivados de la minería de carbón podría dar origen a desórdenes neurológicos en humanos y animales expuestos.

El origen de daño neuronal, así como el de múltiples alteraciones patológicas, incluyendo cáncer, diabetes, inflamación, alteraciones hormonales, inmunológicas, entre otras, también ha sido ampliamente asociado con la presencia de estrés oxidativo en los sistemas biológicos (Indo et al., 2015). Nuestros resultados muestran claramente que la exposición al extracto de carbón, genera en los embriones un desequilibrio oxidativo evidenciado por la activación de las vías intracelulares de respuesta a xenobioticos (*cyp1s*) y de defensa antioxidante (*nqo1*). Adicionalmente, el análisis de RNAseq muestra otras alteraciones génicas relacionadas con los procesos de oxido-reducción. Entre ellas, la reducción significativa en la expresión de *nos1* (nitric oxide synthase 1, neuronal), que al ser un gen regulatorio clave en el desarrollo de la columna vertebral de zebrafish, podría explicar los cambios fenotípicos observados en esta estructura corporal (Bradley et al., 2010).

Similar a los efectos reportados en zebrafish expuestos a PAHs (Jayasundara et al., 2015), varios genes involucrados con la unión al calcio fueron diferencialmente expresados en los embriones tratados con extracto de carbón. Entre estos, se destacan niveles bajos de los transcritos *mylpf* (myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle b), *casq1* (calsequestrin 1), *capn3* (calpain 3), *pvalb1* (parvalbumin 1) y *pvalb2* (parvalbumin 2). Estos resultados junto con la baja expresión de *Nkx2.5* y *cmcl2* observada en los ensayos de hibridación *in situ* permiten formular la hipótesis de que la mezcla de contaminantes contenidos en el extracto de carbón ejerce regulación negativa de la transcripción de genes precursores de proteínas de unión a calcio que son

esenciales para la contracción del músculo cardiaco, y de genes claves en la cardiogénesis.

Alteraciones en la transcripción de genes participantes en la interacción Receptor-matriz extracelular (ECM) y en la adhesión focal, también fueron observadas en todos los embriones expuestos al extracto de carbón. Entre estas, la disminución en la expresión de algunos genes que codifican colágeno, tales como, *col1a1a* (collagen, type I, alpha 1a), *col1a1b* (collagen, type I, alpha 1b) y *col1a2* (collagen, type I, alpha 2), fueron las más destacadas. Considerando que el colágeno participa activamente en la organogénesis y en el mantenimiento de la estructura y función tisular (Jessen, 2014), las alteraciones transcriptómicas mencionadas podrían vincularse con la aparición de los fenotipos aberrantes generados en los embriones expuestos al extracto de carbón (Duran et al., 2011;Jessen, 2014).

En resumen, la exposición al extracto de carbón generó aberraciones fenotípicas en embriones de zebrafish, caracterizadas principalmente por alteraciones en la morfología de la cabeza, cola, cuerpo y corazón. El patrón de sobreexpresión de los genes *cyp1*, *ahr2*, *nqo1*, *gstp1* and *gstp2*, entre otros, sugiere que la mezcla de contaminantes derivados del polvo de carbón, inducen desequilibrio oxidativo y estrés celular a través de la activación del receptor AhR. Sin embargo, la diversidad de alteraciones genómicas encontradas, sugieren que probablemente también existan mecanismos de toxicidad AhR-independientes. Por otra parte, genes vinculados con los filamentos intermedios, unión a calcio, interacciones ECM-receptor y adhesión focal fueron alterados por el extracto de carbón en todos los fenotipos embrionarios estudiados.

Estos hallazgos en conjunto con la sobreexpresión de genes relacionados con estrés oxidativo en ratones silvestres provenientes de minas de carbón (Guerrero-Castilla et al., 2014) y la activación de AhR y vías de reparación de DNA en células expuestas al extracto de carbón (Guerrero-Castilla and Olivero-Verbel, 2014), evidencian que los contaminantes asociados a la minería de carbón impactan no sólo la salud de la biota y humanos expuestos, sino que causan también severas alteraciones en el desarrollo embrionario de organismos vertebrados. La Figura 23 muestra una representación con la síntesis de resultados obtenidos en este trabajo.

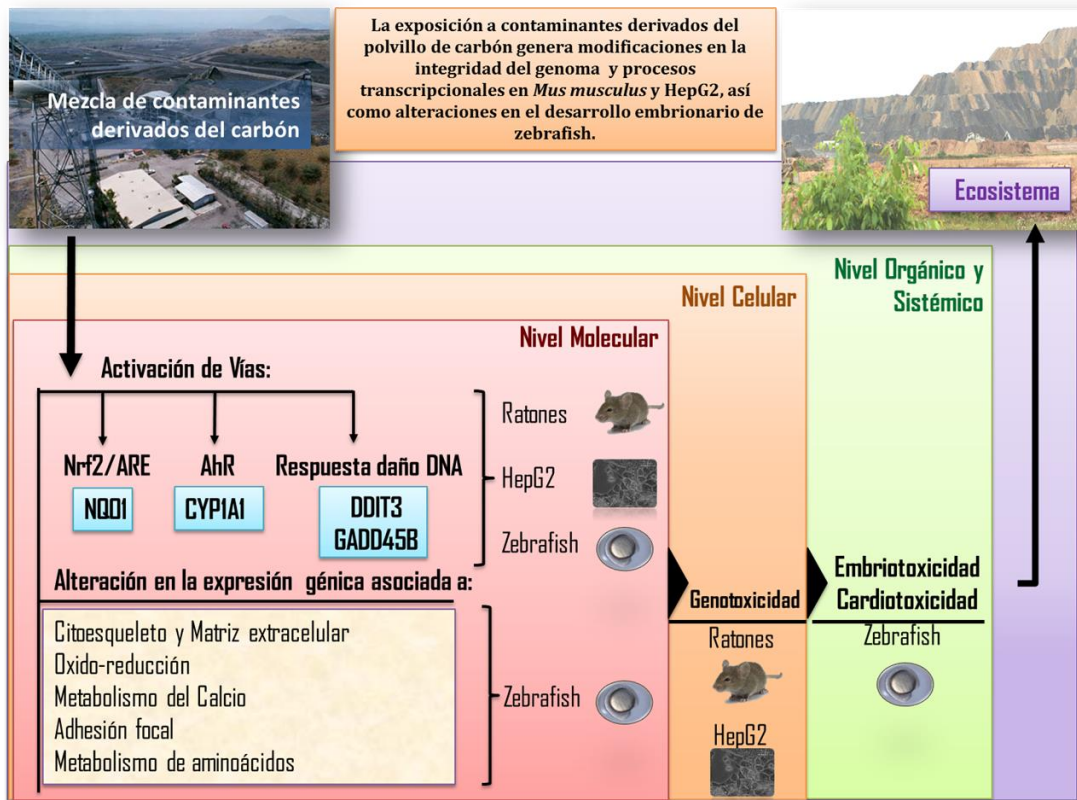


Figura 23. Resumen de las alteraciones moleculares, celulares y sistémicas asociadas con la exposición a contaminantes derivados del polvillo de carbón.

Los resultados de este trabajo permiten una comprensión global de los efectos moleculares, celulares, orgánicos y sistémicos potencialmente asociados con la explotación y uso del carbón. Se debe seguir avanzando en la búsqueda de de mas conocimiento científico sobre los riesgos adversos de la minería de carbón, para que de forma conciente y racional se encuentre un balance entre las ganancias económicas y la salud humana y medio ambiental, tanto a corto como a largo plazo.

Así mismo, es importante abordar estudios de susceptibilidad genética que permitirían explicar cómo algunos individuos ocupacionalmente expuestos a contaminantes derivados de la minería de carbón, no desarrollan las patologías. En este sentido, la evaluación de polimorfismos y los estudios epigenéticos se convierten en piezas fundamentales para continuar avanzando en la comprensión de los efectos de esta actividad en la Salud de las personas. Finalmente, es necesario continuar valorando no sólo las dimensiones biológicas de individuos, biota y ecosistemas, sino también dimensiones físicas, sociales y mentales de las comunidades, considerando que en el horizonte se persiven consecuencias adversas con las que lidiarán futuras generaciones.

5.

Conclusiones

La expresión de mRNA de NQO1, MT1, SOD1, MT2, and DDIT3 fue más alta en el hígado de ratones silvestres (*mus musculus*) capturados en zonas mineras de La Jagua y la Loma, que en el tejido hepático de animales recolectados en el sitio de referencia (Valledupar). Estos resultados podrían estar vinculados, entre otros aspectos, con las altas concentraciones hepáticas de Cd, Cu y Zn, encontradas también en los animales expuestos a actividades mineras carboníferas.

Diferentes concentraciones de extracto de carbón, no inducen cambios significativos en la viabilidad de células HepG2 después de 12 horas de exposición, sin embargo, concentraciones entre 50 y 100 ppm producen incremento significativo del índice de daño genómico, al comparar con controles negativos.

Células HepG2 expuestas al extracto de carbón mostraron alteraciones transcripcionales mediadas por AhR, cambios en el estado oxidativo celular y efectos genotóxicos. La expresión de mRNA de CYP1A1 (Hasta 163 veces), NQO1 (Hasta 4.7 veces), y GADD45B (Hasta 4.7 veces) resultó ser mayor en HepG2 expuestas que en los controles.

Concentraciones de extracto de carbon entre 50 y 250 ppm, son relacionadas con alta mortalidad y malformaciones en embriones de zebrafish. Exposiciones entre 500 y 5000 ppm registraron porcentajes de supervivencia máximos de 20% y aparición de malformaciones en el 100% de los embriones sobrevivientes. Las principales aberraciones fenotípicas en los embriones expuestos incluyen malformaciones en cabeza, cola, cuerpo y corazón.

La mezcla de contaminantes en el extrado de carbón indujo en embriones de zebrafish, alteraciones transcriptómicas asociadas con procesos de oxido-reducción, metabolismo de xenobioticos, filamentos intermedios, unión a calcio, interacciones ECM-receptor y adhesión focal. Presumiblemente los mecanismos de toxicidad implicados incluyen vías AhR-independientes y AhR-dependientes.

En conjunto, los resultados indican que los contaminantes asociados con las actividades mineras carboníferas impactan la salud de la biota expuesta y causan alteraciones en el desarrollo embrionario de organismos vertebrados.

6.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achten, C., Hofmann, T. (2009) Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - a hardly recognized source of environmental contamination. *Sci.Total Environ.*, **407**, 2461-2473.
- Agencia Nacional de minería, A. (2013) Atención de emergencias mineras en Colombia. In.
- Ahern, M.M., Hendryx, M., Conley, J., Fedorko, E., Ducatman, A., Zullig, K.J. (2011). The association between mountaintop mining and birth defects among live births in central Appalachia, 1996-2003. *Environ. Res.* **111**, 838-846.
- Albrecht, C., Borm, P. J., Adolf, B., Timblin, C. R., Mossman, B. T. (2002) In vitro and in vivo activation of extracellular signal-regulated kinases by coal dusts and quartz silica. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **184**, 37-45.
- Alpern Boris, Lemos de Sousa M.J. (2002) Documented international enquiry on solid sedimentary fossil fuels; coal: definitions, classifications, reserves-resources, and energy potential. *International Journal of Coal Geology*, **50**, 3-41.
- Amacher, S. L. (2008) Emerging gene knockout technology in zebrafish: zinc-finger nucleases. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.*, **7**, 460-464.
- Anders, S., Pyl, P. T., Huber, W. (2014) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*.
- Anderson, P. D., Battle, H. I. (1967) Effects of chloramphenicol on the development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can.J.Zool.*, **45**, 191-204.
- Andruleit, H., Georg Babies, H., Bahr, A., Kus, J., Meßner, J., Schauer, M. (2012) **Energy Study 2012. Reserves, Resources and Availability of Energy Resources**. In The Federal Institute for Geosciences and Natural Resources (BGR) German Mineral Resources Agency (DERA).
- Anwar-Mohamed, A., El-Kadi, A.O. (2008). Down-regulation of the carcinogen-metabolizing enzyme cytochrome P4501a1 by vanadium. *Drug. Metab. Dispos.* **36**, 1819-1827.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert.Rev.Mol.Diagn.*, **5**, 209-219.

Aseervatham, G. S., Sivasudha, T., Jeyadevi, R., Arul, A. D. (2013) Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans--an overview. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.*, **20**, 4356-4369.

Ashauer, R., Agatz, A., Albert, C., Ducrot, V., Galic, N., Hendriks, J., Jager, T., Kretschmann, A., O'Connor, I., Rubach, M. N., Nyman, A. M., Schmitt, W., Stadnicka, J., van den Brink, P. J., Preuss, T. G. (2011) Toxicokinetic-toxicodynamic modeling of quantal and graded sublethal endpoints: a brief discussion of concepts. *Environ.Toxicol.Chem.*, **30**, 2519-2524.

Ates, I., Yucesoy, B., Yucel, A., Suzen, S. H., Karakas, Y., Karakaya, A. (2011) Possible effect of gene polymorphisms on the release of TNFalpha and IL1 cytokines in coal workers' pneumoconiosis. *Exp.Toxicol.Pathol.*, **63**, 175-179.

Azqueta, A., Collins, A. R. (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch.Toxicol.*, **87**, 949-968.

Baird, W. M., Hooven, L. A., Mahadevan, B. (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ.Mol.Mutagen.*, **45**, 106-114.

Ball, A., Truskewycz, A. (2013) Polyaromatic hydrocarbon exposure: an ecological impact ambiguity. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.*, **20**, 4311-4326.

Barrado-Olmedo, A.I., Pérez-Pastor, R.M., García-Alonso, S., (2012). An evaluation of uncertainty associated to analytical measurements of selected polycyclic aromatic compounds in ambient air. *Talanta* **101**, 428-434.

Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., Coumoul, X. (2012). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* **27**, 3-8.

Beeby, A. (2001) What do sentinels stand for? *Environ.Pollut.*, **112**, 285-298.

Beischlag, T.V., Luis, M.J., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* **18**, 207-250.

Bekki, K., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K. (2013) Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *J.UOEH.*, **35**, 17-24.

Ben-Shlomo, R., Shanas, U. (2011) Genetic ecotoxicology of asbestos pollution in the house mouse *Mus musculus domesticus*. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.*, **18**, 1264-1269.

- Beyersmann, D., Hartwig, A. (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch.Toxicol.*, **82**, 493-512.
- Bhuiyan, M. A., Parvez, L., Islam, M. A., Dampare, S. B., Suzuki, S. (2010) Heavy metal pollution of coal mine-affected agricultural soils in the northern part of Bangladesh. *J.Hazard.Mater.*, **173**, 384-392.
- Bian, Z., Inyang, H., Daniels, J., Otto, F., Struthers, S. (2010) Environmental issues from coal mining and their solutions. *Mining Science and Technology*, **20**, 215-223.
- Bjerregaard, P., Andersen, O. (2007) Ecotoxicology of Metals-Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem. In *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier Inc, pp. 251-280.
- Bock, K.W. (2012). Ah receptor- and Nrf2-gene battery members, modulators of quinone-mediated oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 833-838.
- Borm, P. J., Palmen, N., Engelen, J. J., Buurman, W. A. (1988) Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor-alpha (TNF) from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. *Am.Rev.Respir.Dis.*, **138**, 1589-1594.
- Borm, P. J., Tran, L., Donaldson, K. (2011) The carcinogenic action of crystalline silica: a review of the evidence supporting secondary inflammation-driven genotoxicity as a principal mechanism. *Crit Rev.Toxicol.*, **41**, 756-770.
- Bradley, S., Tossell, K., Lockley, R., McDearmid, J. R. (2010) Nitric oxide synthase regulates morphogenesis of zebrafish spinal cord motoneurons. *J.Neurosci.*, **30**, 16818-16831.
- Brigelius-Flohe, R., Flohe, L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid.Redox.Signal.*, **15**, 2335-2381.
- Brown, D. R., Clark, B. W., Garner, L. V., Di Giulio, R. T. (2014) Zebrafish cardiotoxicity: the effects of CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.*
- Cabarcas-Montalvo, M., Olivero-Verbel, J., Corrales-Aldana, H. (2012). Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. *Sci. Total. Environ.* **416**, 208-214.

Calderon-Garciduenas, L., Kulesza, R. J., Doty, R. L., D'Angiulli, A., Torres-Jardon, R. (2015) Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environ.Res.*, **137C**, 157-169.

Camarinho, R., Garcia, P. V., Rodrigues, A. S. (2013) Chronic exposure to volcanogenic air pollution as cause of lung injury. *Environ.Pollut.*, **181**, 24-30.

Canestro, C., Yokoi, H., Postlethwait, J. H. (2007) Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat.Rev.Genet.*, **8**, 932-942.

Castorena-Torres, F., Bermúdez de León, M., Cisneros, B., Zapata-Pérez, O., Salinas, J.E., Albores, A. (2008). Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549. *Toxicol. In Vitro.* **22**, 411-421.

Ceryak, S., Zingariello, C., O'Brien, T., Patierno, S. R. (2004) Induction of pro-apoptotic and cell cycle-inhibiting genes in chromium (VI)-treated human lung fibroblasts: lack of effect of ERK. *Mol.Cell Biochem.*, **255**, 139-149.

Chanda, S., Dasgupta, U. B., Guhamazumder, D., Gupta, M., Chaudhuri, U., Lahiri, S., Das, S., Ghosh, N., Chatterjee, D. (2006) DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol.Sci.*, **89**, 431-437.

Chanyshv, M.D., Kosorotikov, N.I., Titov, S.E., Kolesnikov, N.N., Gulyaeva, L.F., (2014). Expression of microRNAs, CYP1A1 and CYP2B1 in the livers and ovaries of female rats treated with DDT and PAHs. *Life Sci.* **103**, 95-100.

Chen, J. Y., Chang, B. E., Chen, Y. H., Lin, C. J., Wu, J. L., Kuo, C. M. (2001) Molecular cloning, developmental expression, and hormonal regulation of zebrafish (*Danio rerio*) beta crystallin B1, a member of the superfamily of beta crystallin proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **285**, 105-110.

Chen, F., Shi, X. (2002) Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, **42**, 105-121.

Chen, H., Davidson, T., Singleton, S., Garrick, M. D., Costa, M. (2005) Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **206**, 275-287.

Chen, M., Zhang, M., Borlak, J., Tong, W. (2012) A decade of toxicogenomic research and its contribution to toxicological science. *Toxicol.Sci.*, **130**, 217-228.

Chen, Y. W., Yang, C. Y., Huang, C. F., Hung, D. Z., Leung, Y. M., Liu, S. H. (2009) Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets*, **1**, 169-176.

China Labour Bulletin, C. (2013) HazardEx: China coal mine safety improves, but fatalities still high. *Copyright © China Labour Bulletin*.

Cohen, R. A., Patel, A., Green, F. H. (2008) Lung disease caused by exposure to coal mine and silica dust. *Semin.Respir.Crit Care Med.*, **29**, 651-661.

Cohn, C. A., Fisher, S. C., Brownawell, B. J., Schoonen, M. A. (2010) Adenine oxidation by pyrite-generated hydroxyl radicals. *Geochem.Trans.*, **11**, 2.

Cohn, C. A., Laffers, R., Simon, S. R., O'Riordan, T., Schoonen, M. A. (2006a) Role of pyrite in formation of hydroxyl radicals in coal: possible implications for human health. *Part Fibre.Toxicol.*, **3**, 16.

Cohn, C. A., Mueller, S., Wimmer, E., Leifer, N., Greenbaum, S., Strongin, D. R., Schoonen, M. A. (2006b) Pyrite-induced hydroxyl radical formation and its effect on nucleic acids. *Geochem.Trans.*, **7**, 3.

Colin-Barenque, L., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O., Jimenez-Martinez, R., Bizarro-Nevaras, P., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Fortoul, T. I. (2015) Functional and morphological olfactory bulb modifications in mice after vanadium inhalation. *Toxicol.Pathol.*, **43**, 282-291.

Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol.Biotechnol.*, **26**, 249-261.

Coronado-Posada, N., Cabarcas-Montalvo, M., Olivero-Verbel, J. (2013). Phytotoxicity assessment of a methanolic coal dust extract in *Lemna minor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **95**, 27-32.

Corrales, J., Thornton, C., White, M., Willett, K. L. (2014) Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquat.Toxicol.*, **148**, 16-26.

Costa, C., Catania, S., De, P. R., Stancanelli, R., Scribano, G. M., Melchini, A. (2010) Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology*, **271**, 83-86.

Costa, L. G., Cole, T. B., Coburn, J., Chang, Y. C., Dao, K., Roque, P. (2014) Neurotoxicants are in the air: convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain. *Biomed.Res.Int.*, **2014**, 736385.

- Cretu, A., Sha, X., Tront, J., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2009). Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer. Ther.* **7**, 268-276.
- Cui, M., Jang, M., Cho, S. H., Khim, J. (2011) Potential application of sludge produced from coal mine drainage treatment for removing Zn(II) in an aqueous phase. *Environ.Geochem.Health*, **33 Suppl 1**, 103-112.
- Darwish, W.S., Ikenaka, Y., Ishizuka, M. (2013). Biological responses of xenobiotic metabolizing enzymes to lead exposure in cultured H4IIE rat cells. *Jpn. J. Vet. Res* . **61**, Suppl :S48-S53.
- Decristofaro, M. F., Daniels, K. K. (2008) Toxicogenomics in biomarker discovery. *Methods Mol.Biol.*, **460**, 185-194.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol.Toxicol.*, **25**, 5-32.
- Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food. Res.* **52**, Suppl 1:S128-S138.
- Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P. (2010). NAD(P)H,quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* **501**, 116-123.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.*, **29**, 15-21.
- Duran, I., Mari-Beffa, M., Santamaria, J. A., Becerra, J., Santos-Ruiz, L. (2011) Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Dev.Biol.*, **354**, 160-172.
- Eisen, J. S. (1996) Zebrafish make a big splash. *Cell*, **87**, 969-977.
- Elard, F., León, D. (2006) La importancia del carbón mineral en el desarrollo. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG*, **9**, 91-97.
- Epstein, P., Eckerle, K., Buonocore J.J., Hendryx, M., Stout III, B. M., Heinberg, R., Clapp, R. W., May, B., Reinhart, N. L., Ahern, M. M., Doshi, S. K., Glustrom, L. (2011) Full cost accounting for the life cycle of coal. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1219**, 73-98.
- Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M., Goldman, R. D. (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J.Clin.Invest*, **119**, 1763-1771.

- Esch, L., Hendryx, M. (2011) Chronic cardiovascular disease mortality in mountaintop mining areas of central Appalachian states. *J.Rural.Health*, **27**, 350-357.
- Escher, B. I., Ashauer, R., Dyer, S., Hermens, J. L., Lee, J. H., Leslie, H. A., Mayer, P., Meador, J. P., Warne, M. S. (2011) Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. *Integr.Environ.Assess.Manag.*, **7**, 28-49.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic.Biol.Med.*, **11**, 81-128.
- Farina, M., Avila, D. S., da Rocha, J. B., Aschner, M. (2013) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem.Int.*, **62**, 575-594.
- Farzaneh, M. R., Jamshidiha, F., Kowsarian, S. (2010) Inhalational lung disease. *Int.J.Occup.Environ.Med.*, **1**, 11-20.
- Felsenfeld, A. L., Walker, C., Westerfield, M., Kimmel, C., Streisinger, G. (1990) Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development*, **108**, 443-459.
- Filipic, M. (2012) Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat.Res.*, **733**, 69-77.
- Finkelman, R.B. (2007). Health impacts of coal, facts and fallacies. *Ambio*. **36**, 103-106.
- Fishman, M. C., Stainier, D. Y., Breitbart, R. E., Westerfield, M. (1997) Zebrafish: genetic and embryological methods in a transparent vertebrate embryo. *Methods Cell Biol.*, **52**, 67-82.
- Fonseca, N. A., Marioni, J., Brazma, A. (2014) RNA-Seq Gene Profiling - A Systematic Empirical Comparison. *PLoS.One.*, **9**, e107026.
- Fulgenzi, A., Vietti, D., Ferrero, M. E. (2014) Aluminium involvement in neurotoxicity. *Biomed.Res.Int.*, **2014**, 758323.

Gavriouchkina, D., Fischer, S., Ivacevic, T., Stolte, J., Benes, V., Dekens, M. P. (2010) Thyrotroph embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. *PLoS.One.*, **5**, e12542.

Gerhard, G. S. (2003) Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp.Gerontol.*, **38**, 1333-1341.

Gerhard, G. S. (2007) Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res.Rev.*, **6**, 64-72.

Gerhard, G. S., Cheng, K. C. (2002) A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell*, **1**, 104-111.

Ghanem, M. M., Porter, D., Battelli, L. A., Vallyathan, V., Kashon, M. L., Ma, J. Y., Barger, M. W., Nath, J., Castranova, V., Hubbs, A. F. (2004) Respirable coal dust particles modify cytochrome P4501A1 (CYP1A1) expression in rat alveolar cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, **31**, 171-183.

Ghanem, M. M., Battelli, L. A., Law, B. F., Castranova, V., Kashon, M. L., Nath, J., Hubbs, A. F. (2009) Coal dust alters beta-naphthoflavone-induced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation in alveolar type II cells. *Part Fibre.Toxicol.*, **6**, 21.

Gharavi, N., El-Kadi, A. O. (2007) Role of nitric oxide in downregulation of cytochrome P450 1a1 and NADPH: Quinone oxidoreductase 1 by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J.Pharm.Sci.*, **96**, 2795-2807.

Ghose, M. K. (2007) Generation and quantification of hazardous dusts from coal mining in the Indian context. *Environ.Monit.Assess.*, **130**, 35-45.

Ghose, M. K., Majee, S. R. (2002) Assessment of the status of work zone air environment due to opencast coal mining. *Environ.Monit.Assess.*, **77**, 51-60.

Ghose, M. K., Majee, S. R. (2007) Characteristics of hazardous airborne dust around an Indian surface coal mining area. *Environ.Monit.Assess.*, **130**, 17-25.

Godfrey, T. E., Kelly, L. A. (2005) Development of quantitative reverse transcriptase PCR assays for measuring gene expression. *Methods Mol.Biol.*, **291**, 423-445.

Goodale, B. C., Tilton, S. C., Corvi, M. M., Wilson, G. R., Janszen, D. B., Anderson, K. A., Waters, K. M., Tanguay, R. L. (2013) Structurally distinct polycyclic aromatic hydrocarbons induce differential transcriptional responses in developing zebrafish. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **272**, 656-670.

- Grunwald, D. J., Eisen, J. S. (2002) Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat.Rev.Genet.*, **3**, 717-724.
- Grunwald, D. J., Kimmel, C. B., Westerfield, M., Walker, C., Streisinger, G. (1988) A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Dev.Biol.*, **126**, 115-128.
- Grunwald, D. J., Streisinger, G. (1992) Induction of mutations in the zebrafish with ultraviolet light. *Genet.Res.*, **59**, 93-101.
- Guerrero-Castilla, A., Olivero-Verbel, J., Marrugo-Negrete, J.(2014). Heavy metals in feral mice from coal-mining areas of colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metal. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **762**, 24-29.
- Guerrero-Castilla, A., Olivero-Verbel, J. (2014) Altered gene expression in HepG2 cells exposed to a methanolic coal dust extract. *Environ.Toxicol.Pharmacol.*, **38**, 742-750.
- Halliwell, B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr.Rev.*, **70**, 257-265.
- Halstead, B.W., Chitwood, M.J., Modglin, F.R. (1955) The anatomy of the venom apparatus of the zebrafish, *Pterois volitans* (linnaeus). *Anat.Rec.*, **122**, 317-333.
- Hartley, J. M., Spanswick, V. J., Hartley, J. A. (2011) Measurement of DNA damage in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. *Methods Mol.Biol.*, **731**, 309-320.
- Hayes, J.D., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G.J., Wolf, C.R., Yamamoto, M. (2000). The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 33-41.
- He, X., Chen, M. G., Ma, Q. (2008) Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem.Res.Toxicol.*, **21**, 1375-1383.
- Hendryx, M. (2009) Mortality from heart, respiratory, and kidney disease in coal mining areas of Appalachia. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, **82**, 243-249.

Hendryx, M., Ahern, M. M. (2008) Relations between health indicators and residential proximity to coal mining in West Virginia. *Am.J.Public Health*, **98**, 669-671.

Hendryx, M., Ahern, M. M. (2009) Mortality in Appalachian coal mining regions: the value of statistical life lost. *Public Health Rep.*, **124**, 541-550.

Hendryx, M., Ahern, M. M., Nurkiewicz, T. R. (2007) Hospitalization patterns associated with Appalachian coal mining. *J.Toxicol.Environ.Health A*, **70**, 2064-2070.

Hendryx, M., Ducatman, A. M., Zullig, K. J., Ahern, M. M., Crout, R. (2012a) Adult tooth loss for residents of US coal mining and Appalachian counties. *Community Dent.Oral Epidemiol.*

Hendryx, M., Fedorko, E. (2011) The relationship between toxics release inventory discharges and mortality rates in rural and urban areas of the United States. *J.Rural.Health*, **27**, 358-366.

Hendryx, M., Fedorko, E., Anesetti-Rothermel, A. (2010a) A geographical information system-based analysis of cancer mortality and population exposure to coal mining activities in West Virginia, United States of America. *Geospat.Health*, **4**, 243-256.

Hendryx, M., Fedorko, E., Halverson, J. (2010b) Pollution sources and mortality rates across rural-urban areas in the United States. *J.Rural.Health*, **26**, 383-391.

Hendryx, M., Luo, J. (2012) Cancer hospitalizations in rural-urban areas in relation to carcinogenic discharges from Toxics Release Inventory facilities. *Int.J.Environ.Health Res.*

Hendryx, M., Wolfe, L., Luo, J., Webb, B. (2012b) Self-reported cancer rates in two rural areas of West Virginia with and without mountaintop coal mining. *J.Community Health*, **37**, 320-327.

Hendryx, M., Zullig, K. J. (2009) Higher coronary heart disease and heart attack morbidity in Appalachian coal mining regions. *Prev.Med.*, **49**, 355-359.

Henkler, F., Stolpmann, K., Luch, A. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, bulky DNA adducts and cellular responses. *EXS.* **101**, 107-131.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)*, **10**, 413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)*, **11**, 1026-1030.

Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Te, P.R., Workman, P., Giddings, I., Phillips, D.H. (2007). AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1797-1810.

Hoffmeyer, F., Henry, J., Borowitzki, G., Merget, R., Bunger, J., Bruning, T., Raulf-Heimsoth, M. (2010) Pulmonary lesions and serum levels of soluble Fas (sCD95) in former hard coal miners. *Eur.J.Med.Res.*, **15 Suppl 2**, 60-63.

Hou, H. H., Kuo, M. Y., Luo, Y. W., Chang, B. E. (2006) Recapitulation of human betaB1-crystallin promoter activity in transgenic zebrafish. *Dev.Dyn.*, **235**, 435-443.

Hovhannisyan, G. G., Haroutunyan, T. S., Arutyunyan, R. M. (2004) Evaluation of cisplatin-DNA crosslinks formation with UV-C application by the alkaline Comet-assay. *Exp.Oncol.*, **26**, 240-242.

Hu, J., Ge, H., Newman, M., Liu, K. (2012) OSA: a fast and accurate alignment tool for RNA-Seq. *Bioinformatics.*, **28**, 1933-1934.

Huang, X., Zhang, Q. (2003) Coal-induced interleukin-6 gene expression is mediated through ERKs and p38 MAPK pathways. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **191**, 40-47.

Huertas, J. I., Huertas, M. E., Izquierdo, S., Gonzalez, E. D. (2012a) Air quality impact assessment of multiple open pit coal mines in northern Colombia. *J.EnvIRON.Manage.*, **93**, 121-129.

Huertas, J. I., Huertas, M. E., Solis, D. A. (2012b) Characterization of airborne particles in an open pit mining region. *Sci.Total Environ.*, **423**, 39-46.

Hur, W., Gray, N. S. (2011) Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **15**, 162-173.

Incardona, J. P., Collier, T. K., Scholz, N. L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **196**, 191-205.

Incardona, J. P., Linbo, T. L., Scholz, N. L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **257**, 242-249.

Indo, H. P., Yen, H. C., Nakanishi, I., Matsumoto, K., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Suenaga, S., Oki, M., Sato, T., Ozawa, T., Clair, D. K., Majima, H. J. (2015) A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J.Clin.Biochem.Nutr.*, **56**, 1-7.

Iwano, S., Ichikawa, M., Takizawa, S., Hashimoto, H., Miyamoto, Y. (2010) Identification of AhR-regulated genes involved in PAH-induced immunotoxicity using a highly-sensitive DNA chip, 3D-Gene Human Immunity and Metabolic Syndrome 9k. *Toxicol.In Vitro*, **24**, 85-91.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*. **8**, 379-391.

Jarup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br.Med.Bull.*, **68**, 167-182.

Jayapal, M., Bhattacharjee, R. N., Melendez, A. J., Hande, M. P. (2010) Environmental toxicogenomics: a post-genomic approach to analysing biological responses to environmental toxins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **42**, 230-240.

Jayasundara, N., Van Tiem, G. L., Meyer, J. N., Erwin, K. N., Di Giulio, R. T. (2015a) AHR2-Mediated Transcriptomic Responses Underlying the Synergistic Cardiac Developmental Toxicity of PAHs. *Toxicol.Sci.*, **143**, 469-481.

Jennings, P. (2014) "The future of in vitro toxicology". *Toxicol.In Vitro*. 2014 Oct 17. pii: S0887-2333(14)00189-1. doi: 10.1016/j.tiv.2014.08.011. [Epub ahead of print]

Jensen, E. C. (2012) Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. *Anat.Rec.(Hoboken.)*, **295**, 1-3.

Jessen, J. R. (2014) Recent advances in the study of zebrafish extracellular matrix proteins. *Dev.Biol.* Dec 29. pii: S0012-1606(14)00652-6. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.12.022.

- Jetten, M.J., Kleinjans, J.C., Claessen, S.M., Chesne, C., van Delft, J.H. (2013). Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, **27**, 2031-2040.
- Jomova, K., Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **283**, 65-87.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., Valko, M. (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol.Cell Biochem.*, **345**, 91-104.
- Jones, T., Blackmore, P., Leach, M., Berube, K., Sexton, K., Richards, R. (2002) Characterisation of airborne particles collected within and proximal to an opencast coalmine: South Wales, U.K. *Environ.Monit.Assess.*, **75**, 293-312.
- Jose, Z. J., Dimer, L. D., Paganini, D. A., Carvalho, F., Avila, M. R., Dos Santos, C. E., Appel, B. L., Ferraz, D. J., de Andrade, V. M. (2010) Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environ.Res.*, **110**, 684-691.
- Jowett, T. (2001) Double in situ hybridization techniques in zebrafish. *Methods*, **23**, 345-358.
- Jun, J. S., Jung, J. I., Kim, H. R., Ahn, M. I., Han, D. H., Ko, J. M., Park, S. H., Lee, H. G., Arakawa, H., Koo, J. W. (2013) Complications of pneumoconiosis: Radiologic overview. *Eur.J.Radiol.*
- Jurkiewicz, A. (1986) Second moment of n.m.r. line for the Wisser model of coal. *Fuel*, **65**, 1022-1024.
- Kabe, T., Ishihara, A., Qian E.W., Sutrisna, I. P., Kabe, Y. (2004) Chemical and macromolecular structure of coal. In Toshiaki Kabe, A. I. E. W. Q. (ed), *Studies in Surface Science and Catalysis Coal and Coal-Related Compounds Structures, Reactivity and Catalytic Reactions*. Elsevier, pp. 81-126.
- Kalyanaraman, B. (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox.Biol.*, **1**, 244-257.
- Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K., Seo, Y. R. (2013) Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J.Cancer Prev.*, **18**, 277-288.

Karkhanis, V. S., Joshi, J. M. (2013) Pneumoconioses. *Indian J.Chest Dis.Allied Sci.*, **55**, 25-34.

Keating, M. (2001) Cradle to Grave: The Environmental Impacts from Coal. Boston: Clean Air Task Force. In Clean Air Task Force, pp. 1-9.

Kensler, T. W., Wakabayashi, N., Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, **47**, 89-116.

Kim, D., Perteu, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S. L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, **14**, R36.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev.Dyn.*, **203**, 253-310.

Kimura, K., Ohtsuka, Y., Kaji, H., Nakano, I., Sakai, I., Itabashi, K., Igarashi, T., Okamoto, K. (2010) Progression of pneumoconiosis in coal miners after cessation of dust exposure: a longitudinal study based on periodic chest X-ray examinations in Hokkaido, Japan. *Intern.Med.*, **49**, 1949-1956.

Klaassen, C. D., Reisman, S. A. (2010) Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **244**, 57-65.

Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., Hocevar, B. A. (2010) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol.Pathol.*, **38**, 96-109.

Knasmuller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B. J. (2004) Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, **198**, 315-328.

Knuckles, T. L., Stapleton, P. A., Minarchick, V. C., Esch, L., McCawley, M., Hendryx, M., Nurkiewicz, T. R. (2013) Air pollution particulate matter collected from an Appalachian mountaintop mining site induces microvascular dysfunction. *Microcirculation.*, **20**, 158-169.

Koedrith, P., Seo, Y. R. (2011) Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *Int.J.Mol.Sci.*, **12**, 9576-9595.

Kohle, C., Bock, K.W. (2007). Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1853-1862.

Kohle, C., Bock, K.W. (2009). Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 689-699.

Koudijs, M. J., den Broeder, M. J., Groot, E., van Eeden, F. J. (2008) Genetic analysis of the two zebrafish patched homologues identifies novel roles for the hedgehog signaling pathway. *BMC.Dev.Biol.*, **8**, 15.

Lam, S. H., Mathavan, S., Tong, Y., Li, H., Karuturi, R. K., Wu, Y., Vega, V. B., Liu, E. T., Gong, Z. (2008) Zebrafish whole-adult-organism chemogenomics for large-scale predictive and discovery chemical biology. *PLoS.Genet.*, **4**, e1000121.

Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat.Methods*, **9**, 357-359.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S. L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.

Laser-Azogui, A., Kornreich, M., Malka-Gibor, E., Beck, R. (2015) Neurofilament assembly and function during neuronal development. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **32C**, 92-101.

Laumann,S, Micic, V., Kruge, MA, Achten, C., Sachsenhofer, R.F, Schwarzbauer, J., Hofmann, T. (2011). Variations in concentrations and compositions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coals related to the coal rank and origin. *Environ. Pollut.* **159**, 2690-2697.

Lee, M. S., Magari, S., Christiani, D. C. (2011) Cardiac autonomic dysfunction from occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup.Environ.Med.*, **68**, 474-478.

Lee, H. S., Yang, M. (2008) Applications of CYP-450 expression for biomonitoring in environmental health. *Environ.Health Prev.Med.*, **13**, 84-93.

Leffa, D. D., Damiani, A. P., Da, S. J., Zocche, J. J., Dos Santos, C. E., Bouffleur, L. A., Dias, J.

F., de Andrade, V. M. (2010) Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Muller, 1774). *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, **59**, 614-621.

- Leon, G., Perez, L. E., Linares, J. C., Hartmann, A., Quintana, M. (2007) Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat.Res.*, **630**, 42-49.
- Leon-Mejia, G., Espitia-Perez, L., Hoyos-Giraldo, L. S., Da, S. J., Hartmann, A., Henriques, J. A., Quintana, M. (2011) Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci.Total Environ.*, **409**, 686-691.
- Leonard, S. S., Bower, J. J., Shi, X. (2004) Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol.Cell Biochem.*, **255**, 3-10.
- Li, H., Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.*, **25**, 1754-1760.
- Li, H., Durbin, R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.*, **26**, 589-595.
- Li, Z. H., Xu, H., Zheng, W., Lam, S. H., Gong, Z. (2013) RNA-sequencing analysis of TCDD-induced responses in zebrafish liver reveals high relatedness to in vivo mammalian models and conserved biological pathways. *PLoS.One.*, **8**, e77292.
- Liao, W., McNutt, M. A., Zhu, W. G. (2009) The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, **48**, 46-53.
- Liao, Y., Wang, J., Wu, J., Driskell, L., Wang, W., Zhang, T., Xue, G., Zheng, X. (2010) Spatial analysis of neural tube defects in a rural coal mining area. *Int.J.Environ.Health Res.*, **20**, 439-450.
- Liebermann, D.A., Tront, J.S., Sha, X., Mukherjee, K., Mohamed-Hadley, A., Hoffman, B. (2011). Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Crit. Rev. Oncog.* **16**, 129-140.
- Lim, W. Y., Seow, A. (2012) Biomass fuels and lung cancer. *Respirology.*, **17**, 20-31.
- Linney, E., Hayashi, M. (1973) Two proteins of gene A of psiX174. *Nat.New Biol.*, **245**, 6-8.
- Liu, L., Bridges, R.J., Eyer, C.L. (2001). Effect of cytochrome P450 1A induction on oxidative damage in rat brain. *Mol. Cell. Biochem.* **223**, 89-94.

Liu, A. Y., Curriero, F. C., Glass, T. A., Stewart, W. F., Schwartz, B. S. (2013a) The contextual influence of coal abandoned mine lands in communities and type 2 diabetes in Pennsylvania. *Health Place*, **22**, 115-122.

Liu, Y. Z., Xiao, T. F., Ning, Z. P., Jia, Y. L., Li, H. J., Yang, F., Jiang, T., Sun, M. (2013b) [Cadmium and selected heavy metals in soils of Jianping area in Wushan County, the Three Gorges region: distribution and source recognition]. *Huan.Jing.Ke.Xue.*, **34**, 2390-2398.

Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M. B. (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **238**, 209-214.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.

Ma, Q. (2010) Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol.Ther.*, **125**, 376-393.

MacPherson, L., Ahmed, S., Tamblyn, L., Krutmann, J., Forster, I., Weighardt, H., Matthews, J. (2014) Aryl hydrocarbon receptor repressor and TiPARP (ARTD14) use similar, but also distinct mechanisms to repress aryl hydrocarbon receptor signaling. *Int.J.Mol.Sci.*, **15**, 7939-7957.

Mahadevan, B., Snyder, R. D., Waters, M. D., Benz, R. D., Kemper, R. A., Tice, R. R., Richard, A. M. (2011) Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environ.Mol.Mutagen.*, **52**, 339-354.

Majer, B. J., Mersch-Sundermann, V., Darroudi, F., Laky, B., de, W. K., Knasmuller, S. (2004) Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutat.Res.*, **551**, 153-166.

Mamurekli, D. (2010) Environmental impacts of coal mining and coal utilization in the UK. *Acta Montanistica Slovaca Roènik*, **15**, 134-144.

Marguerat, S., Bahler, J. (2010) RNA-seq: from technology to biology. *Cell Mol.Life Sci.*, **67**, 569-579.

Mates, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., Marquez, J. (2010) Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radic.Biol.Med.*, **49**, 1328-1341.

Mates, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., Marquez, J. (2012) Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch.Toxicol.*, **86**, 1649-1665.

- Mattagajasingh, S. N., Misra, B. R., Misra, H. P. (2008) Carcinogenic chromium(VI)-induced protein oxidation and lipid peroxidation: implications in DNA-protein crosslinking. *J.Appl.Toxicol.*, **28**, 987-997.
- McCunney, R. J., Morfeld, P., Levy, L., Muranko, H. (2011) Carbon black. *Environ.Health Perspect.*, **119**, A332-A333.
- McCunney, R. J., Morfeld, P., Payne, S. (2009) What component of coal causes coal workers' pneumoconiosis? *J.Occup.Environ.Med.*, **51**, 462-471.
- McCurley, A. T., Callard, G. V. (2008) Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC.Mol.Biol.*, **9**, 102.
- McHale, C. M., Zhang, L., Hubbard, A. E., Smith, M. T. (2010) Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. *Mutat.Res.*, **705**, 172-183.
- McHale, C. M., Zhang, L., Thomas, R., Smith, M. T. (2013) Analysis of the transcriptome in molecular epidemiology studies. *Environ.Mol.Mutagen.*, **54**, 500-517.
- Meng, A., Jessen, J. R., Lin, S. (1999) Transgenesis. *Methods Cell Biol.*, **60**, 133-148.
- Mersch-Sundermann, V., Knasmuller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. **198**, 329-340.
- Meunier, R. (2012) Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic models in developmental biology: Zebrafish, 1970-2000. *Stud.Hist Philos.Biol.Biomed.Sci.*, **43**, 522-531.
- Meyer, A., Biermann, C. H., Orti, G. (1993) The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proc.Biol.Sci.*, **252**, 231-236.
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., Batist, G. (2005). Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway, direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 20340-20348.

- Miller, B. G., Maccalman, L. (2010) Cause-specific mortality in British coal workers and exposure to respirable dust and quartz. *Occup. Environ. Med.*, **67**, 270-276.
- Mine Safety and Health Administration, M. (2013) Preliminary Accident Reports, Fatalgrams and Fatal Investigation Reports. In U.S. Department of Labor.
- Ming-Ho, Y. (2005) Volatile Organic Compounds. In CRC Press (ed), *Environmental Toxicology Biological and Health Effects of Pollutants*.
- Ministerio de Minas y Energía de Colombia, S. (2013) Sistema de Información Minero Colombiano - SIMCO. *Ministerio de Minas y Energía de Colombia*.
- Ministerio de Minas y Energía, U. (2009) Boletín estadístico de Minas y Energía 2003-2008. *Ministerio de Minas y energía - Colombia*.
- Ministerio de Minas y Energía, U. (2005) La cadena del carbón. El carbón Colombiano fuente de energía para el mundo. *Ministerio de Minas y Energía - Colombia*.
- Miranda, C.L., Chung, W.G., Wang-Buhler, J.L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W.M., Buhler, D.R. (2006). Comparative in vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from beta-naphthoflavone-treated rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* **80**, 101-108.
- Mo, J., Wang, L., Au, W., Su, M. (2013) Prevalence of coal workers' pneumoconiosis in China: A systematic analysis of 2001-2011 studies. *Int.J.Hyg.Environ.Health*.
- Moldoveanu, S. C. (2010) Toxicological and Environmental Aspects of Polycyclic Aromatic. In *Pyrolysis of Organic Molecules with Applications to Health and Environmental Issues*. Elsevier, pp. 693-699.
- Moller, P., Danielsen, P. H., Jantzen, K., Roursgaard, M., Loft, S. (2013) Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles. *Crit Rev.Toxicol.*, **43**, 96-118.
- Montgomery, S. B., Sammeth, M., Gutierrez-Arcelus, M., Lach, R. P., Ingle, C., Nisbett, J., Guigo, R., Dermitzakis, E. T. (2010) Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature*, **464**, 773-777.
- Morrice, E., Colagiuri, R. (2013) Coal mining, social injustice and health: a universal conflict of power and priorities. *Health Place.*, **19**, 74-79.

Moulis, J. M. (2010) Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals*, **23**, 877-896.

Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lonne, M., Walter, J. G., Stahl, F. (2013) Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **24**, 22-30.

Nadadur, S. S., Haykal-Coates, N., Mudipalli, A., Costa, D. L. (2009) Endothelial effects of emission source particles: acute toxic response gene expression profiles. *Toxicol.In Vitro*, **23**, 67-77.

Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, **19 Suppl 1**, 38-48.

Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B. (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J.Biol.Chem.*, **284**, 13291-13295.

Nguyen, P.M., Park M.S., Chow, M., Chang, J.H., Wrischnik, L., Chan, W.K. (2010). Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1 message. *Toxicol. Sci.* **116**, 549-561.

Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Kadri, M., Guiraud, P. (2011) Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicol.In Vitro*, **25**, 191-198.

Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Kadri, M., Guiraud, P. (2012) Cadmium-induced apoptosis in the BJAB human B cell line: involvement of PKC/ERK1/2/JNK signaling pathways in HO-1 expression. *Toxicology*, **300**, 103-111.

Nickens, K. P., Patierno, S. R., Ceryak, S. (2010) Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem.Biol.Interact.*, **188**, 276-288.

Niestroy, J., Barbara, A., Herbst, K., Rode, S., Van, L.M., Roos, P.H. (2011). Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicol. In. Vitro.* **25**, 671-683.

NRC - National Research Council – The National Academics. 2014. [Página principal en internet]. Toxicity Testing in the Twenty-first Century: A Vision and a Strategy. Washington. [Consultado: Noviembre 5 de 2014]. Disponible en: <http://dels.nas.edu/Report/Toxicity-Testing-Twenty-first/11970>.

Olive, P. L. (2002) The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol.Biol.*, **203**, 179-194.

Orem, W. H., Finkelman, R. B. (2004) Coal formation and geochemistry. In Mackenzie, F. T. (ed), *Treatise on Geochemistry*. Elsevier Inc, pp. 191-222.

Osburn, W.O., Kensler, T.W. (2008). Nrf2 signaling, an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* **659**, 31-39.

Ostling, O., Johanson, K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **123**, 291-298.

Ozsolak, F., Milos, P. M. (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat.Rev.Genet.*, **12**, 87-98.

Palacios, N., Fitzgerald, K. C., Hart, J. E., Weisskopf, M. G., Schwarzschild, M. A., Ascherio, A., Laden, F. (2014) Particulate matter and risk of Parkinson disease in a large prospective study of women. *Environ.Health*, **13**, 80.

Palmer, M. A., Bernhardt, E. S., Schlesinger, W. H., Eshleman, K. N., Foufoula-Georgiou, E., Hendryx, M. S., Lemly, A. D., Likens, G. E., Loucks, O. L., Power, M. E., White, P. S., Wilcock, P. R. (2010) Science and regulation. Mountaintop mining consequences. *Science*, **327**, 148-149.

Park, J. H., Mangal, D., Frey, A. J., Harvey, R. G., Blair, I. A., Penning, T. M. (2009) Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J.Biol.Chem.*, **284**, 29725-29734.

Pertea, M. (2012) The Human Transcriptome: An Unfinished Story. *Genes (Basel)*, **3**, 344-360.

Phillips, D. H., Arlt, V. M. (2009) Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*, **99**, 87-110.

Piatek, K., Schwerdtle, T., Hartwig, A., Bal, W. (2008) Monomethylarsonous acid destroys a tetrathiolate zinc finger much more efficiently than inorganic arsenite: mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition. *Chem.Res.Toxicol.*, **21**, 600-606.

- Pies, C., Hoffmann, B., Petrowsky, J., Yang, Y., Ternes, T. A., Hofmann, T. (2008) Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. *Chemosphere*, **72**, 1594-1601.
- Pinho, R. A., Bonatto, F., Andrades, M., Frota, M. L., Jr., Ritter, C., Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Uldrich-Kulczynski, J. M., Moreira, J. C. (2004) Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ.Res.*, **96**, 290-297.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., Markham, A. F. (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC.Biotechnol.*, **3**, 18.
- Rabinowitz, P. M., Odofin, L., Dein, F. J. (2008) From "us vs. them" to "shared risk": can animals help link environmental factors to human health? *Ecohealth*, **5**, 224-229.
- Rappaport, S. M. (2011) Implications of the exposome for exposure science. *J.Expo.Sci.Environ.Epidemiol.*, **21**, 5-9.
- Rappaport, S. M., Smith, M. T. (2010) Epidemiology. Environment and disease risks. *Science*, **330**, 460-461.
- Reif, J. S. (2011) Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep.*, **126 Suppl 1**, 50-57.
- Roberts, R. A., Laskin, D. L., Smith, C. V., Robertson, F. M., Allen, E. M., Doorn, J. A., Slikker, W. (2009) Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol.Sci.*, **112**, 4-16.
- Roberts, R. A., Smith, R. A., Safe, S., Szabo, C., Tjalkens, R. B., Robertson, F. M. (2010) Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, **276**, 85-94.
- Saeedi M, Li L Y, Salmanzadeh M. 2012. Heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons: pollution and ecological risk assessment in street dust of Tehran. *J. Hazard. Mater.* **227-228** 9-17.
- Salnikow, K., Zhitkovich, A. (2008) Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem.Res.Toxicol.*, **21**, 28-44.

- Sanchez-Chardi, A., Penarroja-Matutano, C., Borrás, M., Nadal, J. (2009) Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals Part III: Structural alterations. *Environ.Res.*, **109**, 960-967.
- Santo Tomas, L. H. (2011) Emphysema and chronic obstructive pulmonary disease in coal miners. *Curr.Opin.Pulm.Med.*, **17**, 123-125.
- Saunders RJ, Paul N A, Hu Y, de N R. (2012) Sustainable sources of biomass for bioremediation of heavy metals in waste water derived from coal-fired power generation. *PLoS. One.* **7** e36470.
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., Fenech, M. (2012) The role of zinc in genomic stability. *Mutat.Res.*, **733**, 111-121.
- Schins, R. P., Borm, P. J. (1999) Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann.Occup.Hyg.*, **43**, 7-33.
- Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W.H., Roots, I. (2001). Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* **22**, 453-459.
- Shi, G. L., Lou, L. Q., Zhang, S., Xia, X. W., Cai, Q. S. (2013) Arsenic, copper, and zinc contamination in soil and wheat during coal mining, with assessment of health risks for the inhabitants of Huaibei, China. *Environ.Sci.Pollut.Res.Int.*
- Shi, S., Yoon, D. Y., Hodge-Bell, K. C., Bebenek, I. G., Whitekus, M. J., Zhang, R., Cochran, A. J., Huerta-Yepez, S., Yim, S. H., Gonzalez, F. J., Jaiswal, A. K., Hankinson, O. (2009) The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) is required for tumor initiation by benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **30**, 1957-1961.
- Shi, X., Ding, M., Chen, F., Wang, L., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., Castranova, V. (2001) Reactive oxygen species and molecular mechanism of silica-induced lung injury. *J.Environ.Pathol.Toxicol.Oncol.*, **20 Suppl 1**, 85-93.
- Silins, I., Hogberg, J. (2011) Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int.J.Environ.Res.Public Health*, **8**, 629-647.
- Silva, L. F., Fdez-Ortiz, d., V, Martinez-Arkarazo, I., Castro, K., Oliveira, M. L., Sampaio, C. H., de Brum, I. A., de Leao, F. B., Taffarel, S. R., Madariaga, J. M. (2013) Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. *Sci.Total Environ.*, **447**, 169-178.

- Simmons, S. O., Fan, C. Y., Ramabhadran, R. (2009) Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol.Sci.*, **111**, 202-225.
- Simmons, S. O., Fan, C. Y., Yeoman, K., Wakefield, J., Ramabhadran, R. (2011) NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr.Chem.Genomics*, **5**, 1-12.
- Singh, S., Singhal, N. K., Srivastava, G., Singh, M. P. (2010) Omics in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol.Mech.Methods*, **20**, 355-362.
- Smith, K. R., Frumkin, H., Balakrishnan, K., Butler, C. D., Chafe, Z. A., Fairlie, I., Kinney, P., Kjellstrom, T., Mauzerall, D. L., McKone, T. E., McMichael, A. J., Schneider, M. (2013) Energy and human health. *Annu.Rev.Public Health*, **34**, 159-188.
- Sperber, S. M., Saxena, V., Hatch, G., Ekker, M. (2008) Zebrafish *dlx2a* contributes to hindbrain neural crest survival, is necessary for differentiation of sensory ganglia and functions with *dlx1a* in maturation of the arch cartilage elements. *Dev.Biol.*, **314**, 59-70.
- Stadtman, E. R. (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic.Res.*, **40**, 1250-1258.
- Steenland, K., Mora, A. M., Barr, D. B., Juncos, J., Roman, N., Wesseling, C. (2014) Organochlorine chemicals and neurodegeneration among elderly subjects in Costa Rica. *Environ.Res.*, **134**, 205-209.
- Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., Alam, J. (2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J. Biol. Chem.* **278**, 2396-2402.
- Stout, S. A., Graan, T. P. (2010) Quantitative source apportionment of PAHs in sediments of Little Menomonee River, Wisconsin: weathered creosote versus urban background. *Environ.Sci.Technol.*, **44**, 2932-2939.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, **291**, 293-296.
- Sun, L. Y., Bokov, A. F., Richardson, A., Miller, R. A. (2011) Hepatic response to oxidative injury in long-lived Ames dwarf mice. *FASEBJ.*, **25**, 398-408.

- Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J.L., Douki, T, (2009). Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat. Res.* **671**, 67-75.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. (2012) Heavy metal toxicity and the environment. *EXS*, **101**, 133-164.
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J. A., Dimanche-Boitrel, M. T., Lagadic-Gossmann, D. (2010) Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **243**, 68-76.
- Thisse, B., Thisse, C. (2014) In situ hybridization on whole-mount zebrafish embryos and young larvae. *Methods Mol.Biol.*, **1211**, 53-67.
- Thisse, C., Thisse, B. (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat.Protoc.*, **3**, 59-69.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ.Mol.Mutagen.*, **35**, 206-221.
- Tkachev, V. O., Menshchikova, E. B., Zenkov, N. K. (2011) Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc.)*, **76**, 407-422.
- Toivola, D. M., Boor, P., Alam, C., Strnad, P. (2015) Keratins in health and disease. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **32C**, 73-81.
- Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S. L. (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.*, **25**, 1105-1111.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat.Protoc.*, **7**, 562-578.
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., Pachter, L. (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat.Biotechnol.*, **28**, 511-515.

- Tront, J.S., Huang, Y., Fornace, A.J., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2010). Gadd45a functions as a promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress. *Cancer. Res.* **70**, 9671-9681.
- Tuluçe, Y., Ozkol, H., Koyuncu, I., Ine, H. (2011) Increased occupational coal dust toxicity in blood of central heating system workers. *Toxicol.Ind.Health*, **27**, 57-64.
- Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005) The power of real-time PCR. *Adv.Physiol Educ.*, **29**, 151-159.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009) 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J.Environ.Sci.Health C.Environ.Carcinog.Ecotoxicol.Rev.*, **27**, 120-139.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.Biol.Interact.*, **160**, 1-40.
- Vallyathan, V., Landsittel, D. P., Petsonk, E. L., Kahn, J., Parker, J. E., Osiowy, K. T., Green, F. H. (2011) The influence of dust standards on the prevalence and severity of coal worker's pneumoconiosis at autopsy in the United States of America. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **135**, 1550-1556.
- Vallyathan, V., Shi, X., Castranova, V. (1998) Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ.Health Perspect.*, **106 Suppl 5**, 1151-1155.
- Valverde, M., Rojas, E. (2009) Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat.Res.*, **681**, 93-109.
- Van, B. D., Hullmann, M., Schins, R. P. (2012) Toxicology of ambient particulate matter. *EXS*, **101**, 165-217.
- Van de Peer, Y., Maere, S., Meyer, A. (2009) The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat.Rev.Genet.*, **10**, 725-732.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. (2009) 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J.Environ.Sci.Health C.Environ.Carcinog.Ecotoxicol.Rev.*, **27**, 120-139.

Vassilev, S. V., Vassileva, C. G. (2009) A new approach for the combined chemical and mineral classification of the inorganic matter in coal. 1. Chemical and mineral classification systems. *Fuel*, **88**, 235-245.

Venugopal, R., Jaiswal, A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**,14960-14965.

Verma, N., Pink, M., Rettenmeier, A. W., Schmitz-Spanke, S. (2012) Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics*, **12**, 1731-1755.

Vijaya-Padma, V., Kalai-Selvi, P., Sravani, S. (2014). Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. *Mol. Biol Rep.* Feb **25**. [Epub ahead of print]

Walker, C. H. (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Organic Pollutants An Ecotoxicological Perspective*. CRC Press, pp. 165-176.

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat.Rev.Genet.*, **10**, 57-63.

Wang, Z., Chai, L., Yang, Z., Wang, Y., Wang, H. (2010) Identifying sources and assessing potential risk of heavy metals in soils from direct exposure to children in a mine-impacted city, Changsha, China. *J.Environ.Qual.*, **39**, 1616-1623.

Wang, Y., Szczesna-Cordary, D., Craig, R., Diaz-Perez, Z., Guzman, G., Miller, T., Potter, J. D. (2007) Fast skeletal muscle regulatory light chain is required for fast and slow skeletal muscle development. *FASEB J.*, **21**, 2205-2214.

Wei, W., Zhang, C., Liu, A.L., Xie, S.H., Chen, X.M., Lu, W.Q. (2009). PCB126 enhanced the genotoxicity of BaP in HepG2 cells by modulating metabolic enzyme and DNA repair activities. *Toxicol Lett.* **189**, 91-95.

Whiteside, J. R., Box, C. L., McMillan, T. J., Allinson, S. L. (2010) Cadmium and copper inhibit both DNA repair activities of polynucleotide kinase. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 83-89.

Wilhelm, J., Pingoud, A. (2003) Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.*, **4**, 1120-1128.

- Wild, C. P. (2005) Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, **14**, 1847-1850.
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.*, **31**, 1035-1042.
- Wilkinson, P., Smith, K. R., Joffe, M., Haines, A. (2007) A global perspective on energy: health effects and injustices. *Lancet*, **370**, 965-978.
- Wilson, V. S., Keshava, N., Hester, S., Segal, D., Chiu, W., Thompson, C. M., Euling, S. Y. (2013) Utilizing toxicogenomic data to understand chemical mechanism of action in risk assessment. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **271**, 299-308.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A., Bal, W. (2006) Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol.Lett.*, **162**, 29-42.
- World Coal Association - WCA (2013) Coal Mining. In.
- Wu, T.D., Nacu, S. (2010) Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics.*, **26**, 873-881.
- Wu KC., Liu J.J., Klaassen C.D. (2012) Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **15**, 14-20.
- Wu, S.J., Spink, D.C., Spink, B.C., Kaminsky, L.S., (2003). Quantification of CYP1A1 and 1B1 mRNA in polycyclic aromatic hydrocarbon-treated human T-47D and HepG2 cells by a modified bDNA assay using fluorescence detection. *Anal. Biochem.* **312**, 162-166.
- Wu, Y., Zhang, D., He, X., Lu, Z. (2009) Effects of manganese exposure on liver in rats. *Wei Sheng Yan.Jiu.*, **38**, 107-109.
- Xue, W., Warshawsky, D. (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, **206**, 73-93.
- Yang, Y., Ligouis, B., Pies, C., Grathwohl, P., Hofmann, T. (2008) Occurrence of coal and coal-derived particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a river floodplain soil. *Environ.Pollut.*, **151**, 121-129.

- Yapici, G., Can, G., Kiziler, A. R., Aydemir, B., Timur, I. H., Kaypmaz, A. (2006) Lead and cadmium exposure in children living around a coal-mining area in Yatagan, Turkey. *Toxicol.Ind.Health*, **22**, 357-362.
- Yuan, B. J., Liu, Z. Z., Ding, X. R., Zou, J. M. (2006) [Levels and clinic significance of serum soluble Fas and soluble Fas ligand in coal workers' pneumoconiosis]. *Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi*, **24**, 96-98.
- Zay, K., Loo, S., Xie, C., Devine, D. V., Wright, J., Churg, A. (1999) Role of neutrophils and alpha1-antitrypsin in coal- and silica-induced connective tissue breakdown. *Am.J.Physiol*, **276**, L269-L279.
- Zeiger, E. (2010) Historical perspective on the development of the genetic toxicity test battery in the United States. *Environ.Mol.Mutagen.*, **51**, 781-791.
- Zhang, Y., Feng, Q., Meng, Q., Lu, P., Meng, L. (2012) Distribution and bioavailability of metals in subsidence land in a coal mine China. *Bull.Environ.Contam Toxicol.*, **89**, 1225-1230.
- Zhang, R., Sun, J., Ma, L., Wu, X., Pan, G., Hao, H., Zhou, F., A.J., Lui, C., Ai, H., Shang, L., Gao, H., Peng, Y., Wan, P., Wu, H., Wang, G.(2011). Induction of cytochromes P450 1A by tanshinones in human HepG2 hepatoma cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **252**, 18-27.
- Zhang, C., Ojiaku, P., Cole, G. J. (2013a) Forebrain and hindbrain development in zebrafish is sensitive to ethanol exposure involving agrin, Fgf, and sonic hedgehog function. *Birth Defects Res.A Clin.Mol.Teratol.*, **97**, 8-27.
- Zhang, J., Wagh, P., Guay, D., Sanchez-Pulido, L., Padhi, B. K., Korzh, V., Andrade-Navarro, M. A., Akimenko, M. A. (2010) Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature*, **466**, 234-237.
- Zhang, Y., Huang, L., Wang, C., Gao, D., Zuo, Z. (2013b) Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9. *Chemosphere*. 114-115.
- Zhang, Y., Wang, C., Huang, L., Chen, R., Chen, Y., Zuo, Z. (2012) Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat.Toxicol.*, 119-124.
- Zocche, J.J., Damiani, A.P., Hainzenreder, G., Mendonça, R.Á., Peres, P.B., Santos, C.E., Debastiani, R., Dias, J.F., Andrade, V.M. (2013). Assessment of heavy metal

content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 194-201.

Zou, J. M., Yuan, B. J., Wang, D. M., Li, C., Wu, J. Y. (2010) [Changes of serum matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-9 in coal workers' pneumoconiosis]. *Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.*, **28**, 21-24.

Zullig, K.J., Hendryx, M. (2010). A comparative analysis of health-related quality of life for residents of U.S. counties with and without coal mining. *Public. Health. Rep.* **125**, 548-555.

Zullig, K. J., Hendryx, M. (2011) Health-related quality of life among central Appalachian residents in mountaintop mining counties. *Am.J.Public Health*, **101**, 848-853.