



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM₁₀) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: González Arévalo, Gabriela Jimena

DIRECTOR: Ramírez Orellana, María Isabel, Mg

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Magíster.

María Isabel Ramírez Orellana

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM_{10}) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549” realizado por González Arévalo Gabriela Jimena ha sido orientado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2014

f) _____

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, González Arévalo Gabriela Jimena declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM_{10}) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549, de la Titulación de Bioquímico y Farmacéutico, siendo Mg. María Isabel Ramírez Orellana directora del presenta trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Formar parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) _____

González Arévalo Gabriela Jimena

C.I.: 1104245525

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado en primer lugar a Dios, que gracias a sus bendiciones diarias llegue a culminar con mis metas planteadas.

A mi madre Bertha por todo el amor, el apoyo, la confianza y ser la luz que guía cada paso de mi vida.

A mis hermanos Alicia y Fredy por su cariño, han sido siempre un gran apoyo en mi vida.

A mis sobrinos Leyre y Xavier por ser mi motivación para seguir adelante.

Gabriela González Arévalo

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja y la Titulación de Bioquímica y Farmacia por acogerme y facilitar todas sus instalaciones para el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por todas sus enseñanzas y ayudarme a crecer tanto profesionalmente como personalmente.

A la Mg. María Isabel Ramírez, Directora de esta investigación por brindarme su orientación y permanente apoyo en la realización del presente trabajo.

A mi querida madre, quien con sus consejos me ha impulsado a seguir adelante y a cumplir con todas mis metas.

A quienes pertenecieron al Laboratorio de Genética Toxicológica principalmente al BqF. Luis Guamán por su buena predisposición para resolver cualquier inquietud.

A mis queridas amigas y compañeros del área, por ayudarme a crecer en sabiduría y estar siempre conmigo: Ruth, Gaby, Sofía, Cristina, Karina. Muchas gracias a cada uno de ustedes los quiero mucho.

Gabriela González Arévalo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| CARATULA | I |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR | II |
| DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS | III |
| DEDICATORIA | IV |
| AGRADECIMIENTO | V |
| ABREVIATURAS | IX |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 1.1. Contaminación Atmosférica | 6 |
| 1.1.1. Contaminación atmosférica de las Ciudad de Cuenca | 6 |
| 1.2. Material Particulado | 7 |
| 1.2.1. Clasificación del material particulado según su composición química | 7 |
| 1.2.2. Efectos del material particulado sobre el pulmón | 8 |
| 1.3. Estrés Oxidativo | 9 |
| 1.3.1. Radicales Libres | 10 |
| 1.3.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) | 11 |
| 1.3.3. Antioxidantes | 11 |
| 1.4. Inflamación | 12 |
| 1.5. Biomarcadores para la determinación de Especies Reactivas de Oxígeno | 13 |
| 1.5.1. Viabilidad Celular | 13 |
| 1.5.2. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Fluorometría | 13 |
| 2. FIN DEL PROYECTO | 14 |
| 2.1. Objetivo general del proyecto | 15 |
| 2.2. Objetivos específicos del proyecto | 15 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 3.1. Material de Estudio | 17 |
| 3.1.1. Material Particulado PM ₁₀ | 17 |
| 3.2. Material Biológico y condiciones del cultivo | 17 |
| 3.3. Ensayo de Viabilidad MTS | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.4. Dosis subtóxicas del Peróxido de Hidrogeno | 18 |
| 3.5. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Fluorometría | 19 |
| 3.5.1. Controles | 19 |
| 3.5.1.1. Control Positivo | 19 |
| 3.5.1.2. Control Negativo | 19 |
| 3.6. Técnica | 19 |
| 3.7. Análisis Estadístico | 20 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 21 |
| 4.1. Viabilidad celular | 22 |
| 4.2. Determinación de las dosis subtóxicas del H ₂ O ₂ | 23 |
| 4.3. Determinación de Especies reactivas de oxígeno por Fluorometría | 24 |
| CONCLUSIONES | 30 |
| RECOMENDACIONES | 31 |
| BIBLIOGRAFÍA | 32 |
| ANEXOS | 35 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrés oxidativo | 10 |
| Figura 2. A-549 (Cáncer de pulmón) | 18 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de células tratadas con diferentes concentraciones del PM ₁₀ | 22 |
| Tabla 2. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM ₁₀ recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera fase) | 38 |
| Tabla 3. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM ₁₀ recolectadas en los puntos de monitoreo (Segunda fase) | 38 |

LISTA DE GRAFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad celular H ₂ O ₂ | 23 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Gráfica 2. Especies Reactivas de Oxígeno (Vega Muñoz y Hno. Miguel) | 26 |
| Gráfica 3. Especies Reactivas de Oxígeno (Av. Loja y Remigio Tamariz) | 26 |
| Gráfica 4. Especies Reactivas de Oxígeno (Av. Ricardo Durán) | 27 |
| Gráfica 5. Porcentaje de células vivas (Vega Muñoz y Hno. Miguel Etapa 1) | 35 |
| Gráfica 6. Porcentaje de células vivas (Vega Muñoz y Hno. Miguel Etapa 2)..... | 35 |
| Gráfica 7. Porcentaje de células vivas (Av. Loja y Remigio Tamariz Etapa 1)..... | 36 |
| Gráfica 8. Porcentaje de células vivas (Av. Loja y Remigio Tamariz Etapa 2)..... | 36 |
| Gráfica 9. Porcentaje de células vivas (Av. Ricardo Durán Etapa 1)..... | 37 |
| Gráfica 10. Porcentaje de células vivas (Av. Ricardo Durán Etapa 2)..... | 37 |

ABREVIATURAS

A-549: Línea celular de Pulmón

Br-Et: Bromuro de Etidio

CESEMIN: Centro de Servicios y Análisis de Minerales Metálicos y No Metálicos

DCF-DA: Diacetato de Diclorofluoresceína

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERO: Especies Reactivas de Nitrógeno

HBSS: Solución Salina de Hank's

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

PM₁₀: Partículas gruesas con un diámetro aerodinámicos $\leq 10 \mu\text{m}$

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero Fetal Bovino

RESUMEN

La exposición crónica a partículas ambientales urbanas se ha presentado como un factor de riesgo ambiental para la salud ocasionando inflamación y daño pulmonar incrementando la morbilidad y mortalidad por afecciones cardiopulmonares y cáncer de pulmón. La toxicidad y el efecto inflamatorio de las partículas atmosféricas están relacionados con el tamaño y con sus características químicas. El objetivo principal de la investigación es evaluar el efecto inflamatorio que el material particulado presente en el aire-ambiente de la Ciudad de Cuenca causa sobre la línea celular de pulmón A549, esto se realizó mediante la técnica de Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, para lo cual se utilizaron muestras de material particulado (PM₁₀) recolectado en distintas subregiones urbanas de la ciudad de Cuenca (Vega Muñoz y Hermano Miguel; Av. Loja y Remigio Tamariz; Av. Ricardo Durán). Los resultados obtenidos señalan que las soluciones acuosas de las PM₁₀ principalmente por su composición, podrían estar relacionadas con la inducción de inflamación a nivel pulmonar, constituyendo un riesgo a largo plazo para la población de la ciudad de Cuenca.

PALABRAS CLAVE: Material particulado, efecto inflamatorio, Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, riesgo ambiental.

ABSTRACT

Chronic exposure to urban environmental particles has been shown as an environmental risk factor for health causing inflammation and lung damage, the morbidity and mortality by cardiopulmonary affections and lung cancer. The toxicity and the inflammatory effect of the atmospheric particles are related with its size and its chemistry properties. The main objective of the investigation was to evaluate the particle material and its inflammatory effect over the environment-air of Cuenca city is causing on the lung cellular line A549, This assay was performed using the 2',7'-diclorofluorecein diacetate technique, which it was used PM₁₀ samples collected in different urban sub-regions of Cuenca city (Vega Muñoz and Hermano Miguel; Loja avenue and Remigio Tamariz; Ricardo Duran avenue). The obtained results show that the liquid solutions of PM₁₀ mainly for its composition could be related with the inflammatory induction to pulmonary level, creating a long term risk for the population of Cuenca city.

KEYWORDS: Particulate material, inflammatory effect, 2', 7'-diclorofluorecein diacetate, environmental risk.

INTRODUCCIÓN

Un requisito básico para el bienestar humano es respirar un aire limpio, la contaminación atmosférica representa una amenaza significativa para la salud por la presencia en el aire de materias o formas de energía que implican riesgo, daño o molestia grave para las personas. Los contaminantes del aire generalmente se clasifican en partículas en suspensión-material particulado (PM), contaminantes gaseosos y olores que provienen de una variedad de fuentes de origen natural o antropogénico, como las actividades industriales, e incremento del parque automotriz, entre otras (Granda & Tapia, 2011).

El material particulado es un tipo de contaminación del aire que se genera por una variedad de actividades humanas, pueden viajar largas distancias en la atmósfera y causar una amplia gama de enfermedades. El principal mecanismo por el cual producen efectos adversos para salud es el estrés oxidativo, considerado como aquella situación de desequilibrio redox que se produce cuando los radicales libres generados superan la capacidad antioxidante del organismo (González *et al.*, 2010).

Es así que los estándares de calidad del aire para las partículas atmosféricas han evolucionado hacia regulaciones cada vez más estrictas, con el objeto de reducir los riesgos a la salud por la inhalación de las mismas. Actualmente y por convención internacional se encuentran reguladas y consideradas como contaminantes críticos, las partículas suspendidas PM_{10} ($\leq 10 \mu M$) y $PM_{2.5}$ ($\leq 2.5 \mu M$), por su presunta contribución en la mortalidad y morbilidad por afecciones a largo plazo como el decremento en la función pulmonar y cáncer (Sahagún, 2009).

Se postula que los efectos adversos de las partículas atmosféricas derivan de la inducción de estrés oxidativo en la células, que inicia con la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), capaces de inducir cambios en ciclo redox celular y por tanto desencadenar una serie de eventos en cascada como la inflamación, apoptosis y daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Li *et al.*, 2008).

Debido al gran impacto que el Material Particulado tiene sobre la salud, el objetivo de este trabajo es determinar la actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM_{10})

de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549 a través de la cuantificación de especies reactivas de oxígeno por fluorometría.

MARCO TEÓRICO

1.1. Contaminación Atmosférica

Diversos estudios científicos reportan que la contaminación atmosférica constituye uno de los principales problemas ambientales en los centros urbanos, tanto a nivel de América Latina como del mundo entero (Granda & Tapia, 2011), debido a la cantidad de personas expuestas a compuestos contaminantes y potencialmente tóxicos para la salud, así como la persistencia de estos en el aire (Razo, 2010).

La contaminación ambiental se define como la presencia en el aire de una o más sustancias que al incorporarse y actuar en la atmósfera alteran o modifican su composición natural y que en concentraciones suficientes interfieren con la salud humana y el medio ambiente (Razo, 2010).

Los contaminantes presentes en la atmósfera proceden de dos tipos de emisoras bien diferenciadas: las naturales y las antropogénicas. En el primer caso la presencia de contaminantes se debe a causas naturales que provienen fundamentalmente de los volcanes, incendios forestales, descomposición de la materia orgánica y erosión del suelo, mientras que en el segundo tiene su origen en las actividades humanas, que podemos clasificar en fuentes fijas y móviles (Razo, 2010).

Frente a ello, cada país establece como prioridad la adopción de acciones para el control de la calidad del aire. Estas acciones parten, inicialmente de la generación de un diagnóstico ambiental de la situación de la calidad de aire en un territorio determinado, pudiendo el mismo caracterizar las principales fuentes de emisión y los posibles efectos que estarían provocando a la salud de la población y al medio ambiente (Granda & Tapia, 2011).

1.1.1. Contaminación atmosférica de la Ciudad de Cuenca

La contaminación atmosférica es motivo de interés creciente por afectar directamente a la salud pública. De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud, se estima que por su causa, anualmente en el Ecuador fallecen 500 personas (OPS, 2010). La situación actual en Cuenca no es ajena a la problemática atmosférica, donde la calidad del aire estaría siendo vulnerada por algunas fuentes emisoras de contaminantes (Granda & Tapia, 2011).

La ciudad de Cuenca, localizada al Sur del Ecuador, vive un alarmante crecimiento vehicular que incide directamente en los niveles de contaminación. En el año 2005, la Unidad Municipal de Tránsito y Transporte (UMT) registró la adquisición de 10 mil vehículos nuevos, lo que significa un crecimiento del 7% del parque automotor, situación que se agrava porque los procesos de combustión son menos eficientes a mayor altura, y debido a que la ciudad recibe intensa radiación solar, lo que podría facilitar la fotoquímica de las reacciones en la atmósfera.

Investigaciones realizadas por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca referentes a la presencia de metales pesados, en muestras del material particulado PM_{10} recolectado de la red de monitoreo de la ciudad de Cuenca son el punto de partida para continuar con la ejecución de estudios relacionados con las partículas atmosféricas, que permitan aportar con datos ambientales indispensables para conocer el impacto que las partículas del PM_{10} pudieran estar ocasionando sobre la salud humana. En este sentido es necesario determinar mediante métodos directos o indirectos el daño inflamatorio alveolar que las partículas de aire PM_{10} están causando, que puede llevar a la muerte a personas susceptibles y cáncer pulmonar (Jachero *et al.*, 2010).

1.2. Material Particulado

El material particulado (PM) es un contaminante del aire generalizado, que consiste en una mezcla de partículas sólidas y líquidas de sustancias orgánicas e inorgánicas suspendidas en el aire (WHO, 2013). Generalmente la simbología para referirse al material particulado es PM, si este símbolo va acompañado de un número, indicará el diámetro de la partícula.

El PM se ha relacionado con diversos resultados adversos para la salud, así como tener efectos ambientales generales (Vallius, 2005).

1.2.1. Clasificación del material particulado según su composición química

Los posibles perjuicios ocasionados por la contaminación por partículas van a depender de dos tipos de factores: su tamaño y su composición química.

Las partículas de aire son generalmente definidas por su tamaño, por ejemplo, como PM_{10} y $PM_{2.5}$, es decir que son masas de partículas con un diámetro aerodinámico menor de 10 y 2.5 μm , respectivamente (Tamagawa *et al.*, 2008).

La combustión de materiales orgánicos y los procesos industriales generan las partículas de 10 μm (PM_{10}), denominadas fracción gruesa, las cuales resultan de la condensación de gases, humos y vapores. Su composición química se caracteriza por la presencia de elementos de la corteza terrestre (sílice, aluminio, hierro). Durante la inhalación puede depositarse en las regiones más altas del aparato respiratorio. Por su tamaño, que es relativamente grande, tienen una velocidad de sedimentación alta y son removidas del aire en horas (Torres, 2011).

El siguiente grupo de partículas está formado por aquellas partículas menores a 2.5 μm , también llamado fracción fina ($\text{PM}_{2.5}$). La capacidad de llegar a la vía aérea inferior determina su mayor grado de toxicidad. Son generados por nucleación (aglomeración) homogénea y heterogénea, y por la degradación de las PM_{10} . Su vida media en la atmósfera es de días y pueden viajar grandes distancias (Torres, 2011).

El tamaño de las partículas de aire se considera importante con respecto a sus efectos sobre la salud debido a su muy alta deposición alveolar, gran área de superficie, composición química, capacidad de inducir inflamación, y el potencial para trasladarse a la circulación (Tamagawa *et al.*, 2008).

Las PM afectan a más personas que cualquier otro contaminante y entre los componentes más frecuentes que se han identificado se encuentran: metales como el Zn, Pb, V, Fe, Cu, Mn, Ni, Cr, Si; algunos iones como los sulfatos, los nitratos, el amoníaco y el cloruro sódico (OMS, 2011).

1.2.2. Efectos del material particulado sobre el pulmón

Se ha reconocido que un alto porcentaje de los padecimientos a nivel mundial podría atribuirse a factores ambientales asociados a la degradación de los ecosistemas, como son la exposición a los productos químicos y accidentes tecnológicos. Cuando las poblaciones se exponen crónicamente a los contaminantes ambientales, con frecuencia se observa un aumento en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas (Konigsberg, 2008). La exposición a las partículas de aire del ambiente (PM) se asocia con enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer. Se cree que los mecanismos por los que PM induce efectos sobre la salud involucran a la inflamación y el estrés oxidativo (Tamagawa *et al.*, 2008).

El pulmón, debido a su función y gran área de superficie, es claramente un órgano diana principal de la lesión oxidativa. Por tanto, es lógico que el pulmón tenga un sistema de defensa extracelular antioxidante para protegerse contra la oxidación excesiva de sus delicadas células epiteliales pulmonares (Kelly, 2003).

Al llegar a la superficie del pulmón, productos de oxidación secundarios derivados de los contaminantes oxidantes, inician una serie de respuestas celulares. Estos incluyen la generación de citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión, y la modificación de las uniones estrechas. Estas respuestas conducen a la afluencia de células inflamatorias en el pulmón en ausencia de un desafío patogénico; como consecuencia de ello la permeabilidad pulmonar aumenta y se desarrolla edema (Kelly, 2003). Sin embargo, las partículas tienen una mayor posibilidad de establecer contacto con la superficie alveolar y atravesar la barrera alveolo capilar por translocación, y en consecuencia pueden causar efectos a nivel sistémico. Dado su contenido rico en compuestos químicos oxirreductores y su habilidad para dañar a la mitocondria, estas partículas producen una gran respuesta inflamatoria en tejidos pulmonares y extrapulmonares, como el endotelio vascular, incluyendo el de los vasos coronarios (Torres, 2011).

Las concentraciones de partículas que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) considera como límite de la norma son de $65 \mu\text{g} / \text{m}^3$ (promedio 24 horas) y $15 \mu\text{g} / \text{m}^3$ (promedio anual) para las $\text{PM}_{2.5}$ y para las PM_{10} el promedio anual es de $50 \mu\text{g} / \text{m}^3$ y de $150 \mu\text{g} / \text{m}^3$ en 24 horas. Estos valores coinciden con las normas mexicanas (Torres, 2011).

Actualmente se realizan estudios que analizan desde la liberación del contaminante al medio ambiente, hasta el desarrollo de las enfermedades en la población. La naturaleza de estos efectos adversos pueden ser diversos y afectar a los organismos a distintos niveles, tanto bioquímicos, como celulares y hasta los mecanismos de acción moleculares (Konigsberg, 2008).

1.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS o ERO) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas del

oxígeno (ROS), que incluyen los radicales libres y los peróxidos. La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente (Fina, 2006). Sin embargo cuando existe un desbalance entre eventos prooxidativos (incremento de radicales libres, especies reactivas de oxígeno, ROS, y de nitrógeno, ERN) y antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) (Konigsberg, 2008), el daño oxidativo a nivel celular conlleva a disfunciones metabólicas y sistémicas que preceden distintos tipos de padecimientos o efectos adversos a la salud (Figura 1). Los sistemas más afectados por los agentes químicos o contaminantes ambientales incluyen los sistemas inmunitario, neurológico y endócrino. Cuando esta condición persiste durante periodos prolongados, se favorece el desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas y la inflamación pulmonar respectivamente (Konigsberg, 2008).

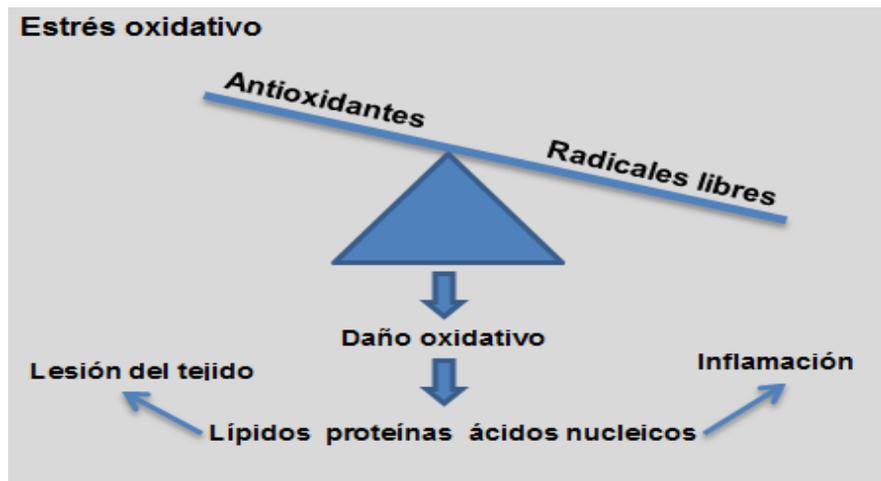


Figura 1. Estrés oxidativo cuando hay un exceso de radicales libres mayores que las defensas antioxidantes.

Fuente: Kelly, F. (2003)

1.3.1. Radicales Libres

El oxígeno es un átomo muy reactivo que es capaz de convertirse en parte de moléculas potencialmente dañinas comúnmente llamados "radicales libres." Los radicales libres son capaces de atacar a las células sanas del cuerpo, haciendo que pierdan su estructura y función (Percival, 1998).

Los electrones de un átomo ocupan regiones del espacio denominadas orbitales atómicos. Cada orbital puede tener un máximo de dos electrones que están apareados, y que poseen

spines antiparalelos. Los radicales libres son especies químicas de existencia independiente que poseen un electrón no apareado, es decir un solo electrón en un orbital. La presencia de este electrón desapareado hace que los radicales libres sean altamente reactivos e inespecíficos (Coirini, 2010).

Los radicales libres, así como las ROS y ERN, se forman constantemente en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas. Las fuentes endógenas incluyen a los subproductos de las reacciones metabólicas esenciales, como la generación de energía por la mitocondria o del metabolismo de compuestos tóxicos a través del sistema enzimático del citocromo P₄₅₀. La fuentes exógenas que generan radicales libres y ROS son el humo del cigarro, los contaminantes ambientales como las emisiones de los automóviles e industrias, el asbesto y las exposición a radiaciones iónicas, entre otras (Konigsberg, 2008).

1.3.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las células constantemente generan especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el metabolismo aeróbico. La generación de ROS juega un papel protector y funcional significativo en el sistema inmunológico. ROS y el daño oxidativo se cree que desempeñan un papel importante en muchas enfermedades humanas incluyendo cáncer, la aterosclerosis y otras enfermedades neurodegenerativas. ROS incluye radicales libres como el anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (O^2), radicales hidroxilo (OH), varios peróxidos ($ROOR'$), hidroperóxidos (ROOH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

A pesar de múltiples sistemas de modulación redox, una proporción dada de ROS escapa continuamente de la cadena respiratoria mitocondrial induciendo daño celular, incluyendo numerosas mutaciones en el ADN. La célula cuenta con un sistema de defensa antioxidante de gran alcance para combatir la excesiva producción de ROS ya sea directamente por intercepción o indirectamente a través de la reversión de daño oxidativo pero cuando ROS supera los sistemas de defensa antioxidantes naturales de la célula y la homeostasis redox se altera, el resultado es el estrés oxidativo, daño celular a distintos niveles, como en la molécula de DNA, provocando una oxidación de ácidos nucleicos; también en lípidos de membrana, causando pérdida en su estructura u oxidando a las proteínas (Konigsberg, 2008).

1.3.3. Agentes Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de brindar electrones, que pasan a completar el orbital incompleto del radical libre, neutralizándolo. Los organismos vivos disponen de mecanismos de defensa para evitar el daño oxidativo de las ROS (Especies reactivas de oxígeno) y RNOS (Especies reactivas de nitrógeno). Los cuales pueden ser de origen antioxidantes de origen natural que ayudan a prevenir los efectos dañinos de los radicales libres y de los peróxidos que se forman durante los procesos de oxidación que son necesarios para la vida. La incorporación de agentes antioxidantes a través de fuentes externas como son los alimentos o suplementos, se estimó podría ejercer un efecto beneficioso para la salud (Setti, 2008).

1.4. Inflamación

La inflamación es una respuesta defensiva que comienza después de una lesión celular, que puede ser causada por microbios, agentes físicos (quemaduras, radiación, trauma), productos químicos (toxinas, sustancias cáusticas), reacciones de tejido necrótico y/o inmunológica (Haar *et al.*, 2006).

Estudios epidemiológicos y de laboratorio han demostrado que los efectos sobre la salud pulmonar como resultado de la exposición al PM incluyen inflamación de las vías respiratorias. En particular, la inducción de daño local de las vías respiratorias, la inflamación, y el estrés oxidativo concomitante proporcionaría las señales de peligro necesarios para activar totalmente y sensibilizar el sistema inmunológico. Se han observado alteraciones de células inflamatorias circulantes, neutrófilos y linfocitos. Debido a su participación en la respuesta inflamatoria (Haar *et al.*, 2006).

Los neutrófilos circulantes responden al estímulo de un factor quimiotáctico con mayor respuesta y tienen mayor capacidad proteolítica. Esto sugiere que, aunque se produzcan cantidades normales de factores quimiotácticos en el pulmón, la respuesta de los neutrófilos puede ser excesiva y, con el tiempo, provocar una mayor acumulación de estas células en el órgano y mayor destrucción tisular. Otros estudios han demostrado mayor expresión de la molécula de adhesión Mac-1 en los neutrófilos circulantes y mayor producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS) a través del estallido respiratorio. Uno de los primeros procedimientos que tiene lugar en la respuesta inflamatoria es un cambio cualitativo en las interacciones entre neutrófilos circulantes y endotelio vascular. En condiciones normales, los neutrófilos interactúan poco con el endotelio pues determinados factores hemodinámicos e interacciones electrostáticas tienden a mantenerlos lejos de la pared vascular (Torres, 2011). Oponiéndose a estas fuerzas

dispersantes, la expresión de moléculas de adhesión específicas en la superficie de neutrófilos y endotelio favorece la adhesión leucocitaria (Torres, 2011), que permitirá que estos neutrófilos atraviesen el endotelio vascular y lleguen al foco inflamatorio.

1.5. Biomarcadores para la determinación de especies reactivas de oxígeno

1.5.1. Viabilidad Celular

La viabilidad celular se define a menudo como el número de células vivas en una muestra. Así mismo los ensayos usados para determinar viabilidad se utilizan repetidamente durante un período de tiempo para investigar la proliferación de células dentro de una población. La mayoría de las pruebas de viabilidad se basan en la ruptura de la integridad de la membrana, medida por la absorción de un colorante para el cual la célula normalmente es impermeable (por ejemplo, azul de tripano) o por la emisión de un colorante que es tomado y retenido, o a su vez metabolizado por las células viables (por ejemplo, diacetato de fluoresceína y MTS respectivamente) (Freshney, 2010).

1.5.2. Determinación de ROS por fluorimetría

Hay muchos métodos para la medición de la producción de radicales libres en las células. Las técnicas más simples utilizan sondas celulares permeables fluorescentes y quimioluminiscentes mediadas en un lector de placas o fluorómetro. Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para medir directamente el estado redox de una célula. Tiene varias ventajas sobre otras técnicas desarrolladas. Es muy fácil de usar, extremadamente sensible a los cambios en el estado redox de una célula y se puede utilizar para seguir los cambios en ROS en el tiempo (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

FIN DEL PROYECTO

2.1. Objetivo general del Proyecto

- Determinar la actividad inflamatoria de los extractos del material particulado (PM_{10}) de la Zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana de pulmón (A-549).

2.2. Objetivos específicos del Proyecto

- Determinar las concentraciones de partículas que resultan subtóxicas para las células epiteliales pulmonares.
- Determinar las dosis subtóxicas del peróxido de hidrogeno H_2O_2 en la línea celular de pulmón A-549.
- Determinar la cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas al exponer a las células de pulmón A-549 al PM_{10} de la zona urbana de la ciudad de Cuenca mediante fluorometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material de Estudio

3.1.1 Material Particulado PM₁₀

Para el estudio se utilizó la suspensión acuosa del material particulado (PM₁₀) del monitoreo de tres zonas urbanas distintas de la ciudad Cuenca recolectadas en filtros de éster celulosa de 0.8 µm (poro) y 47 mm de diámetro por el personal del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca. Las muestras fueron extraídas con agua desionizada pura, vía ultrasonificación. La concentración madre del material particulado (PM₁₀) se almacenó a -20°C en oscuridad. La recolección del material particulado (PM₁₀) se llevó a cabo en tres puntos de la ciudad de Cuenca cada una en dos fases y los días programados para el monitoreo fueron de lunes a viernes tomando en consideración la actividad humana y el incremento del movimiento vehicular en la ciudad.

Tabla 1. Localización y período de monitoreo del Material Particulado (PM₁₀) de la ciudad de Cuenca. Año 2013.

| Puntos | Ubicación | Período de Monitoreo | |
|--------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Fase 1 | Fase 2 |
| P1 | Calle Vega Muñoz y Hermano Miguel | 11/01/2013 – 21/02/2013 | 22/02/2013 – 4/04/2013 |
| P2 | Av. Loja y Remigio Tamariz | 05/04/2013 – 24/05/2013 | 27/05/2013 – 05/07/2013 |
| P3 | Av. Ricardo Durán (Vía a Baños) | 19/08/2013 – 27/09/2013 | 30/09/2013 – 06/11/2013 |

Fuente: Astudillo, A. (2014)

3.2 Modelo Biológico y Cultivo Celular

Para los ensayos se utilizó como material biológico la línea celular humana de cáncer de pulmón (A-549) (Figura 1) que fue cultivada en medio base de cultivo RPMI-1640 (GIBCO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2 mM) (GIBCO), y 1% Antibiótico-Antimicótico (100 Unidades/ml de Penicilina G, 100 µg/ml de Estreptomina y 25 µg/ml de Amphotericina B) (GIBCO). El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37°C de temperatura en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂, el tiempo de duplicación de las células es de 24 horas.

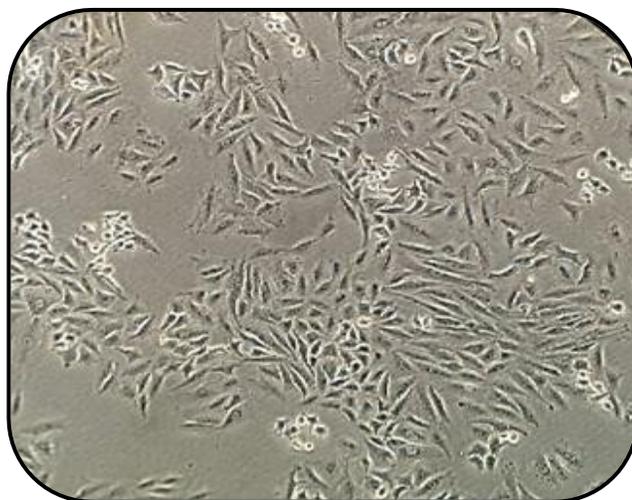


Figura 2. A-549 (Cáncer de pulmón). Microscopio invertido ZEISS (40X)
Fuente. González, G. (2014).

3.3 Ensayo de Viabilidad (MTS)

Dosis subtóxicas del Material particulado (PM₁₀)

Para determinar el porcentaje de células vivas en los ensayos, se procedió a realizar el ensayo colorimétrico MTS.

La siembra se realizó en multiplatos de 96 pocillos, se sembró 10.000 células/pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se aplicó tratamiento con las dosis a probar 0.82, 1.25 y 1.63 m³/mL del PM₁₀ y se dejó incubar por 2 horas. Pasado este tiempo se aplicó 20 µL del reactivo MTS en cada uno de los pocillos, por 2 horas a 37°C.

Se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro TECAN SUNRISE.

La cantidad de producto formado (formazán), medido por la absorbancia a 490nm, es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

3.4 Dosis sub-toxicas del Peróxido de Hidrogeno

A las mismas condiciones utilizadas para el ensayo de viabilidad celular, se utilizó el ensayo colorimétrico MTS para determinar las posibles dosis sub-tóxicas del peróxido de hidrogeno (H₂O₂), a concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 µM sobre las líneas celulares de pulmón A549.

La determinación de las dosis sub-tóxicas del H₂O₂ nos permitirá de tal manera establecer un control positivo para los posteriores ensayos.

3.5 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Fluorimetría

3.5.1 Controles

3.5.1.1 Control positivo

Como control positivo se trabajó con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) a una concentración de 1 µM, ya que este es uno de los principales inductores de especies reactivas de oxígeno generado endógenamente por varios procesos fisiológicos como respuesta respiratoria, inflamatoria y durante la fosforilación. Además, es una fuente natural de daño oxidativo en las células, ocasionando una serie de lesiones en el DNA, incluyendo rupturas de cadena simple y doble (Benhusein y cols., 2010).

3.5.1.2 Control negativo

Las muestras de material particulado fueron extraídas con agua desionizada pura, la misma que fue utilizada como control negativo.

3.6 Técnica

Para la evaluación de la producción de estrés oxidativo se utilizó al Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador de especies reactivas de oxígeno.

Para la realización de los ensayos se sembró 10.000 células/pocillo en un multiplato de 96 pocillos, en medio de cultivo RPMI suplementado a partir de cultivos en 80-90% de confluencia y se incubó durante 24 horas, transcurrido este tiempo, las células fueron incubadas con 200 µL de la solución de trabajo Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) 40 µM en Solución Salina de Hank's (HBSS) y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se desechó el medio y se realizó un lavado con Buffer fosfato salino (PBS) para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se reemplazó el medio previamente utilizado con medio HBSS (Solución salina equilibrada de Hank's) y se las expuso a las células a las concentraciones de material particulado (PM₁₀) a probar (0.82, 1.25 y 1.63 m³/ml). Se incubó la placa por 2 horas a 37°C. La fluorescencia DCFDA

se midió después de la exposición en un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation) a una λ_{ex} : 485nm y λ_{em} : 528 nm.

El estrés oxidativo se cuantificó en función a la intensidad de fluorescencia relativa proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno.

3.7 Análisis Estadístico

Para cada prueba se realizaron tres ensayos cada una por triplicado y a las mismas condiciones. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de comparación múltiple ANOVA y post test de Dunnett con el programa estadístico GraphPad Prism 5. Los niveles de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Viabilidad celular

La obtención de los datos de viabilidad es importante puesto que para partículas altamente reactivas, es importante ajustar la carga de manera que la viabilidad celular se mantenga mensurable (Harrington *et al.*, 2012), es por ello que en nuestro estudio se determinó la viabilidad mediante el ensayo colorimétrico MTS. Para conocer el porcentaje de viabilidad se expuso la línea celular A549 a tres concentraciones diferentes del Material particulado (PM₁₀) (0.82, 1.25 y 1.63 m³/mL), correspondiente a las zonas de monitoreo: Vega Muñoz y Hermano Miguel primera y segunda Fase (Punto 1); Av. Loja y Remigio Tamariz primera y segunda fase (Punto 2); Av. Ricardo Durán primera y segunda fase (Punto 3).

En la tabla 1 se detalla el porcentaje de viabilidad de las células A549 expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (0.82, 1.25 y 1.63 m³/mL) de las tres zonas de la ciudad de Cuenca. Nuestros resultados muestran que la viabilidad de todas las dosis probadas 0.82, 1.25 y 1.63 m³/mL es mayor del 70 % en todos los casos y no existen diferencias significativas entre los PM₁₀ de las tres zonas de cada una de las fases. El efecto demostrado por el PM₁₀ fue dosis dependiente de la concentración, es decir, que a medida que aumenta la concentración, la viabilidad disminuye paulatinamente, el resultado fue similar para todos los puntos, los mismos que se muestran a continuación.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de células A549 tratadas con diferentes concentraciones del PM₁₀.

| DOSIS | % de Viabilidad ± EE | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | PRIMERA ETAPA | | | SEGUNDA ETAPA | | |
| | P1. | P2. | P3. | P1. | P2. | P3. |
| C ⁻ | 97,90±1,094 | 97,90 ± 1,094 | 97,90 ± 1,094 | 97,90 ± 1,094 | 97,90 ± 1,094 | 97,90 ± 1,094 |
| 0.82 m ³ /mL | 96,23 ± 1,515 | 95,45 ± 1,011 | 94,19 ± 2,196 | 89,14 ± 2,039 | 87,05 ± 1,902 | 88,06 ± 1,675 |
| 1.25 m ³ /mL | 90,49 ± 0,526 | 87,21 ± 1,569 | 87,02 ± 1,345 | 85,10 ± 0,889 | 82,86 ± 2,268 | 85,62 ± 3,245 |
| 1.63 m ³ /mL | 87,78 ± 1,20 | 81,41 ± 1,500 | 80,15 ± 0,278 | 76,37 ± 1,137 | 74,84 ± 2,490 | 76,34 ± 1,210 |
| H ₂ O ₂ (1 μM) | 71,78 ± 0,359 | 71,78 ± 0,359 | 71,78 ± 0,359 | 71,78 ± 0,359 | 71,78 ± 0,359 | 71,78 ± 0,359 |

Cada valor representa la media ±EE de tres ensayos independientes, cada uno realizado por triplicado con respecto al control negativo.

Elaboración. González, G. (2014)

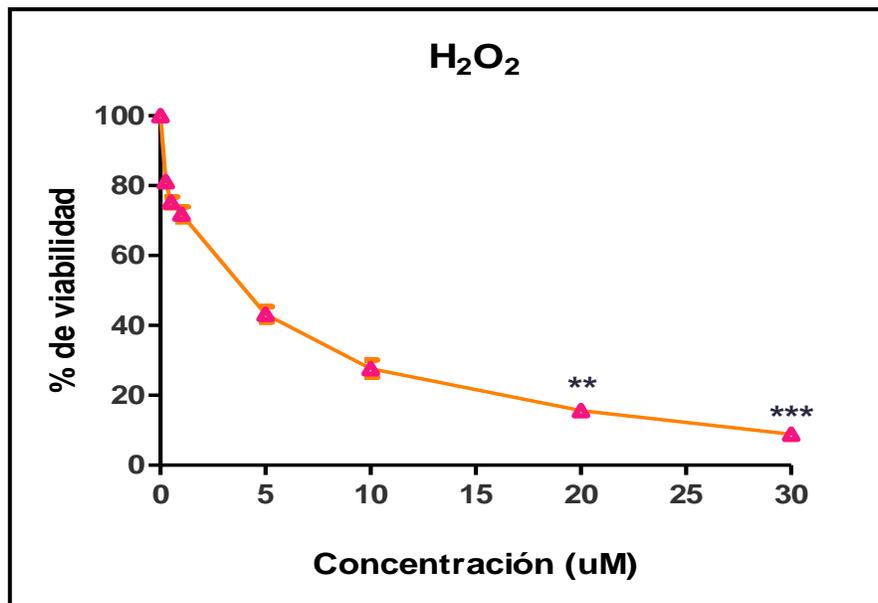
Los resultados obtenidos mediante ensayo MTS, nos permitieron concluir que el material particulado PM₁₀ no altero la viabilidad de las células A549, es así que podemos estar

seguros que el daño causado a las células se da por un efecto inducido por las soluciones acuosas de PM_{10} , mas no por muerte celular.

Una vez obtenidos los resultados de viabilidad y de confirmar que a las dosis con las que se trabajará no son toxicas se procedió a realizar los siguientes ensayos.

4.2. Determinación de las dosis subtóxicas del H_2O_2

Para conocer las dosis a las que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es subtóxica se expuso la línea tumoral a siete concentraciones diferentes (0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 μM).



Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad celular. A549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de H_2O_2 (0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 μM) (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

En la gráfica 1 se puede observar que el efecto demostrado por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) fue una actividad dosis-dependiente. El porcentaje de viabilidad determinada mediante el ensayo de MTS reveló que para las concentraciones de H_2O_2 de 0.25, 0.5 y 1 μM fue mayor al 70 %, mientras que para las concentraciones de H_2O_2 de 5, 10, 20, 30 μM la viabilidad de las células disminuyó de manera significativa a menos del 50% comparado con las células control, este efecto posiblemente se deba al daño generado por su capacidad para producir radicales libres (González et al., 2010). Ya que se ha reportado que la utilización de O_2 por las células es esencial para varios procesos bioquímicos, sin embargo algunos productos que derivan del proceso fisiológico normal del metabolismo del

O₂ representan una amenaza para la homeostasis celular. Estos productos son llamados Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Una de las principales ROS es el peróxido de hidrógeno que reacciona fácilmente en presencia de metales de transición, para producir un radical libre de oxígeno muy reactivo y dañino. Se cree el H₂O₂ es el principal compuesto responsable del potencial citotóxico observado en la inflamación tisular localizada (Coirini, 2010).

Como era de esperar, un nivel alto de peróxido de hidrógeno (1 mM) mata a las células cuando se realizan las mediciones a las 4 horas. En contraste, los niveles bajos (1 nM a 1 μM) de peróxido de hidrógeno estimula el daño celular de una manera dependiente de la dosis (Ohguro *et al.*, 1999). Estos resultados concuerdan con nuestros resultados en donde se observó que a mayor dosis se producía mayor muerte celular. Es por ello que debido al efecto tóxico que el H₂O₂ presentó a concentraciones de 5, 10, 20 y 30 μM, estas fueron omitidas para ser consideradas como el control positivo de los posteriores ensayos, estableciendo de esta manera un control positivo con H₂O₂ a una concentración de 1 μM, puesto que está dosis demostró ser subtóxica.

4.3. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Fluorimetría

Estudios de carcinogenicidad e inflamación pulmonar han mostrado un alto riesgo de enfermedades respiratorias y de carcinogénesis de pulmón en seres humanos expuestos a diversos polvos inhalables, fibras minerales, material particulado en el aire (PM) y de ozono (Valavanidis *et al.*, 2013). Muchos de los contaminantes individuales que componen esta mezcla en el ambiente son los radicales libres (por ejemplo, dióxido de nitrógeno) o tienen la capacidad para conducir reacciones de radicales libres (por ejemplo, ozono y partículas). Como consecuencia de ello, la exposición a esta amplia gama de contaminantes del aire da lugar a estrés oxidativo en el pulmón, y esto parece iniciar respuestas que son particularmente peligrosas para los miembros susceptibles de la población (Kelly, 2003). Es por ello que antes de considerar estas reacciones con más detalle, vale la pena revisar el impacto y la química de los principales contaminantes de interés, puesto que, el amplio espectro de criterios de valoración de la enfermedad (de la muerte cardiovascular a los ataques de asma) sugiere que más de un componente puede conducir a estos efectos sobre la salud (Kelly, 2003). Es así que en estudios previos realizados por el Centro de Estudios Ambientales de la Ciudad de Cuenca, con respecto a la composición química del PM₁₀ de la ciudad de Cuenca, se observó que el elemento que se reporta con mayor

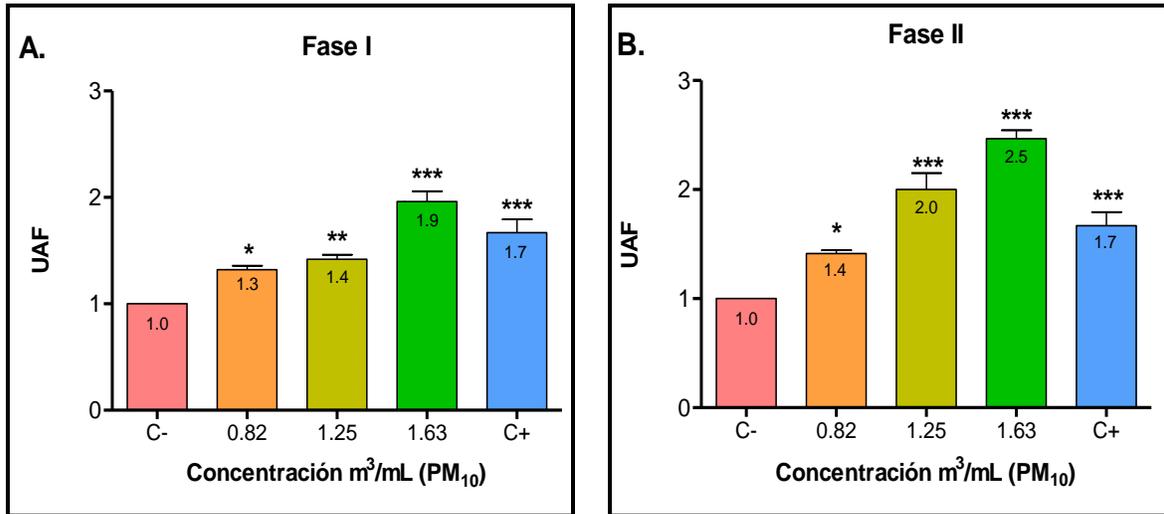
concentración en los tres puntos de estudio es el Fe, con una concentración máxima de 4777,77 ng/m^3 y una concentración mínima igual a 1888.88 ng/m^3 (Astudillo, 2014), datos de gran importancia para el presente estudio. Ver Anexo 2.

Por otra parte los estudios epidemiológicos han reportado consistentemente asociaciones entre la contaminación del aire por partículas, especialmente las partículas de menos de 10 micras (PM_{10}) de diámetro aerodinámico, y los efectos adversos para la salud, el aumento de la morbilidad y la mortalidad. Es en absoluto claro cómo la exposición al PM, por lo general desde concentraciones tan bajas, puede producir estos efectos en la salud (Kelly, 2003). Es así, que una vez que se ha logrado demostrar que el riesgo que las PM ejercen sobre la salud se correlaciona con el tamaño de las partículas de aire (Levy *et al.*, 2000), para la presente investigación se trabajó con partículas con un tamaño de 10 μm (PM_{10}) debido a la gran capacidad que tienen para penetrar la región alveolar del pulmón y de tal forma ejercer su toxicidad, adquiriendo especial atención en los últimos años como un factor causal en el aumento de la incidencia de enfermedades respiratorias, incluyendo el cáncer de pulmón (Valavanidis *et al.*, 2013).

Las ROS liberadas por el PM no pueden ser detectadas directamente por sus breves tiempos de vida media, por lo que se han desarrollado algunos métodos alternativos. En un tipo de métodos, una muestra molecular reacciona con las especies radicales y forma un producto estable que puede ser analizado con una variedad de técnicas (Sahagún, 2009), como el análisis por fluorimetría que es el ensayo aplicado en la presente investigación. Nuestro estudio se enfocó en cuantificar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) liberada por el PM_{10} recolectado en tres zonas de la ciudad de Cuenca mediante el ensayo de Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína como indicador de ROS.

En la gráfica 2 (A y B) se muestran los resultados obtenidos después de 2 horas de exposición con PM_{10} correspondiente a las fases I y II de la zona Vega Muñoz sobre la línea celular A549. Se puede observar que la cantidad de especies reactivas de oxígeno medidas en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) incrementan significativamente conforme aumenta la concentración del material particulado (PM_{10}) siendo más evidente para ambos casos la concentración de 1.63 m^3/mL (***) $p < 0.0001$) en comparación con el control negativo. Sin embargo, comparando la respuesta entre las dos fases de monitoreo de la misma zona se puede evidenciar que existe mayor inducción de ROS en la fase II, siendo evidenciado esto desde la dosis más baja hasta la más alta.

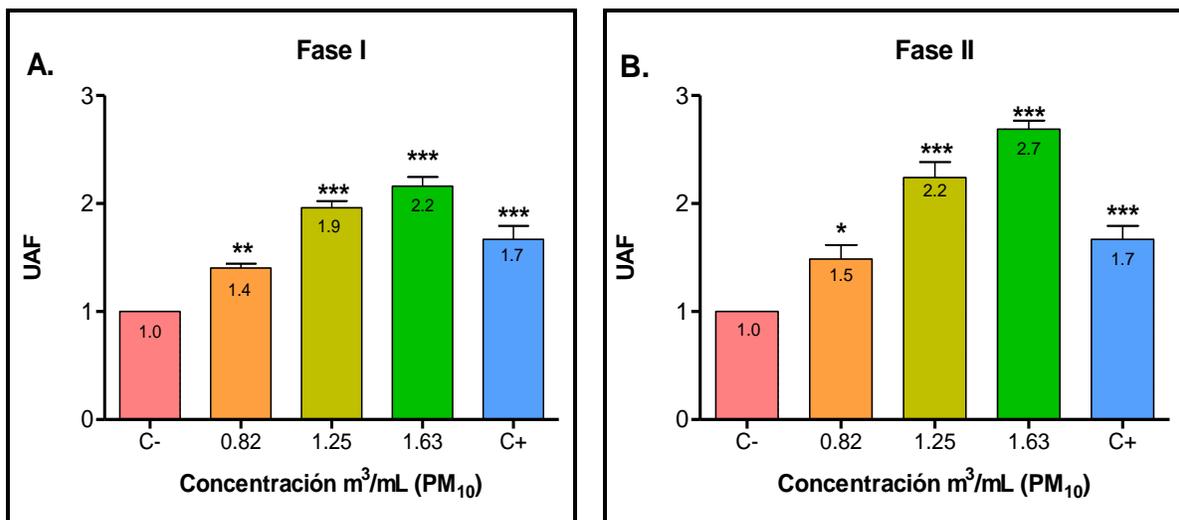
VEGA MUÑOZ Y HERMANO MIGUEL



Gráfica 2. Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones del PM_{10} (0.82, 1.25 y 1.63 m^3/mL). Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado (* $p < 0.005$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$). UAF (Unidades arbitrarias de fluorescencia).

En la gráfica 3 (A y B) se puede observar que la cantidad de ROS producidas por el PM_{10} de las etapas correspondientes a la Av. Loja sobre las células fueron dependientes de la concentración y significativamente diferentes al grupo control. Comparando los resultados obtenidos para cada fase se puede afirmar que el PM_{10} recolectado en la fase II conduce a mayor producción de ROS con respecto a lo producido por la fase I de la misma zona.

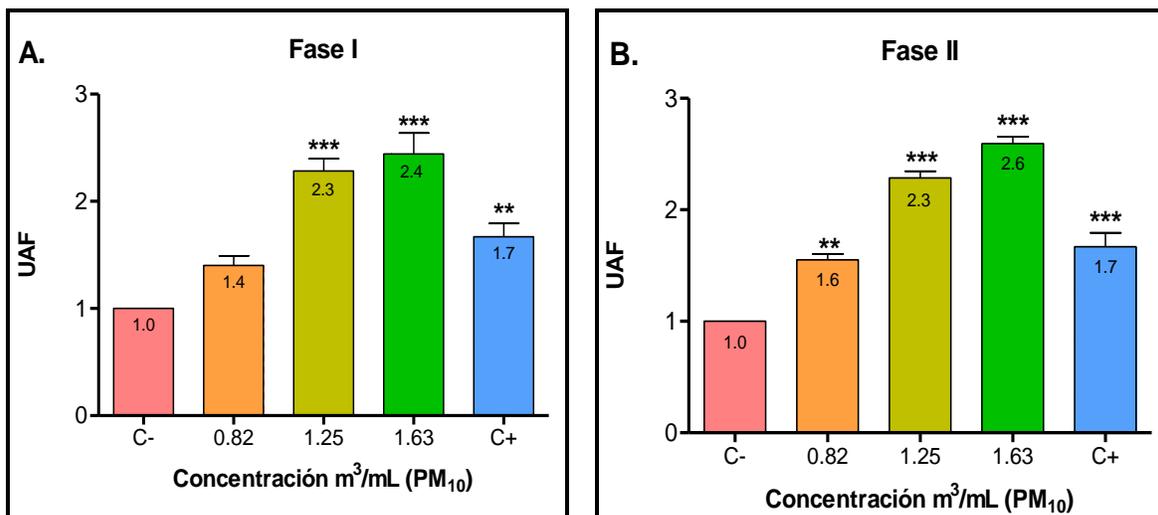
AV. LOJA Y REMIGIO TAMARIZ



Gráfica 3. Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones del PM₁₀ (0.82, 1.25 y 1.63 m³/mL). Cada barra representa la media ±EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado (**p*<0.005, ***p*<0.001, *** *p*<0.0001). UAF (Unidades arbitrarias de fluorescencia).

En la gráfica 4 (A y B) se puede observar que la cantidad de ROS para cada etapa, aumenta en todas las concentraciones de manera dosis-respuesta, es decir que a medida que aumenta la concentración del PM₁₀ aumenta la cantidad de especies reactivas de oxígeno liberadas por las células tratadas. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que el PM₁₀ de la fase II (Av. Ricardo Duran) tiende a producir mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno en comparación a la fase uno de la misma zona que produce ROS en menor cantidad.

AV. RICARDO DURÁN



Gráfica 4. Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones del PM₁₀ (0.82, 1.25 y 1.63 m³/mL). Cada barra representa la media ±EE de tres experimentos independientes cada una por triplicado (**p*<0.005, ***p*<0.001, *** *p*<0.0001). UAF (Unidades arbitrarias de fluorescencia).

PM₁₀ es capaz de inducir la formación de ROS después de 1 hora de exposición sostenida durante 12 horas. Sin embargo, aun cuando la generación de ROS tiende a disminuir conforme aumentan las horas, el daño celular comienza a ser evidente observándose muerte celular (Chirino *et al.*, 2010). Nuestros resultados van de la mano con los obtenidos por los autores anteriormente citados puesto que se tomó como referencia 2 horas de exposición de las células al PM₁₀, tiempo en donde las intensidades de fluorescencia de DCF alcanzaron valores pico y cayeron al nivel de base después de 12 horas, es decir, que a las 2 horas de exposición, las intensidades de fluorescencia fueron significativamente

mayores en comparación con las células de control no expuestas y con respecto a las obtenidas posteriormente.

Debido a que PM_{10} puede depositarse fácilmente en el sistema respiratorio, la toxicidad de PM_{10} de las zonas urbanas se ha discutido en muchos otros estudios, en donde se ha descrito que los efectos inflamatorios más graves son mediados por la fracción gruesa del PM (PM_{10}), caracterizado por un alto contenido de metales de transición y compuestos orgánicos que induce la respuesta pro-inflamatoria y la muerte celular necrótica de células pulmonares cultivadas (Gualtieri *et al.*, 2012). La composición y las variaciones en la concentración de PM_{10} estarían asociadas al incremento de emisiones vehiculares, que a su vez dependerán del número de automotores que circulen por el área de evaluación. (Astudillo, 2014).

Los resultados de este estudio muestran que la producción de especies reactivas de oxígeno fue significativamente mayor en la población celular expuesta al PM_{10} respecto a la observada en el control negativo. La producción de ROS se incrementó en todos los casos al incubar las células con concentraciones crecientes de PM_{10} . La respuesta de las células A549 frente al PM_{10} fue similar a los resultados obtenidos por Hyun (2012), quien mostró que el extracto orgánico del material particulado (PM_{10}), generó ROS en las células en una forma dependiente de la dosis. Sin embargo el PM que corresponde a la fase 2 de las tres zonas presentó la concentración más alta de ROS con respecto al PM de las mismas zonas de la fase 1, esta aseveración se sostiene en el hecho de que efectivamente en el estudio de la composición química del PM de las tres zonas en la fase 2 se encontró mayor cantidad de metales y iones y por ende una mayor concentración de PM, características que le llevarían al PM_{10} recolectado en la fase 2 a ser la mayor productora de ROS y la etapa con mayor riesgo para la población que como se mencionó anteriormente podría deberse al incremento de emisiones vehiculares por estos sectores y temporadas.

De esta manera, una vez analizados los resultados obtenidos de la composición del material particulado (Anexo 2), y los resultados de ROS de cada zona en las células A549, se puede observar que cada PM_{10} recolectado muestra diferente respuesta en los mismos ensayos, esto se puede atribuir a que el potencial que cada PM_{10} recolectado tiene para liberar ROS depende de varias características fisicoquímicas, como lo sostiene Akhtar *et al.*, 2014 que también afirma que es importante tener en cuenta las influencias combinadas

de estas propiedades fisicoquímicas a la hora de explicar la toxicidad del PM₁₀. Li, et al 2008 citado por Astudillo, 2014 menciona que otras evidencias señalan que los metales de transición y otros productos químicos asociados a las partículas atmosféricas pueden también ejercer efecto pro-inflamatorio en el sistema respiratorio y generar ROS (por ejemplo Fe, Ni, Cu, Co y Cr). Aunque hasta la fecha no hay suficiente evidencia para identificar y asociar a un único componente responsable de la toxicidad del PM₁₀, parece obvio que los componentes orgánico solubles y los metales solubles en agua asociados al PM₁₀, pueden ser mediadores importantes en el daño celular (Gutiérrez *et al.*, 2006). Por otro lado Kelly, 2003 sostiene que, la exposición de las células a partículas ambientales recogidos de diferentes zonas urbanas provoca estrés oxidativo que se correlaciona con el contenido de hierro de las partículas. Es así que debido a que en el presente trabajo se pudo contar con datos correspondientes a las composición química y a las concentraciones de PM₁₀ podemos afirmar lo que sostiene el autor anteriormente citado, puesto que se pudo observar en nuestros resultados que las células tratadas con el PM₁₀ de las zonas con mayor concentraciones de Fe liberaron mayor cantidad de ROS respectivamente, llevando a la conclusión de que el Fe podría ser el principal determinante de la respuesta inflamatoria aguda.

La extrapolación de los resultados puede conducir a la suposición sobre el riesgo de la exposición a la contaminación del aire, está hipótesis para los efectos en la salud inducidos por partículas ambientales, es el estrés oxidativo. La dosis elevada, la inadecuada remoción de ROS, los componentes altamente reactivos en la respuesta al estrés oxidativo pueden causar severas disfunciones metabólicas, daño biológico a las macromoléculas (Sahagún, 2009) y por supuesto inflamación a nivel pulmonar que podría en ultima instancia dar lugar a cáncer de pulmón.

CONCLUSIONES

- La composición química del material particulado PM_{10} proveniente de las seis zonas de la ciudad de Cuenca, influye en el potencial de la respuesta inflamatoria, siendo más significativa para los puntos de la primera etapa de recolección.
- El material particulado fracción respirable PM_{10} en una zona de alto flujo vehicular de Cuenca (Av. Loja y Remigio Tamariz) puede ser uno de los factores de riesgo que contribuyen al aumento del índice de cáncer de pulmón en la población expuesta, debido a que pueden desestabilizar el sistema inmunológico del pulmón conduciendo a la inflamación crónica y sus consecuencia neoplásicas.

RECOMENDACIONES

- Dado a que el efecto pro-inflamatorio del Material Particulado PM_{10} depende en la mayoría de los casos a su composición, como la presencia de metales pesados, encontrados en este caso en el aire-ambiente de la ciudad, es importante que investigaciones futuras se encaminen a establecer y fortalecer el tema de la Contaminación Atmosférica, el cual es de esencial importancia a fin de garantizar los derechos de las personas a desarrollarse en un ambiente libre de riesgos.

Bibliografía

1. Akhart U., Rastogi N., McWhinney R., Urch B., Chow C., Evans G., Scott J. (2014). The combined effects of physicochemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells. *Toxicology Reports* 1(2014): 145-156.
2. Astudillo A. (2014). Estudio de Genotoxicidad del material particulado (PM₁₀) de la zona urbana del cantón Cuenca. Tesis previa a la obtención del título de Magister en toxicología industrial y ambiental, Universidad de Cuenca.
3. Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM. «Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay». *Lybian J Med.* 2010; 5: 4637.
4. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca. (2006). *Contaminación del Aire*. Cuenca.
5. Chirino Y., Sánchez Y., Osornio A., Morales R., Gutiérrez M., Segura Y., Rosas I., Pedraza J., García C. (2010). PM₁₀ impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters* 209-216.
6. Coirini H. (2010). Toxicidad del oxígeno y radicales libres.
7. Fina B. (2006). Estrés oxidativo. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas. Rosario-Argentina.
8. Eruslanov & Kusmartsev. (2010). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology Volume 594, 2010, pp 57-72*
9. Freshney R. (2010). Cytotoxicity. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. 6th edition. Edited by Wiley-Liss 359-373.
10. Granda P. & Tapia D. (2011). Informe Calidad del Aire 2011. Cuenca-Ecuador.
11. González E., Palomino., Carretero M., Gómez S. (2010). Neuroprotección mediada por diterpenos aislados de *Sideritis* spp. frente al estrés oxidativo en astrocitos. *Departamento de Farmacología*. Universidad Complutense de Madrid. España.
12. Gualtieri M., Longhin E., Mattioli M., Mantecca P., Tinaglia V., Mangano E., Proverbio M., Bestetti G., Camatini M., Battaglia C. (2012). Gene expression profiling of A549 cells exposed to Millan PM2.5. *Toxicology Letters* 136-145.
13. Gutierrez C., Garcia C., Ruiz V., Roubicek DA., Cedeño M., Wegman O. (2006). Induced DNA damage and chemical composition of airborne particulates from Mexico City Metropolitan Area. *Environmental Mol Mutagen* 47:199-211.

14. Haar C., Hassing I., Bol M., Bleumink M., Pieters R. (2006). Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clinical and Experimental Allergy*, 36: 1469-1479.
15. Harrington A., Tsirka S & Schoonen M. (2012). Quantification of particle-induced inflammatory stress response: a novel approach for toxicity testing of earth materials. *Geochemical Transactions*, 13:4
16. Hyun M., Ryong H., Joo Y., Shin D., Hyuck K., Min S. (2012). Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. *Mutation Research* 749 (2012) 39-47.
17. Jachero L., Moscoso M. (2010). Evaluación del Riesgo de Exposición a Sustancias Tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la Ciudad de Cuenca. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca. Cuenca Ecuador. págs. 21
18. Kelly F. (2003). Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 2003; 60:612-616.
19. Konigsberg. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Editorial El Manual Moderno. México. Pág. 459-460.
20. Levy J., Hammitt J., Spengler J., (2000). Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between-study variability?. *Environmental Health Perspectives* 108, 109–117.
21. Li N., Xia T., Nel A. (2008). The Role of Oxidative Stress in Ambient Particulate Matter induced Lung Diseases and its Implications in the Toxicity of Engineered Nanoparticles Free Radical. *Bio Med* 44(9): 1689-1699.
22. Ohguro N., Fukuda M., Sasabe T., Tano Y. (1999). Concentration dependent effects of hydrogen peroxide on lens epithelial cells. *Department of Ophthalmology*. Osaka University Medical School. Japan.
23. OMS. Organización Mundial de la Salud. Datos publicados en el 2011.
24. OPS. Organización Panamericana de la Salud. Datos publicados en el 2010.
25. Percival M. (1998). Antioxidants. *Advanced Nutrition Publications*.
26. Sahagún M. (2009). Efecto Genotóxico de la Partículas Atmosféricas Urbanas. Tesis de grado previa a la obtención de Maestra en Ciencias en Medio Ambiente y Desarrollo Integrado. Instituto Politecnico Nacional. México.
27. Razo A. (2010). Evaluación de la respuesta antioxidante y el daño tóxico en pulmón de ratas expuestas a diferentes tipos de material particulado (PM). Tesis de grado

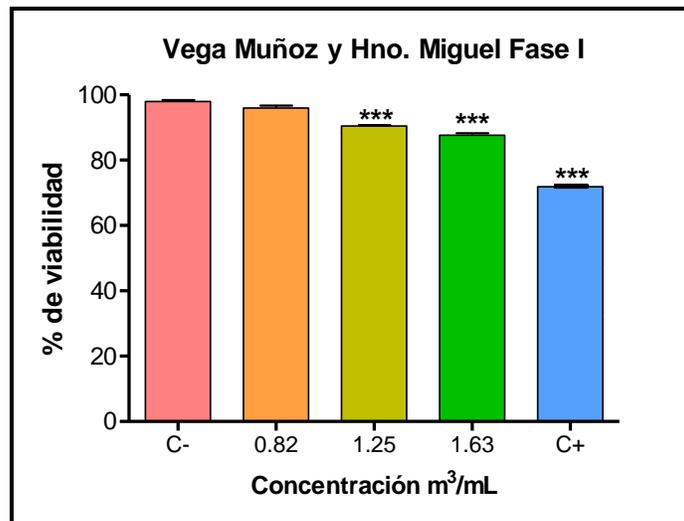
previa para la obtención del título de Maestra en Ciencias Quimicobiológicas, Instituto Politécnico Nacional.

28. Setti. (2008). Agentes Terapéuticos. Editorial Medica. Pág. 170-176.
29. Tamagawa, E., & Bai, N. (2008). Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Journal of Physiology-Lung*. 79–85.
30. Torres Y. (2011). Estado oxidante-antioxidante en eritrocitos de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. “Efecto de contaminantes de la Atmósfera Material Particulado 2.5”. Tesis de grado previa a la obtención del título de Doctor en Investigación en Medicina, Instituto Politécnico Nacional.
31. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis K., Loridas S. (2013). Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Psticulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 1660-4601.
32. Vallius, M. (2005). Characteristics and sources of fine particulate matter in urban air. *Unit of Environmental Epidemiology*.Kupio, Finland.
33. WHO. World Health Organization. (2013). Regional Office for: Europe.

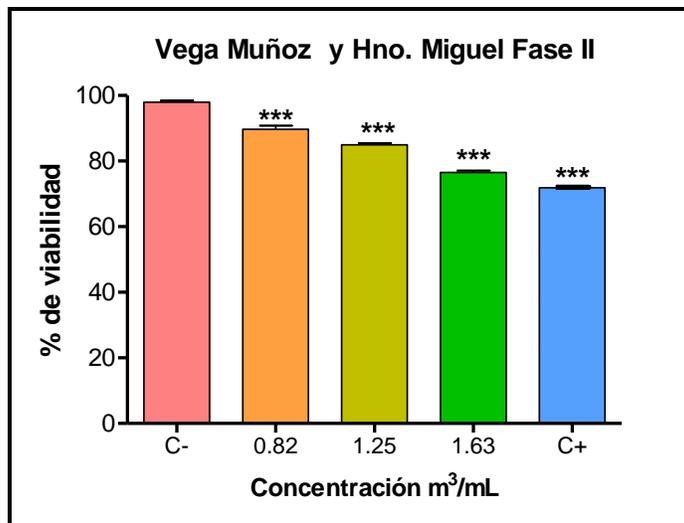
ANEXOS

ANEXO 1. Viabilidad Celular de PM₁₀, en la línea celular de pulmón A549

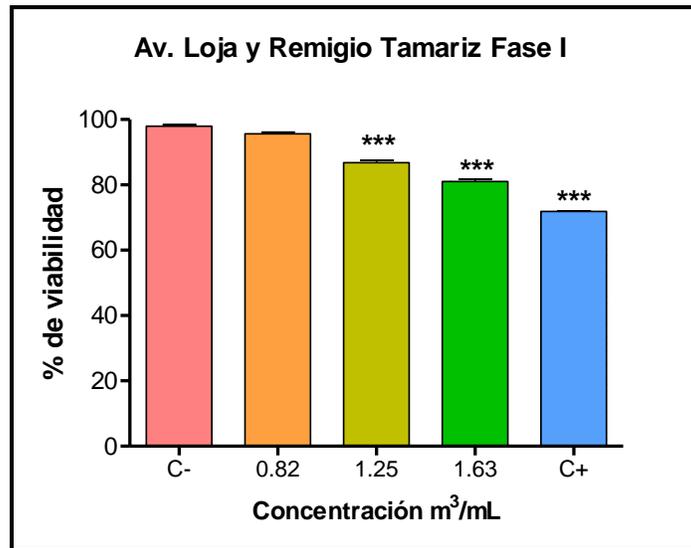
Se puede observar en la gráficas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, el porcentaje de viabilidad de las células A549 expuestas a diferentes concentraciones de PM₁₀. La respuesta observada es similar para todos los puntos de monitoreo, siendo el PM₁₀ correspondiente a la Av. Loja y Remigio Tamariz Primera Fase el que menor porcentaje de viabilidad celular presento.



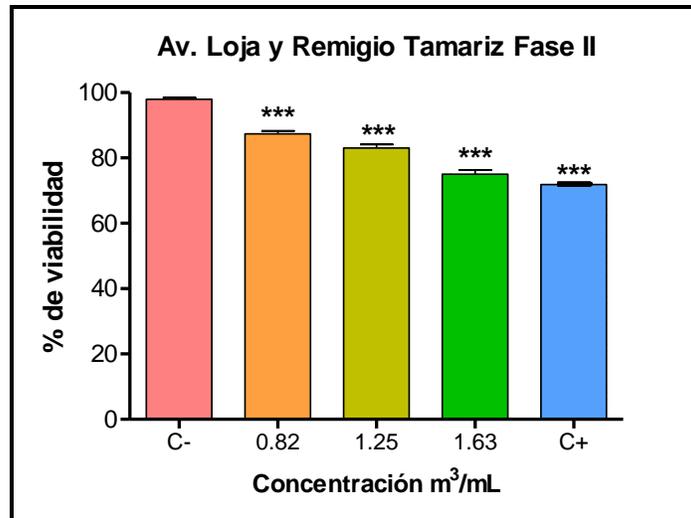
Gráfica 5. Porcentaje de células vivas de A-549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (**P<0.001). Punto 1 (Primera Fase)



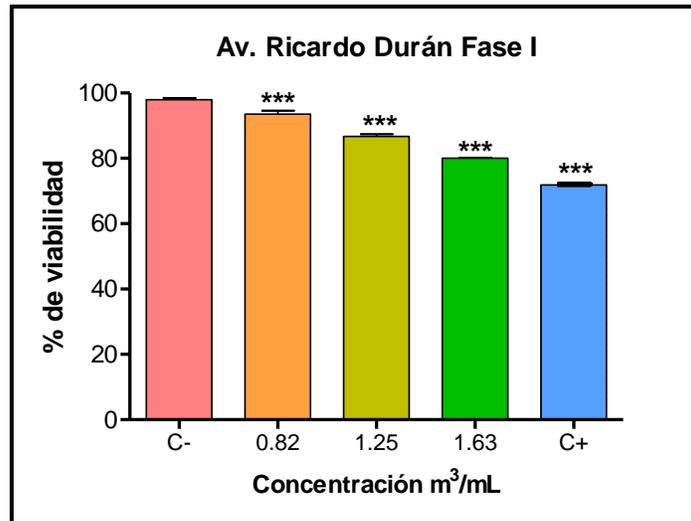
Gráfica 6. Porcentaje de células vivas de A-549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (**P<0.001). Punto 1 (Segunda Fase)



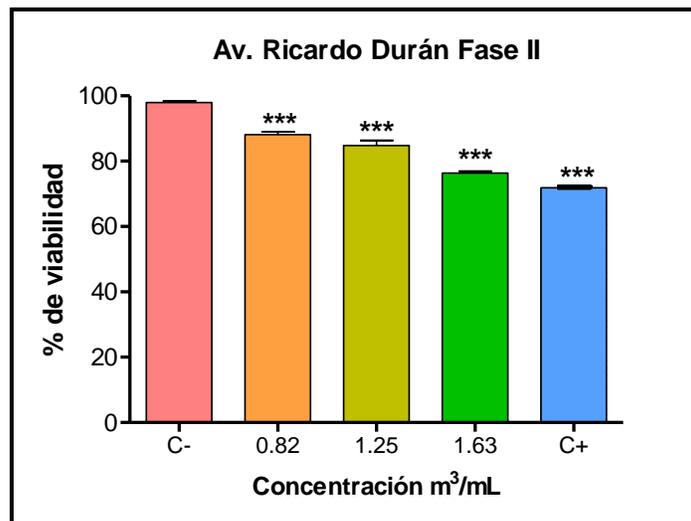
Gráfica 7. Porcentaje de células vivas de A-549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (***P*<0.001). Punto 2 (Primera Fase)



Gráfica 8. Porcentaje de células vivas de A-549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (***P*<0.001). Punto 2 (Segunda Fase)



Gráfica 9. Porcentaje de células vivas de A-549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (***P*<0.001). Punto 3 (Primera Fase)



Gráfica 10. Porcentaje de células vivas de A-549 (cáncer de pulmón), expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (***P*<0.001). Punto 3 (Segunda Fase)

ANEXO 2.

Composición del Material Particulado (PM₁₀)

Tabla 2. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM₁₀ recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera fase)

| Puntos de monitoreo | Concentración de metales pesados (ng/m ³) | | | | | | |
|---------------------------|---|--------|-------|--------|-------|-------|------|
| | Fe | Zn | Mn | Cu | Ni | Cr | Cd |
| Vega Muñoz Hno. Miguel | 1888,88 | 187,05 | 36,11 | 175,94 | 26,83 | N.C.* | N.C. |
| Tecnológico | 2801,83 | 220,33 | 57,38 | 22,22 | N.C. | N.C. | N.C. |
| Av. Ricardo Durán | 3180,55 | 107,38 | 60,16 | 10,16 | N.C. | N.C. | N.C. |

*N.C. = No cuantificado

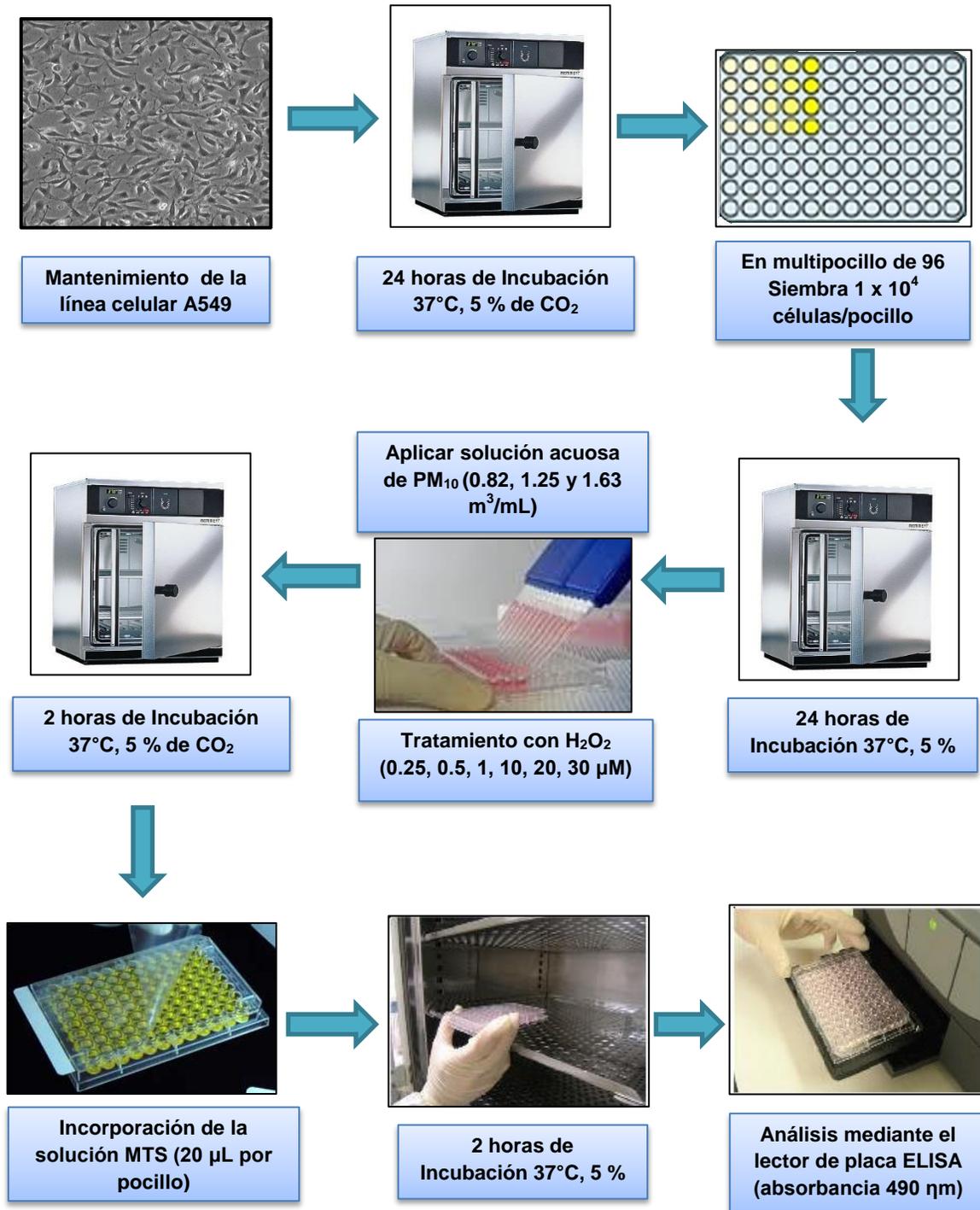
Fuente: Resultados laboratorio CESEMIN

Tabla 3. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM₁₀ recolectadas en los puntos de monitoreo (Segunda fase)

| Puntos de Monitoreo | Concentración de metales pesados (ng/m ³) | | | | | | |
|---------------------------|---|--------|-------|-------|------|------|------|
| | Fe | Zn | Mn | Cu | Ni | Cr | Cd |
| Vega Muñoz Hno. Miguel | 3981,11 | 274,05 | 75,88 | 22,22 | N.C. | N.C. | N.C. |
| Tecnológico | 4777,77 | 137,00 | 118,5 | 25,88 | N.C. | N.C. | N.C. |
| Av. Ricardo Durán | 4722,66 | 97,22 | 88,88 | 12,94 | N.C. | N.C. | N.C. |

Fuente: Resultados laboratorio CESEMIN

ANEXO 3. Esquema de Viabilidad Celular



ANEXO 4. Esquema para determinación de ROS

