



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIÓLOGO

**Evaluación del daño genotóxico de la línea celular A-549 expuesta al material particulado (PM<sub>10</sub>) recogido en la zona urbana del cantón Cuenca.**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

**AUTOR:** Gutiérrez Valle, Israel Andrés

**DIRECTORA:** Ramírez Orellana, María Isabel, Mg.

**CO-DIRECTORA:** Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Dra.

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: “Evaluación del daño genotóxico de la línea celular A-549 expuesta al material particulado (PM10) recogido en la zona urbana del cantón Cuenca” realizado por Gutiérrez Valle Israel Andrés ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre del 2014

f) \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

“Yo Israel Andrés Gutiérrez Valle declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: Evaluación del daño genotóxico de la línea celular A-549 expuesta al material particulado ( $PM_{10}$ ) recogido en la zona urbana del cantón Cuenca, de la Titulación de Biólogo siendo Mg. María Isabel Ramírez Orellana directora del presente 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 investigativo, 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: “Forman 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) \_\_\_\_\_

Israel Andrés Gutiérrez Valle.

C.I.: 1104120264

## **DEDICATORIA.**

Dedico las horas empleadas en este trabajo:

A mí querida hermana por estar a mi lado.

A mi madre por cuidar de mi salud a pesar de mi constante obstinación por no permitírsele.

A mi padre que me enseñó el valor infinito de soñar despierto y sin cuyas enseñanzas habría terminado este documento más pronto, pero no con tanto sentido.

A la Mgs. María Isabel Ramírez por su infinita paciencia y por el apoyo brindado durante todo el desarrollo de la investigación.

**Israel Andrés Gutiérrez Valle.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la escuela de Biología, bajo la dirección de la Blga. María Lorena Riofrío por la formación estudiantil recibida.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por permitirme ser parte de su equipo de investigación y ayudarme a crecer profesionalmente.

A la Mg. María Isabel Ramírez, por orientarme durante todo el desarrollo de la presente investigación.

A mis amigas y amigos del Laboratorio de Genética Toxicológica por la ayuda, los conocimientos compartidos y por todos los buenos momentos. Especialmente quiero agradecer a Gabriela Velázquez por sus enseñanzas y por estar presta a colaborar con las inquietudes surgidas durante el desarrollo de la investigación.

**Israel Andrés Gutiérrez Valle.**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |     |
|---|-----|
| CARATULA.....   | i   |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....   | ii  |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....  | iii |
| DEDICATORÍA.....  | iv  |
| AGRADECIMIENTO.....   | v   |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS.....   | vi  |
| ABREVIATURAS.....   | vix |
| RESUMEN.....  | 1   |
| ABSTRACT.....   | 2   |
| INTRODUCCIÓN.....   | 3   |
| MARCO TEORICO.....  | 5   |
| <i>Contaminación atmosférica</i> .....  | 6   |
| <i>Material Particulado (PM) suspendido en el aire</i> .....  | 7   |
| <i>Ingreso del material particulado al cuerpo humano</i> .....  | 10  |
| <i>Genotoxicidad del material particulado</i> .....   | 12  |
| <i>Mecanismos por los que el PM podría ocasionar daños en el ADN</i> .....                                      | 12  |
| <i>Roturas de cadena simple y doble en el ADN</i> .....   | 13  |
| <i>Estudios desarrollados para evaluar la toxicidad del PM<sub>10</sub></i> .....                               | 14  |
| <i>Ensayo cometa</i> .....  | 15  |
| <i>Recolección de muestras del PM<sub>10</sub> en la ciudad de Cuenca</i> .....                                 | 17  |
| OBJETIVOS.....  | 18  |
| MATERIALES Y METODOS.....   | 19  |
| <i>Modelo Biológico</i> .....   | 20  |
| <i>Condiciones del cultivo</i> .....  | 20  |
| <i>Controles</i> .....  | 20  |
| <i>Siembra y cosecha de la línea celular</i> .....  | 20  |
| <i>Viabilidad mediante el ensayo FDA-BrEt</i> .....   | 21  |
| <i>Ensayo cometa</i> .....  | 21  |
| <i>Análisis de datos del ensayo cometa</i> .....  | 21  |
| RESULTADOS.....   | 24  |
| <i>Viabilidad de las líneas celulares expuestas al PM<sub>10</sub> recolectado en la ciudad de Cuenca</i> ..... | 25  |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Evaluación de la genotoxicidad de los distintas dosis frente al control negativo.....</i> | <b>28</b> |
| <i>Comparación del efecto genotóxico de las 2 fases.....</i>                                 | <b>28</b> |
| <i>Av. Vega Muñoz y Hermano Miguel.....</i>  | <b>28</b> |
| <i>Av. Loja y Remigio Tamariz.....</i>   | <b>29</b> |
| <i>Av. Ricardo Duran.....</i>  | <b>30</b> |
| DISCUSIÓN.....   | <b>31</b> |
| CONCLUSIONES.....  | <b>33</b> |
| RECOMENDACIONES.....   | <b>34</b> |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | <b>35</b> |
| ANEXOS.....  | <b>38</b> |

### Lista de Tablas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Puntos de muestreo del PM <sub>10</sub> con las fechas las dos fases de recolección.....   | <b>17</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Porcentajes de viabilidad de la línea celular tratados con el PM <sub>10</sub> de los distintos puntos de muestreo a tres distintas concentraciones..... | <b>25</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM <sub>10</sub> recolectados en los puntos de monitoreo (Primera etapa).....                    | <b>39</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM <sub>10</sub> recolectados en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa).....                    | <b>39</b> |
| <b>Tabla 6.</b> Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM <sub>10</sub> recolectados en los puntos de monitoreo (Primera etapa).....            | <b>40</b> |
| <b>Tabla 7.</b> Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM <sub>10</sub> recolectados en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa).....            | <b>40</b> |

### Lista de figuras

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Microfotografía de partículas del PM con características físicas distintas.                             | <b>8</b>  |
| <b>Figura 2</b> Tamaño del PM y su capacidad de alcanzar diferentes tejidos.....   | <b>11</b> |
| <b>Figura 3</b> Visualización de los cometas en el microscopio, 400 x.....   | <b>16</b> |
| <b>Figura 4</b> Células epiteliales A-549 en una caja de cultivo.....  | <b>20</b> |
| <b>Figura 5</b> Esquema de los tratamientos de PM <sub>10</sub> aplicados a los cultivos celulares..                     | <b>21</b> |
| <b>Figura 6</b> Esquema para realizar el ensayo cometa.....  | <b>23</b> |
| <b>Figura 7</b> Variación en la concentración de aniones en las muestras de PM <sub>10</sub> durante las dos etapas..... | <b>39</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 8.</b> Variación en la concentración de metales pesados en las muestras de PM <sub>10</sub> durante las dos etapas..... | <b>40</b> |
|---|-----------|

### **Lista de Graficas**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Grafica 1.</b> Daño genotóxico de las distintas dosis comparados con el control negativo (solo células).....   | <b>27</b> |
| <b>Grafica 2.</b> Comparación de daño genotóxico provocado por el PM <sub>10</sub> de las fases recolectado en la Av. Vega Muñoz y Hermano Miguel ..... | <b>28</b> |
| <b>Grafica 3.</b> Comparación de daño genotóxico provocado por el PM <sub>10</sub> de las dos fases recolectado en la Av. Loja y Remigio Tamariz.....   | <b>28</b> |
| <b>Grafica 4.</b> Comparación de daño genotóxico provocado por el PM <sub>10</sub> de las dos fases recolectado en la Av. Ricardo Duran.....            | <b>29</b> |

## **ABREVIATURAS.**

**A-549:** Línea celular de Pulmón.

**Br-Et:** Bromuro de etidio

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SFB:** Suero fetal Bovino

**SSBs:** Roturas de Cadena simple (single strand break)

**DSBs:** Roturas de doble cadena (double strand break)

**PM:** Material particulado (particulate matter)

## RESUMEN

La mezcla de partículas suspendidas en el aire con un diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$  denominadas  $\text{PM}_{10}$  (material particulado) es una de las principales preocupaciones de la salud pública ambiental. El  $\text{PM}_{10}$  posee características físicas que le permiten ingresar muy profundamente en el tracto respiratorio y ocasionar enfermedades respiratorias, cardiopulmonares y cáncer. Los efectos nocivos están relacionados con el tamaño y la composición del material particulado en la que encontramos algunas sustancias como los metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y aniones.

En este estudio evaluamos la genotoxicidad de la fracción acuosoluble del  $\text{PM}_{10}$  recolectado en tres puntos distintos de la ciudad de Cuenca durante dos etapas. Para los estudios utilizamos la línea celular A-549 (cáncer de pulmón) que fue expuesta al  $\text{PM}_{10}$  de cada punto a tres concentraciones distintas ( $0.82 \text{ m}^3/\text{mL}$ ,  $1.25 \text{ m}^3/\text{mL}$  y  $1.63 \text{ m}^3/\text{mL}$ ), luego se evaluó su efecto genotóxico mediante el ensayo cometa. Se encontró que el  $\text{PM}_{10}$  de algunos puntos produce un efecto genotóxico y que podría estar vinculado a la producción de especies reactivas de oxígeno por causa de la presencia de metales pesados y aniones.

**Palabras clave:** Contaminación ambiental, ensayo cometa, genotoxicidad, material particulado, roturas de cadena de ADN.

## ABSTRACT

The mixture of airborne particles with a diameter smaller than 10 microns called PM<sub>10</sub> (particulate matter) is one of the main concerns of environmental public health. The PM<sub>10</sub> has physical characteristics that allow you to enter very deeply into the respiratory tract and cause respiratory, cardiopulmonary disease and cancer. The harmful effects are related to the size and composition of particulate matter in which we find some substances such as heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and anions.

In this study we evaluated the genotoxicity of water-soluble fraction of PM<sub>10</sub> collected at three different points in the city of Cuenca for two stages. For studies used the A-549 (lung cancer), cell line was exposed to PM<sub>10</sub> from each point to three different concentrations (0.82 m<sup>3</sup> / mL, 1.25 m<sup>3</sup> / mL and 1.63 m<sup>3</sup> / mL). Then the genotoxicity effect was evaluated using the comet assay. We found that some points PM<sub>10</sub> produces a genotoxic effect and could be linked to the production of reactive oxygen species due to the presence of heavy metals and anions.

**Keywords:** Air pollution, comet assay, genotoxicity, particulate matter, DNA strand breaks.

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de fin de titulación se desarrolló gracias al Convenio Específico de Cooperación entre la Universidad Técnica Particular de Loja y Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca. El objetivo de ambas instituciones era el de monitorear el aire de la ciudad de Cuenca utilizando como parámetro el material particulado ( $PM_{10}$ ) aerotransportado, para poder determinar su composición química y el posible daño genotóxico que podría producir en la población expuesta.

Para realizar la investigación el personal del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca se encargó de monitorear y recolectar las muestras de  $PM_{10}$  en tres distintos puntos de la ciudad, cada punto representa un área con un uso de suelo determinado. El primer punto es la calle Vega Muñoz y Hermano Miguel que esta designada por el municipio de la ciudad para la gestión, administración, comercio, servicios generales y vivienda (Sector de planeamiento del Centro Histórico), la zona se caracteriza por poseer una gran cantidad de comercios y un flujo vehicular importante. El segundo punto de muestreo está ubicado en la calle Av. Loja y Remigio Tamariz y es considerada como una de las principales vías de ingreso al centro histórico por lo que el flujo vehicular es elevado, esta área también esta designada como un área para la gestión, administración, comercio, servicios generales y vivienda (Sector de planeamiento del Centro Histórico). El tercer punto de muestreo se encontraba ubicado en la Av. Ricardo Duran que es un área designada para la ubicación de viviendas (Sector de planeamiento O22-B). La recolección de las muestras en cada punto del estudio se llevó a cabo en dos fases (épocas) del año distintas durante un periodo de 60 días cada uno. Luego de recolectar las muestras, el grupo de la Universidad de Cuenca analizó la composición química del  $PM_{10}$  y su concentración.

Para evaluar el efecto genotóxico de las partículas, nuestro grupo de trabajo perteneciente a la sección departamental de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica particular de Loja empleo la línea celular A-549 (adenocarcinoma de pulmón) para exponerla al material particulado recolectado en los distintos puntos a 3 distintas concentraciones ( $0.82 \text{ m}^3/\text{mL}$ ,  $1.25 \text{ m}^3/\text{mL}$  y  $1.63 \text{ m}^3/\text{mL}$ ), luego evaluamos los daños producidos en la molécula de ADN mediante el ensayo del cometa también llamado electroforesis de células individuales (SCGE, siglas en ingles). El ensayo es una técnica rápida, sencilla y económica que permite detectar daños la cadena de ADN como roturas de doble y simple cadena, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos y daño oxidativo e a partir de la migración de las

moléculas de ADN previamente depositado en placas con agarosa mediante electroforesis (Moller, 2006).

La evaluación de la actividad genotóxica del PM por el ensayo cometa nos permite caracterizar la calidad del aire en zonas urbanas e industriales de manera rápida y nos ofrece información sobre los posibles riesgos sobre la salud. Existen algunas limitaciones en este tipo de estudios *in vitro*, ya que debido a su simplicidad no se toma en cuenta muchos factores que cambian la manera en que el ADN reacciona frente al PM<sub>10</sub> en los organismos (Nemmar et al., 2013). A pesar de estos inconvenientes los datos son muy útiles para dar una visión general del efecto del PM<sub>10</sub> y para brindar información con el fin de crear procedimientos y metodologías bien estandarizadas lo que puede abrir a largo plazo el camino para una mejor regulación de la contaminación del aire por parte de los organismos responsables.

En el presente documento de tesis se presenta los resultados del estudio realizado para evaluar el efecto genotóxico del PM<sub>10</sub> recolectado en la ciudad de Cuenca. El documento está dividido en 6 capítulos, en el primero capítulo encontramos el marco teórico en donde se introduce al lector en temas como la contaminación ambiental; naturaleza física y química del material particulado aerotransportado y su clasificación; efectos nocivos del PM<sub>10</sub> sobre la salud con un enfoque especial a los problemas relacionados con el daño al ADN; mecanismos por los que el PM<sub>10</sub> produce daños en el ADN; la forma en la que el ensayo cometa mide el daño en el ADN; un resumen de la metodología usado por el personal del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca . En el segundo capítulo se presenta la metodología usada, aquí se describe las condiciones a las que fueron cultivadas las células A-549 y se describe los protocolos para los ensayo de genotoxicidad y viabilidad. En el tercer capítulo se exponen los resultados y en el cuarto capítulo se presenta discusión. Luego tenemos la bibliografía según las normas APA y al final encontramos los anexos

## MARCO TEORICO

## 1.1. Contaminación atmosférica

Los episodios de contaminación del aire ocurrido en Bélgica en 1930, Pensilvania en 1948 y Londres en 1952 pusieron en evidencia la relación que existe entre la contaminación del aire y la salud humana, desde entonces se ha estudiado los efectos y mecanismos implicados. Los contaminantes son definidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE.UU como cualquier sustancia que a cierta concentración podría perjudicar negativamente a seres humanos, animales, vegetación o a los materiales de construcción (EPA, 2014). Los contaminantes del aire forman una mezcla heterogénea de sólidos, líquidos y gases que pueden incluir a cualquier compuesto de origen natural o de origen antropogénico. (OMS, 2000) (EPA, 2014).

Los distintos contaminantes se pueden clasificar como: partículas en suspensión (sólidos y líquidos), contaminantes gaseosos (gases y vapores) y olores. Los contaminantes gaseosos incluyen compuestos de azufre ( $[\text{SO}_2]$ ,  $[\text{SO}_3]$ , etc.), monóxido de carbono  $[\text{CO}]$ , compuestos de nitrógeno ( $[\text{NO}]$ ,  $[\text{NO}_2]$ ,  $[\text{NH}_3]$ , etc.), compuestos orgánicos ( $[\text{COV}]$ ,  $[\text{HAP}]$ , etc.), compuestos halogénicos (HF, HCl, etc.). Los olores están formado por diversas sustancias químicas percibidos por el ser humano como los mercaptanos así como otros compuestos que son difíciles de definir químicamente (OMS, 2000).

Los contaminantes del aire en ciudades se clasifican como contaminantes del aire en exteriores y contaminantes del aire en interiores debido a que existe una diferencia importante entre la composición y nivel de concentración de los distintos contaminantes. Varios compuestos del aire en exteriores proviene de fuentes del medio ambiente circundante y emisiones antropogénicas principalmente de actividades como transporte, generación de energía, actividad industrial, calefacción doméstica (Rinne & Kaufman, 2012), mientras la contaminación del aire en interiores está ligada a aerosoles para limpieza, humo del tabaco, solventes, pegamentos, pinturas, la combustión de biomasa para cocinar y calentar los hogares (Colbeck & Nasir, 2010).

En la actualidad la contaminación en las ciudades de países en vías de desarrollo pueden tener niveles más altos que en los países desarrollados, principalmente porque las poblaciones de las ciudades de Asia, África y América Latina se encuentran en una rápida expansión y no poseen controles de calidad del aire como el de los países desarrollados. Con frecuencia las ciudades de los países en vías de

desarrollo exceden las concentraciones de los contaminantes del aire recomendados internacionalmente (OMS, 2006).

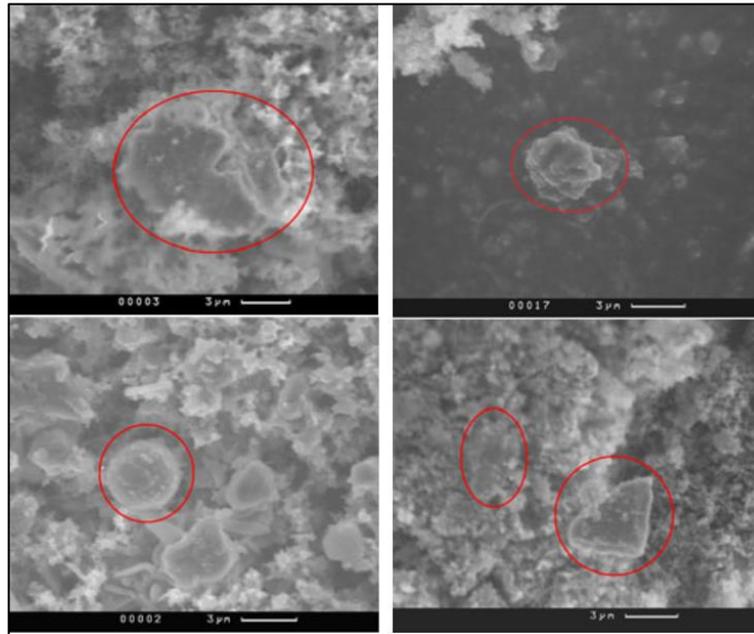
La exposición a diversos contaminantes atmosféricos ha sido relacionado con algunas enfermedades, observándose que producen o agravan principalmente enfermedades cardiacas y de las vías respiratorias(Hoeijmakers, 2009; Rinne & Kaufman, 2012). El grupo de trabajo de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó a la mezcla de los contaminantes del aire en exteriores y al material particulado del aire en exteriores como carcinógeno del Grupo I para los humanos. Los datos que apoyan esta designación provienen de estudios epidemiológicos, estudios de experimentación con animales y por la observación de la presencia de mecanismos de carcinogénesis. (Loomis et al., 2014).

La contaminación del aire representa uno de los mayores riesgos sanitarios del mundo, según estimaciones de la OMS en el 2012 la contaminación del aire exterior provoco unos siete millones de defunciones prematuras. Se estima que un 80% de las defunciones prematuras relacionadas con la contaminación del aire en exteriores se deben a cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular, mientras que un 14% se deben a neumopatía obstructiva crónica o infección aguda de las vías respiratorias inferiores y un 6% a cáncer de pulmón. (OMS, 2014)

Algunas investigaciones epidemiológicas de cohorte señalan que los mayores problemas sobre la salud que se le atribuyen a los contaminantes del aire, son causados en gran medida a la presencia del material particulado. Los efectos del PM sobre la salud encontrados se apoyan en experimentos toxicológicos, análisis epidemiológicos de exposiciones agudas y estudios de exposición controlada.(Brauer et al., 2012).

## **1.2. Material particulado (PM) suspendido en el aire.**

El material particulado (PM, siglas en inglés), denominado también como partículas totales en suspensión (PTS), es una mezcla compleja de diminutas partículas individuales, sólidas y líquidas que poseen un tamaño, morfología, densidad, naturaleza y composición química heterogénea (Cambra et al., 2010) (Fig.1).



**Figura 1.** Microfotografía de partículas del PM con características físicas distintas  
**Fuente:** Modificado de Chung et al., 2012

Una clasificación del PM realizada en la norma ISO 7708 (ISO, 1995) se basa en la observación de que las partículas más pequeñas tienen la capacidad de penetrar y depositarse más profundamente en el tracto respiratorio, provocando los efectos más nocivos sobre la salud. Según esta norma el PM se clasifica como: partículas inhalables (partículas que se pueden inhalar por la nariz y la boca), partículas torácicas (partículas inhaladas que penetran en la laringe), partículas respirables de alto riesgo (partículas que pueden ir más allá de la laringe y penetrar en el sistema respiratorio no ciliadas).

Otra clasificación realizada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos en 1987 denominó al material particulado con un diámetro aerodinámico equivalente menor a  $10\ \mu\text{m}$  como  $\text{PM}_{10}$ . Este parámetro se utiliza para el control de la calidad del aire, principalmente porque se observó que las partículas son responsables de los efectos más adversos en la salud. El  $\text{PM}_{10}$  se clasificó también en una fracción gruesa (AED comprendido entre  $2.5$  y  $10\ \mu\text{m}$ ) y fracción fina o  $\text{PM}_{2.5}$  (AED  $\leq 2.5\ \mu\text{m}$ ). Una clasificación más detallada identifica también a las partículas ultra finas (AED  $\leq 1\ \mu\text{m}$ ) (EPA, 2014). La fracción torácica definido por la ISO 7708 (ISO, 1995) es comparable con la fracción gruesa del  $\text{PM}_{10}$  y la fracción de partículas respirables de alto riesgo es comparable con el  $\text{PM}_{2.5}$  (Cambra et al., 2010).

El diámetro aerodinámico equivalente (AED, siglas en inglés) indica el diámetro que posee una partícula esférica con una densidad de  $1\text{g/cm}^3$  (ISO, 1995). El AED une las características de tamaño, forma y densidad de las partículas en un solo parámetro, asumiendo por conveniencia y convención que las partículas son esféricas a pesar de que muy pocas lo son realmente (Cambra et al., 2010). Se ha observado que generalmente las partículas con elementos metálicos poseen formas más regulares y los materiales orgánicos poseen estructuras más amorfas. (Chung et al., 2008).

La fracción gruesa en su mayoría está compuesta por productos químicos que son ricos en aluminio (Al) y silicio (Si), sodio (Na) y cloruro (Cl) (Mazzei et al., 2008), Además contiene productos ricos en carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), y azufre (S), además de toxinas, polen, esporas y restos de plantas y animales (Cambra et al., 2010; McMurry, 2000). Por otro lado las partículas de la fracción fina ( $\text{PM}_{2.5}$ ) son generalmente ricas en sulfatos ( $\text{SO}_4$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ) y compuestos orgánicos volátiles (COV) (OMS, 2005).

Las partículas finas, a excepción del carbono y algunos compuestos orgánicos, son muy solubles en agua y son higroscópicas (es decir, las partículas finas absorben y retienen agua muy fácilmente), en cambio las partículas gruesas suelen diluirse en disolventes orgánicos. Las partículas finas tiene un grado de pH ácido, excepto bajo condiciones de niebla, debido a que contienen casi todos los ácidos fuertes. (Chung et al., 2012).

La fracción fina y la gruesa suelen comportarse de manera distinta en la atmosfera de las zonas urbanas. Las partículas suelen permanecer suspendidas en el aire por distintos periodos de tiempo lo que afecta el tiempo de exposición de las personas a los contaminantes, influyendo en la promoción de los mecanismos biológicos que se activan y producen los efectos adversos sobre la salud. (Nemmar et al., 2013). La fracción gruesa se elimina más rápido del aire porque suele tener mayores velocidades de asentamiento que las partículas de la fracción fina, debido a que por su peso y el tamaño las partículas se ven más influenciadas por la gravedad y otros procesos de inercia. Suelen permanecer en la atmosfera durante algunos minutos u horas (Cambra et al., 2010). Las partículas finas también se ven influenciadas por la gravedad pero se eliminan de la atmosfera con una menor rapidez, permaneciendo durante días o semanas, los contaminantes de la fracción fina pueden dispersarse de maneras más homogéneas en la atmosfera. El tiempo que los contaminantes permanecen en la atmosfera en las zonas urbanas varía también por otros factores

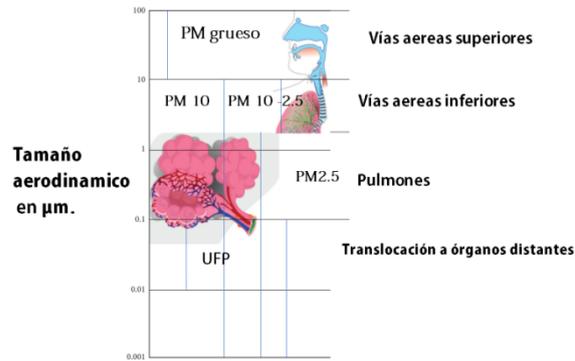
como la temporada geografía, la meteorología, las fuentes específicas de PM de cada lugar (OMS 2005).

Los efectos biológicos negativos que producen el PM se deben principalmente al tamaño que poseen las partículas y su composición química (Schwarze et al., 2007). Los mecanismos biológicos detrás de estas asociaciones no se entienden completamente, pero los resultados de la investigación toxicológica *in vitro* han demostrado que el PM induce varios tipos de efectos celulares adversos, incluyendo la citotoxicidad, mutagenicidad, daño en el ADN y la estimulación de la producción de citoquinas proinflamatorias (de Kok et al., 2006).

### **1.3. Ingreso del material particulado al cuerpo humano.**

La exposición por largos periodos de tiempo al material particulado (PM) suspendido en el aire ha sido correlacionado con un aumento de probabilidades de sufrir enfermedades respiratorias, cardiopulmonares y cáncer de pulmón (Pope et al., 2002).

La principal vía de ingreso del PM al organismo es a través del sistema respiratorio, la capacidad de ingresar está determinado por el diámetro aerodinámico equivalente (AED). La mayor parte de la partículas más gruesas se quedan en las vías aéreas superiores que actúan como una primera línea de defensa (Nemmar et al., 2013). Generalmente el PM<sub>10</sub> avanza a las vías aéreas inferiores (Fig. 2), en este punto el cuerpo activa la segunda línea de defensa que es la fagocitosis por macrófagos alveolares, neutrófilos y ocasionalmente eosinófilos. Una tercera línea de defensa está formada por la respuesta inmune mediada por células y la humoral específica. Las vías respiratorias cuentan también con defensa mecánicas como el estornudo, la tos, y la depuración mucosilar. Además todas las vías respiratorias se encuentran recubiertas por una capa de células epiteliales que protegen las diferentes estructuras. (Gutiérrez, 2011). Existe una gran probabilidad de que el PM<sub>2.5</sub> alcance los alveolos donde es más difícil que se puedan eliminar y en donde se producen mayores daños (Nemmar et al., 2013).



**Figura 2.** Tamaño del PM y su capacidad de alcanzar diferentes tejidos  
**Fuente:** Modificado de Nemmar *et al.*, 2013

Cuando el PM ha logrado evadir los mecanismos de defensa se distribuye en las células y/o tejidos del pulmón, donde pueden ser transformado y activados metabólicamente para producir diversos efectos biológicos.

Las características físicas y químicas son muy importantes para determinar la toxicidad de las partículas del PM en células de pulmón. Pero no existe un consenso general cuál de estas características produce los efectos biológicos tóxicos más importantes. Algunas investigaciones muestran que el área de superficie puede determinar el potencial de las partículas para provocar efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* (Brown, 2001; Hamoir, 2003), las partículas más pequeñas por lo general muestran la mayor toxicidad porque poseen una mayor superficie de contacto con las estructuras celulares y de ese modo se pueden liberar una mayor cantidad de moléculas.

La composición química ha demostrado ser también un factor importante que contribuye al efecto tóxico del PM. Varios grupos de investigadores han encontrado que al comparar los efectos biológicos que producen diferentes partículas de similar tamaño, varía enormemente los resultados debido a que poseen una composición química diferente. (Schwarze *et al.*, 2007). Algunos autores han llegado considerar que la composición química tiene un mayor peso en la toxicidad de las partículas que el tamaño (Schwart *et al.*, 2007).

Estudios realizados con líneas celulares de pulmón como las A-549 (adenocarcinoma de pulmón) y macrófagos alveolares muestran que las partículas del PM<sub>10</sub> producen inflamación, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) y citotoxicidad. (Hetland *et al.*, 2000; Kleinman *et al.*, 2003). Las especies reactivas de

oxígenos (ROS) y la inflamación pueden generar daños en el material genético de las células expuestas (Schwarze et al., 2007).

#### **1.4. Genotoxicidad del material particulado.**

EL ADN es una macromolécula biológica extraordinariamente estable, debido en gran medida a su eficiente mecanismo de reparación. A pesar de su estabilidad existe la posibilidad de que se produzcan cambios químicos o cambios en la secuencia de nucleótidos, muchos de estos cambios ocurren durante la replicación, recombinación e incluso durante la reparación.

La inestabilidad de los compuestos químicos que forman la cadena de ADN y los nucleótidos en condiciones de temperatura y de pH determinadas producen reacciones de hidrólisis espontáneas que crean sitios abásicos. (Nemmar et al., 2013). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno producidas en el metabolismo celular también provocan diversas mutaciones, entre las más importantes se encuentran las roturas de cadena simple (SSB) y roturas de cadena doble (SDB). Algunos agentes químicos y físicos externos producen daños en el ADN ya sea por una interacción directa o porque producen algún efecto intermedio. La capacidad de estos agentes físicos o químicos externo de producir daño en el material genético o sobre cualquier estructura relacionada se denomina actividad genotóxica.

Muchos compuestos que interaccionan con el ADN produciendo daños en la cadena de ADN se encuentran presentes en la atmosfera como contaminantes, entre ellos se encuentra el PM<sub>10</sub>. Una amplia gama de estudios realizados *in vitro* en cultivos celulares han demostrado que el PM<sub>10</sub> recolectado en varias ciudades posee una actividad genotóxica y mutagénica. (Elassouli et al., 2007; Gutierrez et al., 2006; Jung et al., 2012; Lepers et al., 2014).

##### **1.4.1. Mecanismos por los que el PM podría ocasionar daños en el ADN**

Los mecanismos por los que el PM<sub>10</sub> induce genotoxicidad no son claros, pero se ha mencionado que el estrés oxidativo podría ser uno de los de los principales mecanismos implicados. (Jung et al., 2012; Oberdörster et al., 2005). Las ROS son moléculas electrofílicas altamente reactivas que cuando llegan al núcleo de la célula interactúan con los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas del ADN produciendo daño oxidativo (Moller & Loft, 2010). Pueden ocasionar daños en el ADN incluyendo las roturas de cadena. Los mecanismo por los que las ROS

produce roturas de cadena en el ADN incluyen la adición de OH en las uniones C=C y modificaciones químicas de las bases o el azúcar. (Mordechai, 1988).

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Dentro de los compuestos que forman el grupo de las especies reactivas de oxígeno se incluye los radicales libres; iones de oxígeno como (O<sup>2-</sup>), hidróxidos (OH.), peróxidos (RO<sub>2</sub>.) e hidroperóxidos (HO<sub>2</sub>.); algunos compuestos que fácilmente pueden convertirse en radicales como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el ácido hipoclorito (HOCl) y el ozono (O<sub>3</sub>) Entre los ROS encontramos también iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos.

Los metales de transición, tales como cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), vanadio (V) y titanio (Ti), los HAP y los aniones presentes en el PM contribuyen a la capacidad del PM de producir ROS y por lo tanto también en la capacidad para inducir daño en el ADN de las células de pulmón. (de Kok et al., 2006). Un ejemplo es el hierro que cataliza la formación de ROS a partir del superóxido y del hidrógeno (reacción de Fenton, reacción de Haber-Weiss) (Jackson, 2002).

El PM también se puede producir genotoxicidad de manera directa, es decir sin que se haya formado especies reactivas de oxígeno (ROS) previamente. Los compuestos que interaccionan directamente con el ADN podrían estar ocasionando cambios en la molécula de ADN , entre ellos la formación de aductos (de Kok et al., 2006).

La actividad genotóxica de material particulado en los pulmones puede ocasionar diversas mutaciones, este es un paso crucial en la carcinogénesis, y niveles elevados de lesiones oxidativas del ADN se han observado en muchos tumores, implicando fuertemente tales daños en la etiología del cáncer (Cooke et al., 2003).

#### **1.4.2. Roturas de cadena**

Las rupturas de cadena (RC) se producen por escisión del enlace fosfodiéster. Las fuentes fisiológicas de roturas de cadena del ADN endógenas incluyen la replicación y la recombinación meiótica (Aparicio, Baer, & Gautier, 2014). Las roturas ocurren también por la acción de agentes exógenos como la radiación ionizante o químicos radiomiméticos, que imitan el efecto de la radiación ionizante en el ADN.

Se pueden producir dos tipos de rupturas en el ADN, estas son rupturas de cadena simple (SSB) y rupturas de cadena doble (DBS). Las SSBs son discontinuidades en

una de las cadenas de la doble hélice del ADN, si no se reparan apropiadamente representan una seria amenaza para la estabilidad genética y la supervivencia celular. En consecuencia, las células han desarrollado mecanismos rápidos y eficientes para su reparación. (Caldecott, 2008).

Las roturas de doble cadena (DSB) se producen cuando se rompen las dos cadenas del esqueleto de azúcar fosfato del ADN en la misma posición o en un lugar lo suficientemente próximo para que se produzca la separación física de las cadenas de ADN. (Aparicio et al., 2014). A diferencia de las roturas de cadena simple (SSB) las roturas de cadena doble (DSB) no cuentan con una cadena complementaria para copiar la información y repara la cadena de ADN, por lo que es más problemático para la célula reparar las lesiones. Además las DSBs puede producir pérdida o reordenamiento de los cromosomas.(Aparicio et al., 2014). En las células, la mala reparación de las roturas de doble cadena está implicada en una variedad de patologías humanas (Aparicio et al., 2014).

### **1.5. Estudios desarrollados para evaluar la toxicidad del PM<sub>10</sub>**

Los estudios acerca de los efectos que produce el PM<sub>10</sub> están enfocados en determinar el daño que producen y en descubrir los mecanismos que intervienen. Generalmente los estudios empiezan por la caracterización de las partículas (físicas y químicas) y luego se investiga los efectos sobre la salud y los mecanismos que intervienen mediante estudios *in vivo* e *in vitro* (Oberdörster et al., 2005). Los estudios *in vivo* nos ofrece la oportunidad de evaluar los efectos en conjunto pero requieren de un mayor tiempo así como de mayor presupuesto y equipo. Las pruebas *in vitro* nos permiten evaluar rápidamente los daños que producen, los niveles de toxicidad efectivos y pueden proporcionar ideas y confirmaciones del mecanismo de los efectos *in vivo* importantes pero no nos muestra el efecto real que se produce en los organismos debido a que no intervienen todos los factores que podrían cambiar el resultado en los organismos vivos. Es por esto que debemos tener cuidado al interpretar los datos obtenidos de ensayos *in vitro* (Oberdörster et al., 2005).

Una herramienta utilizada para evaluar las alteraciones tempranas que produce el PM<sub>10</sub> es la utilización de diversos biomarcadores, los cuales se definen como los cambios físicos, químicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como un indicador de un agente tóxico. Nos permiten evaluar y estimar los efectos a corto plazo que produce el PM<sub>10</sub> al entrar en contacto con el organismo (Oberdörster et al., 2005)..

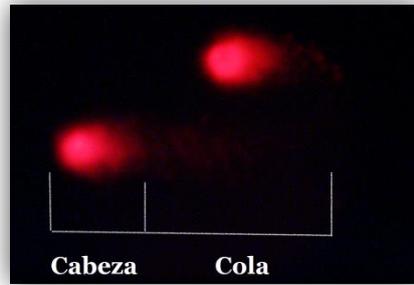
Para estudiar la genotoxicidad del  $PM_{10}$  es muy utilizado el biomarcador llamado ensayo del cometa, debido a las ventajas que ofrece sobre otros ensayos del mismo tipo. En los estudios realizados con el ensayo cometa se suele utilizar diferentes vehículos para disolver las partículas y poder aplicarlos sobre los cultivos. Las partículas se pueden disolver en agua (fracción acuosolubles) y otros en disolventes orgánicos (fracción orgánica) (Nemmar et al., 2013).

#### **1.5.1. Ensayo cometa.**

Fue desarrollado por Ostling y Johanson como un método para detectar los niveles de daño del ADN. En su técnica, las células embebidas en agarosa se colocan en un portaobjetos de microscopio para luego lisar las membranas con un tratamiento de sales y detergentes. Si el ADN posee roturas de doble cadena la hélice superenrollada de ADN se relaja y los extremos rotos migran hacia el ánodo durante una breve electroforesis. Si no existen roturas de cadena, la falta de extremos libres y el gran tamaño del ADN impiden que exista la migración (Ostling & Johanson, 1984).

Posteriormente al desarrollo de la primera técnica se introdujo una modificación importante en la técnica, la electroforesis se empezó a realizar bajo condiciones alcalinas ( $pH > 13$ ), ya que en la técnica de Ostling & Johanson se usaba un buffer de electroforesis con un pH neutro. El pH alcalino optimiza la desnaturalización del ADN ya que el ADN se desenrolla a valores de pH superiores a 12,0 (Kohn, 1991). De este modo se puede detectar además de las roturas de doble cadena (DSB) del ADN, roturas de cadena simple (SSB) y sitios álcali lábiles (ALS) (Singh et al, 1988). Esta versión del ensayo ofrece un aumento en la sensibilidad y debido a que los agentes genotóxicos producen una mayor cantidad de SSB y ALS que DSB es más útil para determinar la genotoxicidad del compuesto (Tice et al., 2000).

Después de la electroforesis se tiñe el ADN y se puede observar que el ADN adopta la forma de un cometa (Fig.3). La cabeza posee un alto peso molecular y la cola contiene los principales fragmentos que migraron (Olive & Banáth, 2006). La cantidad relativa de ADN que migra (cola) proporciona una forma sencilla de estimar el número de roturas en el ADN que posee una célula. (Olive & Banáth, 2006). Las células con una mayor frecuencia de roturas de doble cadena (DSB) muestran una mayor migración del ADN hacia el ánodo.



**Figura 3:** Visualización de los cometas en el microscopio, 400x.

**Fuente:** Gutiérrez, I. (2014)

### **1.6. Recolección de muestras del $PM_{10}$ en la ciudad de Cuenca.**

Cuenca es la tercera ciudad más grande e importante del Ecuador, cuenta con una población de 505.585 habitantes, según el último censo realizado en el 2010 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). El parque automotriz es de 101.128 vehículos y cuenta con 145 industrias, la mayoría dentro el parque industrial.

La ciudad de Cuenca ofrece varias oportunidades de empleo para la población en general por lo que el crecimiento demográfico ha aumentado mucho más rápido de lo planificado, conjuntamente la contaminación del aire se ha incrementado. Dentro de los contaminantes que son estudiados en el monitoreo de la calidad del aire por sus efectos nocivos sobre la salud, se encuentra el material particulado ( $PM_{10}$ ). Un informe emitido en el 2010 por la empresa municipal EMOP-EP informa que Cuenca libera a la atmosfera un total de 1099 toneladas al año de material particulado ( $PM_{10}$ ).

En el 2006 en una investigación realizada por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca denominado "Determinación de la concentración de material particulado en diferentes zonas de la ciudad de Cuenca" en el que se monitoreo el  $PM_{10}$  en tres puntos de la ciudad se encontró que el 80 % de los sitios estudiado registraron niveles de concentración máxima superiores a los límites establecidos en la Normativa Ecuatoriana para la calidad del Aire Ambiente, Libro VI.

Tomando como antecedente la investigación desarrollada en el 2006 se realizó la presente investigación que fue desarrollada gracias a un convenio de colaboración firmado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca y la Universidad Técnica Particular de Loja. Los objetivos de ambas instituciones en la presente investigación era el de monitorear el aire de la ciudad de Cuenca utilizando como parámetro el material particulado ( $PM_{10}$ ) aerotransportado, para poder determinar su composición química y el posible daño genotóxico que podría estarse produciendo en la población expuesta.

El centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca se encargó de recolectar las muestras del material particulado y de analizar la composición química y su concentración. Las muestras se recolectaron en tres puntos de la ciudad y en dos fases (épocas) distintas (Tabla 1) durante 60 días cada una. Los puntos fueron elegidos gracias a las conclusiones obtenidas del estudio previo realizado en el 2006. La recolección se realizó de lunes a viernes en un periodo comprendido de 09:00 horas a 15:00 horas, considerando el incremento del movimiento vehicular y la actividad humana. (Astudillo, 2014).

**Tabla 1.** Puntos de muestreo del PM<sub>10</sub> con las fechas de las dos fases de recolección

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

**Fuente: Astudillo, 2014**

Para recolectar las muestras de PM<sub>10</sub> utilizaron un equipo de bajo volumen (Low Vol de F y J modelo LV-2), con un flujo constante de 100l/min, para filtrar 6m<sup>3</sup> de aire por hora. Los filtros que usaron fueron de membrana de éster celulosa con diámetro de poro de 0,8 micras.

La fracción acuosoluble del material particulado se extrajo lavando los filtros con agua desionizada (ultra pura Milli Q), las soluciones preparadas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C para el posterior análisis de genotoxicidad. Los resultados de la caracterización del PM<sub>10</sub> de la ciudad de Cuenca se puede observar en el anexo 1.

## **Objetivos**

### **Objetivo general.**

Determinar el efecto genotóxico del material particulado recolectado en el aire de la ciudad de Cuenca sobre la línea celular A-549.

### **Objetivos específicos.**

Determinar la viabilidad de los cultivos de la línea celular A-549 luego de ser expuestos durante 24 horas a distintas concentraciones del material particulado ( $PM_{10}$ ), para establecer las dosis subtóxicas a las que se probará la genotoxicidad.

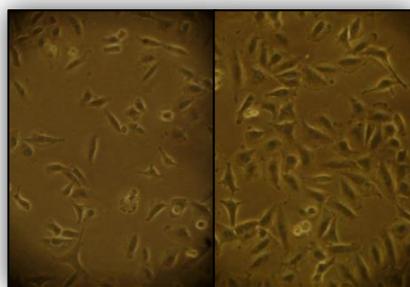
Determinar la genotoxicidad que producen las distintas concentraciones del material particulado ( $PM_{10}$ ) sobre la línea celular A-549 mediante el ensayo del cometa.

## **MATERIALES Y METODOS.**

## 2.1. Modelo Biológico

### 2.1.1. Condiciones de cultivo

Se usó la línea celular epitelial A-549 derivada del adenocarcinoma humano para exponerla al  $PM_{10}$  recolectado en la ciudad de Cuenca. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin (GIBCO), 2mM de L-Glutamina (GIBCO), Bicarbonato de sodio al 0.2 % (MERCK) y 10% de suero fetal bovino (GIBCO). Las células fueron incubadas a una temperatura de 37° C en una atmosfera con 5% de  $CO_2$ .



**Figura 4.** Células epiteliales A-549 en una caja de cultivo.

**Fuente:** Gutiérrez, 2014.

### 2.1.2. Controles

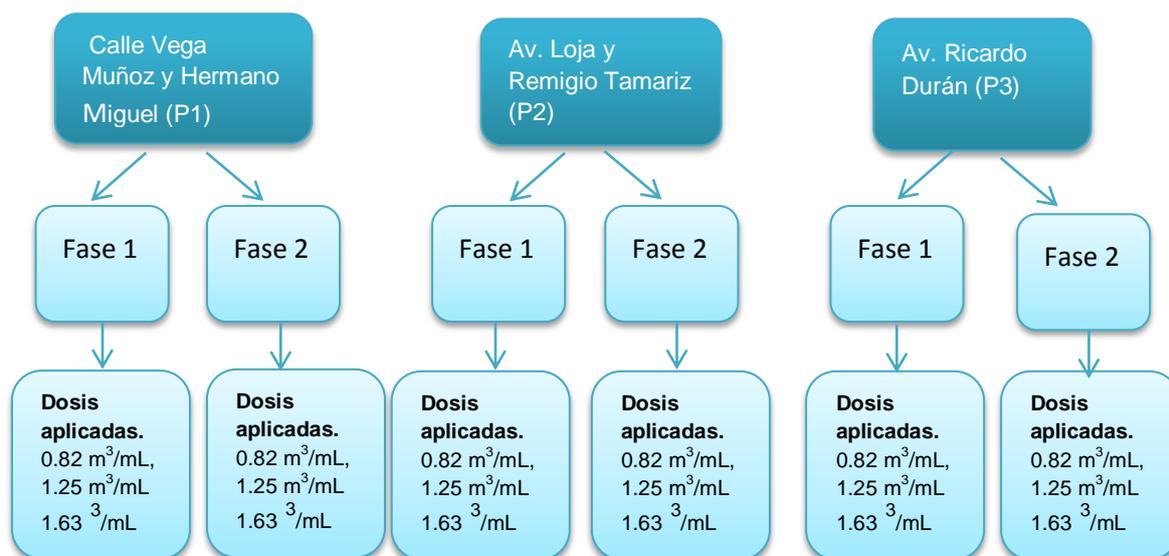
Como control positivo se usó etilmetanosulfonato (EMS) a una concentración de 2 $\mu\text{M}$ , se sabe que el compuesto reacciona con los grupos nucleófilicos del ADN donando un grupo etilo, estas alteraciones se transforman en roturas de cadena al exponerlos a un tratamiento con hidróxido de sodio.

Se usaron dos controles negativos, en primer lugar se utilizó el agua destilada usada para disolver el  $PM_{10}$  de los filtros, para asegurarnos que el vehículo (agua destilada) no cause algún efecto sobre el ensayo. El cultivo de las células sin ningún tratamiento se usó como segundo control negativo

### 2.1.3. Siembra y cosecha de la línea celular.

Las células fueron sembradas en cajas multiplatos de 6 pocillos, luego de ser removidas con 1 mL de tripsina a partir de cultivos que se encontraban en fase log. Las células fueron incubadas por 24 horas. Luego cambiamos de medio a los cultivos y aplicamos la fracción acuosoluble del  $PM_{10}$  a tres distintas concentraciones (0.82  $\text{m}^3/\text{mL}$ , 1.25  $\text{m}^3/\text{mL}$  y 1.63  $\text{m}^3/\text{mL}$ ) (Fig. 6), las células fueron incubadas por 24 horas más.

Para cosechar las células tratadas con el PM<sub>10</sub>, disgregamos las células y las pasamos tubos cónico de 15 mL junto con su medio de cultivo. Los tubos fueron centrifugados por 5 minutos a 500 x g, luego desechamos el medio y resuspendimos el pellet obtenido con 1 mL de medio RPMI-1600, pasamos la nueva resuspensión a tubos cónicos de 1.5 mL y centrifugamos por 2 minutos a 10000 rpm, eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet con 40 µL de medio RPMI-1600 suplementado.



**Figura 5.** Esquema de los tratamientos de PM<sub>10</sub> aplicados a los cultivos celulares.  
**Fuente:** Gutiérrez, I. (2014).

#### 2.1.4. Viabilidad mediante el ensayo de doble tinción de FDA-EtBr

Para poder determinar el porcentaje de viabilidad de los ensayos tomamos 20 uL de la resuspensión obtenida en la cosecha y mezclamos con 20 uL de solución de Diacetato de Fluoresceína – Bromuro de Etidio (FDA 5mg/ml; EtBr 1 mg/5mL). Colocamos la suspensión de cada tubo en placas portaobjetos, por duplicado. Las células teñidas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (ZEISS- Axioskop 2 plus) y se contabilizó 200 células por placa (400 células por cada punto de muestreo). La tinción de una célula de color rojo (bromuro de etidio) nos indica que ha sufrido una pérdida irreversible en integridad de la membrana y se asumen que están muertas. Las células teñidas de color verde (FDA) son tomadas como células vivas. A partir de la cantidad de células vivas y muertas se saca el porcentaje de viabilidad.

#### 2.1.5. Ensayo cometa.

Antes de realizar el ensayo preparamos las placas portaobjetos con 150 µL de agarosa de normal punto de fusión (Invitrogen) al 1%.

A partir de la suspensión obtenida en la cosecha tomamos 20 uL y mezclamos con 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 1%, la nueva suspensión la vertimos en 2 diferentes laminillas (75 µL c/u) y las cubrimos inmediatamente con un cubreobjetos. Las placas se llevaron a refrigeración por 5 minutos. Transcurrido este periodo de tiempo y luego de retirar los cubreobjetos colocamos 130 uL de agarosa de bajo punto de fusión y volvemos a colocar los cubreobjetos, luego llevamos las laminillas a refrigeración por 5 minutos adicionales. Al pasar este tiempo retiramos los cubreobjetos y dejamos las laminillas en la solución de lisis (10% de DMSO y 1% de tritón X-100 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris y pH 10) por un tiempo entre 1 hora y 15 días.

Antes de proceder con la electroforesis dejamos reposar las laminillas por 20 minutos en el buffer que contiene 300 mM NaOH y 1mM mM EDTA ajustado a un pH > 13. Transcurrido este tiempo se realizó la electroforesis en condiciones de 25 V, 300 mA y 20 min. (Tice et al. 2000). Posteriormente las laminillas fueron sometidas a un buffer de neutralización ajustado a un pH 7.5 (0,4 M tris) y las deshidratamos con metanol para su posterior análisis.

Los portaobjetos se volvieron a hidratar con agua desionizada fría y se tiñeron con 60 µL de bromuro de Etidio (30 µg/ml). Para evaluar el daño medimos la longitud de cola en µm usando un micrómetro ocular. En un microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con un aumento de 400x se contabilizó un total de 50 cometas por cada laminilla.

#### **2.1.6. Análisis de datos del ensayo cometa.**

Se realizó tres réplicas del ensayo cometa, cada una por duplicado. Se analizó la normalidad de los datos con el test de normalidad Shapiro – Wilk y posteriormente se usó el test no paramétrico de Kruskal – Wallis para compararlo con el control negativo y comparar las dos fases.

Para el análisis estadístico se tomaron los porcentajes de viabilidad de las tres replicas y luego se utilizó la prueba de comparación múltiple ANOVA usando el software estadístico GraphPad Prisma 5.

### Esquema del ensayo cometa.

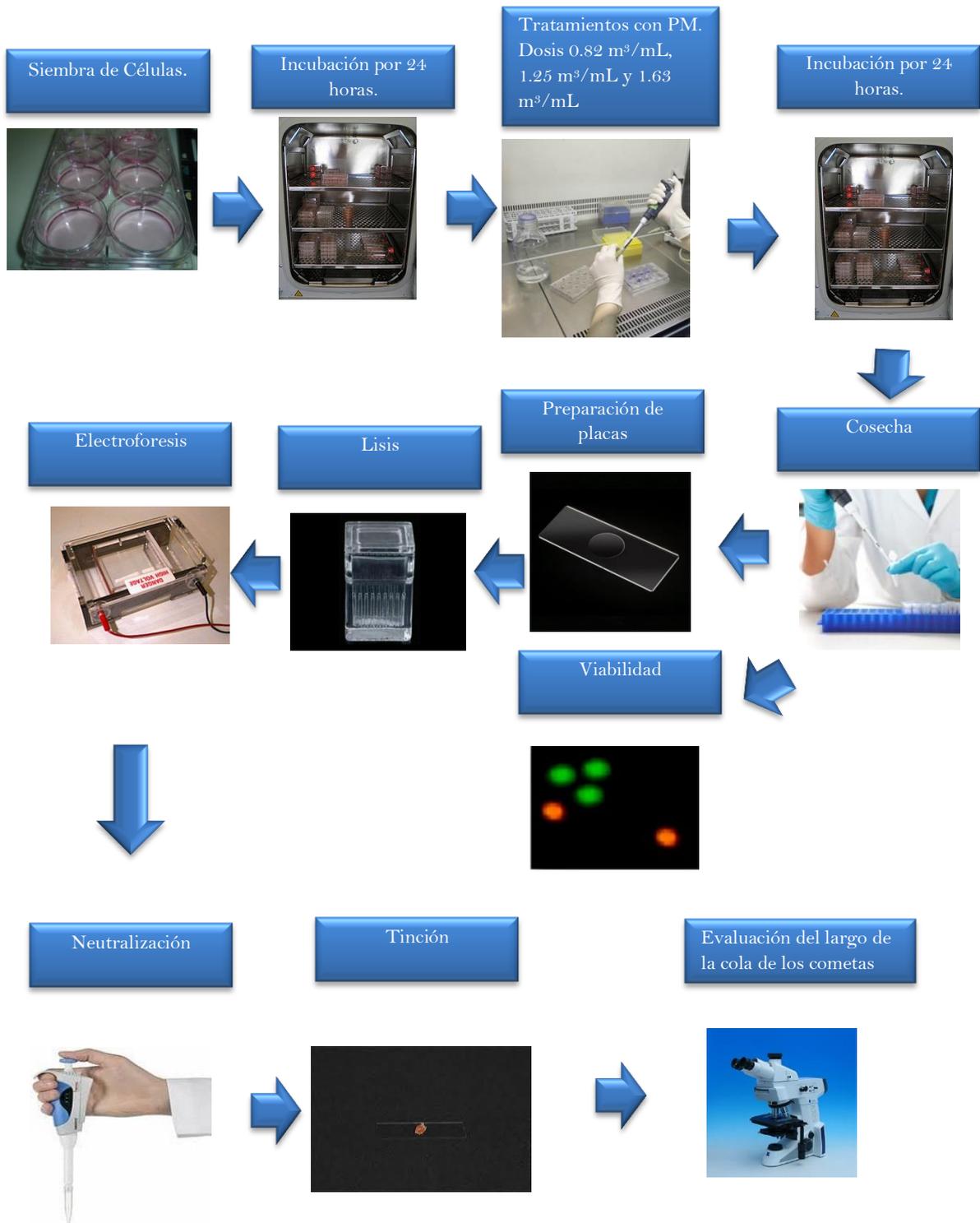


Figura 6. Esquema para realizar el ensayo cometa.

Fuente: Gutiérrez, I. (2014)

## **Resultados**

### 3.2 Viabilidad de las líneas celulares expuestas a PM10 recolectado en la ciudad de Cuenca.

Antes de comenzar con los ensayos de genotoxicidad comprobamos que las dosis de 0.82 m<sup>3</sup>/mL, 1.25 m<sup>3</sup>/mL y 1.63 m<sup>3</sup>/mL eran subtóxicas pues no producían un nivel de viabilidad inferior al 70% en las células. Mantener este porcentaje es importante ya que un índice inferior produce que los valores de genotoxicidad encontrados por el ensayo cometa incrementen por un efecto de las células muertas y no por la genotoxicidad propia del compuesto.

Para asegurarnos que la viabilidad de los ensayos se mantenga por arriba del 70% realizamos un ensayo de doble tinción con FDA- BrEt antes de cada ensayo cometa. Los resultados de los tres ensayos juntos los podemos observar en la tabla 2, aquí podemos observar mantienen un nivel de viabilidad que no disminuye por debajo del 90%.

**Tabla 2. Porcentajes de viabilidad de la línea celular tratados con el PM<sub>10</sub> de los distintos puntos de muestreo a tres distintas concentraciones.**

| Dosis                    | Porcentaje de viabilidad ±Std. Desviación |              |                |               |                |              |
|--------------------------|---|--------------|----------------|---------------|----------------|--------------|
|                          | P1(I etapa)                               | P1(II etapa) | P2(I etapa)    | P2 (II etapa) | P2(I etapa)    | P2(II etapa) |
| <b>C+(EMS)</b>           | 96,35±2,1<br>9                            | 96,35±2,19   | 96,35±2,1<br>9 | 96,35±2,19    | 96,35±2,1<br>9 | 96,35±2,19   |
| <b>C-(solo células)</b>  | 96,86±2,1<br>9                            | 96,86±2,19   | 96,86±2,1<br>9 | 96,86±2,19    | 96,86±2,1<br>9 | 96,86±2,19   |
| <b>C-(filtro Blanco)</b> | 96,63±1,2<br>4                            | 96,63±1,24   | 96,63±1,2<br>4 | 96,63±1,24    | 96,63±1,2<br>4 | 96,63±1,24   |
| <b>0,82m3/ml</b>         | 96,82±1,1<br>5                            | 96,40±1,13   | 97,43±0,6<br>7 | 96,02±1,28    | 96,95±0,9<br>0 | 95,96±1,63   |
| <b>1,25m3/ml</b>         | 93,34±3,1<br>5                            | 97,98±1,63   | 96,75±1,1<br>6 | 95,63±0,89    | 97,02±0,9<br>7 | 98,11±2,24   |
| <b>1,63m3/ml</b>         | 96,79±2,1<br>8                            | 99,35±0,83   | 95,80±1,5<br>7 | 95,59±1,54    | 95,60±1,3<br>0 | 96,81±2,58   |

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

**Fuente: Astudillo, A. (2014)**

### **3.2 Evaluación de la genotoxicidad de las distintas dosis del PM<sub>10</sub> frente al control negativo**

Analizamos el daño ocasionado por el PM<sub>10</sub> en el ADN observado en los cultivos celulares y lo comparamos con el encontrado en el control negativo en el que colocamos las células sin ningún tratamiento, la comparación se la realizó el test de Kruskal- Wallis. Si el daño encontrado en los cultivos expuestos a las partículas es estadísticamente mayor consideramos que el PM<sub>10</sub> produce un efecto genotóxico sobre la línea celular A-549. También evaluamos si existe una relación de dosis respuesta entre las diferentes dosis.

El test de Kruskal-Wallis nos indica que el PM<sub>10</sub> recolectado en el punto 1 (calle Vega Muñoz y Hermano Miguel) durante la fase uno produce un efecto genotóxico sobre la línea celular A-549 en las tres concentraciones. Sin embargo, el test nos indica también que las tres dosis producen un efecto genotóxico similar por lo que no existe una relación de dosis respuesta. En la fase dos se muestra que el PM<sub>10</sub> recolectado no produce un efecto genotóxico a ninguna de las dosis aplicadas ya que en todas se observa el mismo efecto que el control negativo (Figura 1).

En el punto 2 (Av. Loja y Remigio Tamariz) durante la fase 1 todas las dosis producen un efecto genotóxico pero el efecto producido es similar en todas las dosis. En la segunda fase se puede observar un daño genotóxico que se produce a partir de segunda dosis (1.25 m<sup>3</sup>/mL), estas dos dosis son estadísticamente diferentes siendo la segunda dosis la que produce el efecto genotóxico más alto (Figura 1).

En los cultivos celulares de la primera fase del punto 3 (Av. Ricardo Duran) encontramos que todas las dosis aplicadas no producen un efecto genotóxico estadísticamente más alto al observado en el control negativo y tampoco tienen un efecto de dosis respuesta. El PM<sub>10</sub> de la fase 2 produce en cambio un efecto genotóxico mayor en las dosis de 1.25 m<sup>3</sup>/mL y 1.63 m<sup>3</sup>/mL. Según el test estadístico de Kruskal Wallis las tres dosis de PM<sub>10</sub> de la primera fase no estarían produciendo un efecto dosis respuesta pues no se encontró diferencias significativas, mientras que el test nos indica que al comparar las tres dosis de la segunda fase encontramos que existe una tendencia de dosis respuesta (Figura 1).

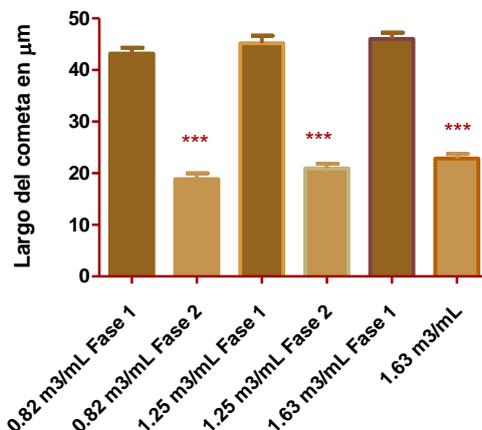
|                                  | Fase 1 | Fase 2 |
|----------------------------------|--------|--------|
| Vega Muñoz y Hermano Miguel (P1) |        |        |
| Av. Loja y Remigio Tamariz (P2)  |        |        |
| Av. Ricardo Durán (P3)           |        |        |

**Grafica 1. Gráfica 3.** Daño genotóxico en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones del PM<sub>10</sub> (0.82, 1.25 y 1.63 m<sup>3</sup>/mL) y comparadas con el control negativo (solo células). Cada barra representa la media ±EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 3.2 Comparación del efecto genotóxico de las dos fases.

#### 3.2.1 Av. Vega Muñoz y Hermano Miguel.

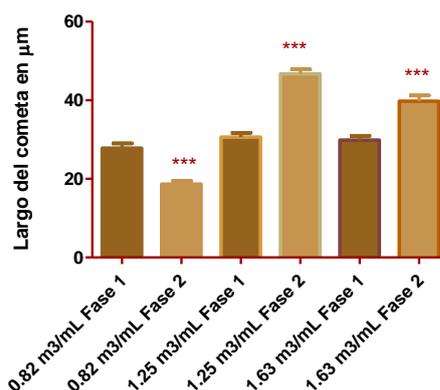
Al comparar las dosis correspondiente de cada fase observamos que existe un mayor daño genotóxico producido en la primera fase.



**Grafica 2.** Comparación de daño genotóxico provocado por el PM<sub>10</sub> de las dos fases recolectado en la Av. Vega Muñoz y Hermano Miguel.

### 3.2.2Av. Loja y Remigio Tamariz.

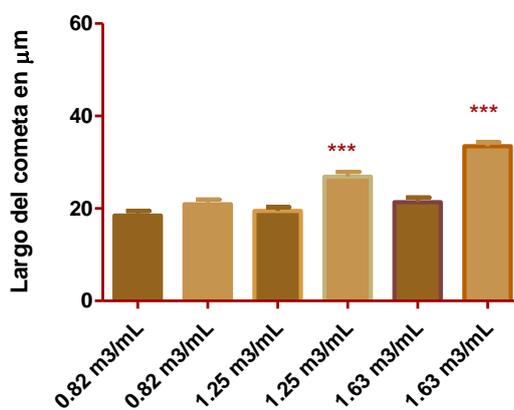
El daño que se produce por el PM<sub>10</sub> de la segunda y tercera dosis es estadísticamente mayor al producido por las mismas dosis por el PM<sub>10</sub> de la primera fase. Sin embargo en la primera dosis se puede apreciar que el mayor daño genotóxico se produce durante la primera fase. Parece ser que el PM<sub>10</sub> recolectado en la segunda fase produce los mayores daños a pesar de que la primera dosis no muestre la misma tendencia.



**Grafica 3.** Comparación de daño genotóxico provocado por el PM<sub>10</sub> de las dos fases recolectado en la Av. Loja y Remigio Tamariz.

### 3.2.3Av. Ricardo Duran.

La tendencia parece indicar que el  $PM_{10}$  de la segunda fase produce los efectos más genotóxicos pues la segunda y tercera dosis muestran un daño genotóxico mayor en la segunda fase, sin embargo en la primera dosis el test de Kruskal- Wallis nos indica que el efecto del  $PM$  en estas dos fases es similar, a pesar de esto la tendencia parece indicar un mayor daño genotóxico en la segunda fase.



**Grafica 4.** Comparación de daño genotóxico provocado por el  $PM_{10}$  de las dos fases recolectado en la Av. Ricardo Duran

## **DISCUSIÓN**

Aunque varios estudios han señalado una relación causal entre la contaminación atmosférica y los efectos adversos para la salud, los mecanismos biológicos que podrían ser responsables de estos efectos son desconocidos. (Pope *et al.*, 2002). El daño que se produce en el ADN por los contaminantes ambientales se piensa es causado principalmente por el estrés oxidativo, que se produce cuando existe un aumento de las especies reactivas de oxígeno producidas por los contaminantes del PM en el organismo es un mecanismo por el cual se producen lesiones. (Jung *et al.*, 2012). Los metales y aniones contenidos en el PM<sub>10</sub> han sido asociados a la formación de especies libres de oxígeno y con la formación de daño sobre la molécula de ADN.

Para medir el daño genotóxico que produce el PM<sub>10</sub> recolectado en la ciudad de Cuenca sobre la línea celular A-549 utilizamos la versión alcalina del ensayo cometa. Con esta técnica podemos medir la formación de roturas de doble y simple cadena y sitios álcali lábil, las cuales son las modificaciones más importantes que se ha observado en el ADN después de la exposición PM<sub>10</sub> (Moller, 2005).

Escogimos la línea celular A-549 debido a que se deriva del epitelio de un pulmón humano y tiene la capacidad de transformar los compuestos en sus formas genotóxicas finales por lo que ha sido ampliamente utilizada para evaluaciones del daño del ADN inducido por contaminantes ambientales (Foster *et al.*, 1998)

Los datos obtenidos en este estudio muestran que la fracción acuosoluble recolectado en la Av. Vega Muñoz y Hermano Miguel (punto 1) durante la primera fase muestra un efecto genotóxico, esto concuerda con la descripción del sitio que se indica que es un lugar con alto tráfico vehicular y se ha encontrado en otros estudios que el tráfico emite compuestos altamente genotóxicos (de Kok *et al.*, 2006). Sin embargo en la segunda fase el PM<sub>10</sub> no parece producir ningún efecto genotóxico, esto puede deberse a la disminución del Cu encontrado en el estudio desarrollado por Astudillo, 2014 (ver anexo 2) El Cu junto con el Fe han demostrado tener un efecto genotóxico luego de ser biológicamente activados por las células. (Mordechai, 1988). No existe un efecto dosis respuesta entre las diferentes dosis aplicadas en la fase 1 y en la fase 2, esto puede deberse a que las dosis aplicadas no producen un aumento notable de la concentración de los compuestos genotóxicos.

Los datos obtenidos en la Av. Loja y Ricardo Tamariz (punto 2) nos muestran que el PM<sub>10</sub> produce un efecto genotóxico en las dos fases, esto concuerda también con la descripción del sitio que ha sido mencionado como un lugar de alto tráfico vehicular.

En la Av. Ricardo Duran (punto 3) el  $PM_{10}$  de la primera fase no produce un efecto genotóxico sin embargo en la segunda fase se puede apreciar el efecto genotóxico y además una respuesta dosis-dependiente, que nos indica que existe una relación causa-efecto entre el nivel de exposición de un tóxico y la magnitud de respuesta de este. Esta respuesta se puede deber a la alta concentración de Fe presente en esta zona (ver anexo 2) (Astudillo, 2014).

En el punto 2 y el punto 3 el mayor daño en el ADN se produce en la segunda fase, esto concuerda con lo encontrado por González, 2014, en este estudio se evaluó la cantidad de ROS producido por las mismas muestras de  $PM_{10}$  recolectado en la ciudad de Cuenca. La cantidad de ROS producida por el  $PM_{10}$  fue más alto en la segunda fase. Sin embargo estos datos estarían en contraposición con lo que se cabría esperar en el punto uno pues aquí el daño genotóxico es mayor durante la primera fase, esto se puede deber a que las diferencias en la cantidad de ROS encontrado no son muy altas y a que la formación de ROS no es la única vía por la que el  $PM_{10}$  produce daño genotóxico en el ADN.

La gran cantidad de moléculas presentes en el  $PM_{10}$  (iones, metales pesados y otros no analizados) producen distintos efectos genotóxicos y debido a que las concentraciones varían entre las muestras es difícil atribuir a algunos pocos compuestos el daño.

## CONCLUSIONES.

- Las dosis de  $0.82 \text{ m}^3/\text{mL}$ ,  $1.25 \text{ m}^3/\text{mL}$  y  $1.63 \text{ m}^3/\text{mL}$  del  $\text{PM}_{10}$  recolectado en la ciudad de Cuenca producen un efecto subtóxico sobre los cultivos celulares, por lo que son óptimos para realizar el ensayo cometa.
- El material particulado recolectado en: la fase 1 de la Av. Vega Muñoz y Hermano Miguel produce un daño genotóxico mientras que el recolectado en la segunda fase no produce dicho efecto. El  $\text{PM}_{10}$  recolectado en las dos fases de la Av. Loja y Ricardo Tamariz produce un efecto genotóxico. El  $\text{PM}_{10}$  recolectado en la fase 2 de la Av. Ricardo Duran producen un efecto genotóxico mientras que el recolectado en la fase 1 no lo produce.

## **RECOMENDACIONES.**

- Se recomienda que también se realice por separado los ensayos con las fracciones gruesa y fina del  $PM_{10}$  para que se pueda observar el daño genotóxico que producen estas fracciones.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

1. Astudillo A. (2014). Estudio de Genotoxicidad del material particulado (PM) de la zona urbana del cantón Cuenca. Tesis previa a la obtención del título de Magister en toxicología industrial y ambiental, Universidad de Cuenca.
2. Aparicio, T., Baer, R., & Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, 19, 169–75. doi:10.1016/j.dnarep.2014.03.014
3. Brauer, M., Amann, M., Burnett, R. T., Cohen, A., Dentener, F., Henderson, S. B., ... Van, R. (2012). Exposure assessment for estimation of the global burden of disease attributable to outdoor air pollution. *Environ Sci Technol*, 46(2), 652–660. doi:10.1021/es2025752.Exposure
4. Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., & Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175(3), 191–9. doi:10.1006/taap.2001.9240
5. Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(8), 619–31. doi:10.1038/nrg2380
6. Cambra, M., Aarnink, A., Zhao, Y., Calvet, S., & Torres, A. (2010). Airborne particulate matter from livestock production systems: a review of an air pollution problem. *Environmental Pollution*, 158(1), 1–17. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.011
7. Chung, W., Chen, Q., Osammor, O., Nolan, A., Zhang, X., Sharifi, V. N., & Swithenbank, J. (2012). Characterisation of particulate matter on the receptor level in a city environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(3), 1471–86. doi:10.1007/s10661-011-2054-2
8. Chung, W., Sharifi, V. N., & Swithenbank, J. (2008). Characterisation of Airborne Particulate Matter in a City Environment. *Modern Applied Science*, 2(4), 17–32.
9. Colbeck, I., & Nasir, Z. A. (2010). *Human Exposure to Pollutants via Dermal Absorption and Inhalation*. (M. Lazaridis & I. Colbeck, Eds.) (Vol. 17, pp. 41–72). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-90-481-8663-1
10. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214. doi:10.1096/fj.02-0752rev
11. De Kok, T. M. C. M., Drieste, H. a L., Hogervorst, J. G. F., & Briedé, J. J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutation Research*, 613(2-3), 103–22. doi:10.1016/j.mrrev.2006.07.001
12. Ellassouli, S. M., Alqahtani, M. H., & Milaat, W. (2007). Genotoxicity of air borne particulates assessed by comet and the Salmonella mutagenicity test in Jeddah, Saudi Arabia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(3), 216–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3731637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. (1998). Characterization of the A-549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 243 (2),359–366
14. Gutierrez, M., Roubicek, D., Cebrián-García, M., Sordo-cede, M., Ostrosky-Wegman, P., & Ana. (2006). Effect of Chemical Composition on the Induction of DNA Damage by Urban Airborne Particulate Matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(3), 199–211. doi:10.1002/em

15. Gonzalez, G. (2014). Actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Tecnica Particular de Loja.
16. Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–85. doi:10.1056/NEJMra0804615
17. Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12016139>
18. Jung, M. H., Kim, H. R., Park, Y. J., Park, D. S., Chung, K. H., & Oh, S. M. (2012). Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1-2), 39–47. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.08.002
19. Kohn, K. W. (1991). Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacology & Therapeutics*, 49(1-2), 55–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852788>
20. Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, a, Andre, V., ... Sichel, F. (2014). Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 28(5), 866–74. doi:10.1016/j.tiv.2014.03.011
21. Loomis, D., Huang, W., & Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chinese Journal of Cancer*, 33(4), 189–96. doi:10.5732/cjc.014.10028
22. McMurry, P. H. (2000). A review of atmospheric aerosol measurements. *Atmospheric Environment*, 34(12-14), 1959–1999.
23. Moller, P. (2005). Measurement of dna damage by the comet assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96(S1), 13–18.
24. Moller, P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(4), 336–45. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto\_167.x
25. Moller, P., & Loft, S. (2010). Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1126–36. doi:10.1289/ehp.0901725
26. Mordechai, C. (1988). A site- specific Mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox- active transition metals. *Free Radicals in Biology & Medicine*, 5(2), 27–37.
27. Nemmar, A., Holme, J. a, Rosas, I., Schwarze, P. E., & Alfaro-Moreno, E. (2013). Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed Research International*, 2013, 22. doi:10.1155/2013/279371
28. Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., ... Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 8. doi:10.1186/1743-8977-2-8
29. Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–9. doi:10.1038/nprot.2006.5
30. Ostling, A., & Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.
31. Pope, C., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., & Thurston, G. D. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality and Long-term Exposure to

- Fine Particulate Air Pollution. *American Medical Association*, 287(9), 1132–1141.
32. Red de monitoreo EMOV – EP. (2011). Informe de la calidad del aire, 2010. Cuenca – Ecuador, Municipio de Cuenca.
  33. Rinne, S. T., & Kaufman, J. (2012). Air Pollution. In *Clinical Respiratory Medicine* (Cuarta edi., pp. 937–945). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-1-4557-0792-8.00080-5
  34. Schwartz, A. G., Prysak, G. M., Bock, C. H., & Cote, M. L. (2007). The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*, 28(3), 507–18. doi:10.1093/carcin/bgl253
  35. Schwarze, P. E., Øvrevik, J., Hetland, R. B., Becher, R., Cassee, F. R., Låg, M., ... Refsnes, M. (2007). Importance of size and composition of particles for effects on cells in vitro. *Inhalation Toxicology*, 19(1), 17–22. doi:10.1080/08958370701490445
  36. Singh, N., Michael, M. C., Raymond, T., & Edward, S. (1988). A simple Technique for Quantitation of Low Level of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650>
  37. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a, Kobayashi, H., ... Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956>
  38. US-EPA. (2004). Air Quality Criteria for Particulate Matter, Vols. I–II. Washington, DC: US Environmental Protection Agency. EPA600/P-99/002aF-bF.

**ANEXOS.**

## Anexo 1. Concentraciones de aniones presentes en el PM<sub>10</sub> recolectado en la ciudad de Cuenca

**Tabla 4.** Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM10 recolectados en los puntos de monitoreo (Primera etapa)

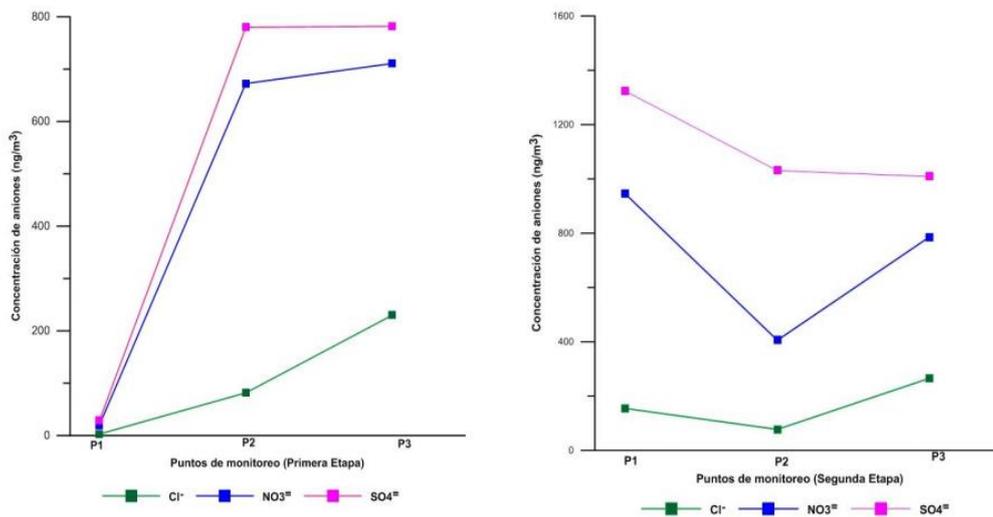
| Puntos de monitoreo | Aniones (ng/m <sup>3</sup> ) |         |         |
|---------------------|------------------------------|---------|---------|
|                     | Cloruro                      | Nitrato | Sulfato |
| P1                  | 2.88                         | 19.94   | 28.66   |
| P2                  | 81.6                         | 672.48  | 780.0   |
| P3                  | 229.77                       | 710.77  | 781.95  |

Fuente: Astudillo, 2014

**Tabla 5.** Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM10 recolectados en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa)

| Puntos de monitoreo | Aniones (ng/m <sup>3</sup> ) |         |         |
|---------------------|------------------------------|---------|---------|
|                     | Cloruro                      | Nitrato | Sulfato |
| P1                  | 154.54                       | 944.84  | 1323.31 |
| P2                  | 77.36                        | 405.77  | 1030.56 |
| P3                  | 265.48                       | 786.07  | 1008.75 |

Fuente: Astudillo, 2014



**Figura 7.** Variación en la concentración de aniones en las muestras de PM<sub>10</sub> durante las dos etapas.  
Fuente: Astudillo, 2014

## Anexo 2. Concentraciones de metales presentes en el PM<sub>10</sub> recolectado en la ciudad de Cuenca

**Tabla 6. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM10 recolectados en los puntos de monitoreo (Primera etapa)**

| Puntos de monitoreo | Concentración de metales pesados ( ng/m <sup>3</sup> ) |        |       |        |       |     |     |
|---------------------|--|--------|-------|--------|-------|-----|-----|
|                     | Fe   | Zn     | Mn    | Cu     | Ni    | Cr  | Cd  |
| <b>P1</b>           | 1888.88  | 187.05 | 36.11 | 175.94 | 26.83 | N.C | N.C |
| <b>P2</b>           | 2801.83  | 220.33 | 57.38 | 22.22  | N.C   | N.C | N.C |
| <b>P3</b>           | 3180.55  | 107.38 | 60.16 | 10.16  | N.C   | N.C | N.C |

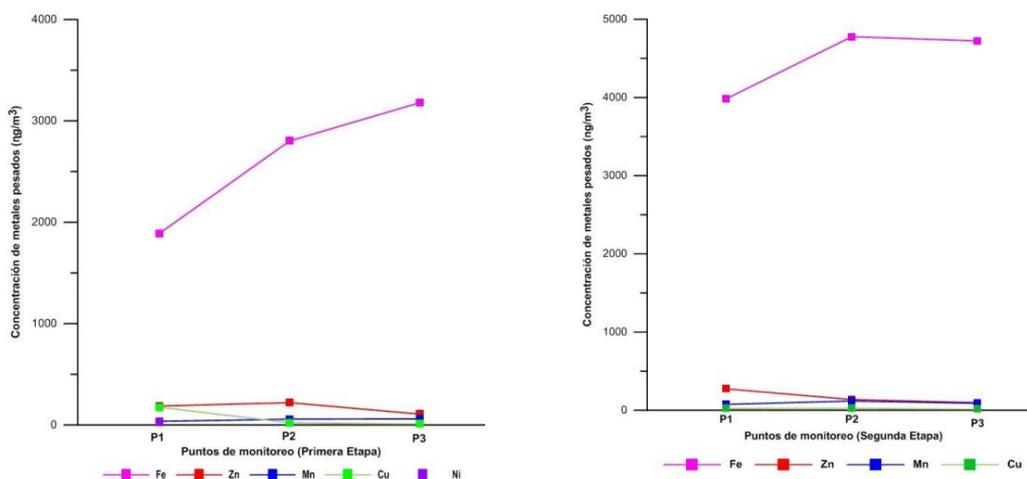
NC= No cuantificado.

**Tabla 7. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM10 recolectados en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa)**

| Puntos de monitoreo | Concentración de metales pesados ( ng/m <sup>3</sup> ) |        |       |       |       |     |     |
|---------------------|--|--------|-------|-------|-------|-----|-----|
|                     | Fe   | Zn     | Mn    | Cu    | Ni    | Cr  | Cd  |
| <b>P1</b>           | 3981.11  | 274.05 | 75.88 | 22.22 | 26.83 | N.C | N.C |
| <b>P2</b>           | 4777.77  | 137.00 | 118.5 | 25.88 | N.C   | N.C | N.C |
| <b>P3</b>           | 4722.66  | 97.22  | 88.8  | 12.94 | N.C   | N.C | N.C |

**Fuente:** Astudillo, 2014.

NC= No cuantificado.



**Figura 8.** Variación en la concentración de aniones en las muestras de PM<sub>10</sub> durante las dos etapas

**Fuente:** Astudillo, 2014.