



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Actividad citotóxica, genotóxico y producción de ROS inducida por el material particulado soluble en solventes orgánicos (PM₁₀) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549”.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Sánchez Coello, Wilson Augusto.

DIRECTOR: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, Dra.

LOJA – ECUADOR

2015

APROVACIÓN DE LA DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso,

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Actividad citotóxica, genotóxico y producción de ROS inducida por el material particulado soluble en solventes orgánicos (PM₁₀) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549”, realizado por Wilson Augusto Sánchez Coello, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

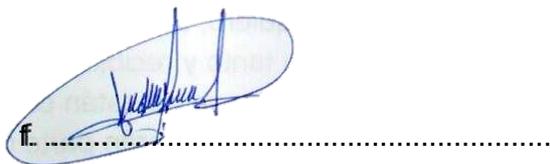
Loja, agosto de 2015

f) 

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Sánchez Coello Wilson Augusto declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: Actividad citotóxica, genotóxico y producción de ROS inducida por el material particulado soluble en solventes orgánicos (PM_{10}) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549 de la titulación de Bioquímica y Farmacia siendo la Dra. Natalia Catalina Bailón Moscoso 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. 88 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”



Sánchez Coello Wilson Augusto
1105046484

DEDICATORÍA

Dedico el presente trabajo de investigación a mis padres María y José quienes con todo su apoyo y amor, supieron enseñarme desde un inicio a no rendirme nunca, por toda su paciencia brindada durante toda mi vida universitaria.

A mis queridos hermanos Wilmer, Mónica y Pablo por ser mi motivación para siempre seguir adelante.

A aquellos seres, tan contados, que me quieren y a quienes yo quiero, a todos los que me han dado tanto y recibido tan poco.

A los que permanecen a mi lado, a los que ya no están conmigo.
Para ti, para ustedes que hoy y siempre serán parte de mí.

Wilson Augusto Sánchez Coello.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la titulación de Bioquímica y Farmacia, por toda la formación académica brindada.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por ser mi Directora de Tesis y brindarme todo su apoyo para la culminación del presente trabajo, por toda su paciencia, todas sus enseñanzas y ayudarme a crecer tanto profesionalmente como personalmente.

A todos quienes pertenecieron al Laboratorio de Genotoxicología y supieron compartir sus conocimientos conmigo, gracias por su apoyo.

A mi querida madre quien con sus paciencia y consejos que fue la base fundamental para la culminación de mi carrera.

Wilson Augusto Sánchez Coello.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

CARATULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORÍA	iv
AGRADECIMIENTO	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE GRÁFICAS.....	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Contaminación Atmosférica.....	6
1.2. Material Particulado Suspendido en el Aire	6
1.2.1. Clasificación del Material Particulado.....	7
1.2.2. Ingreso del Material Particulado al Cuerpo Humano	8
1.2.3. Efectos del material particulado sobre el pulmón	10
1.3. Estrés Oxidativo	10
1.3.1. Radicales libres	11
1.3.2. Especies reactivas de oxígeno.....	12
1.3.3. Biomarcadores para determinar especies reactivas de oxígeno	13
1.3.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno por fluorometría	14
1.4. Genotoxicidad del material particulado.....	14

1.4.1.	Mecanismos por los que el material particulado podría causar daños al DNA	15
1.4.2.	DNA y Genotoxicidad	16
1.4.3.	Ensayo cometa.....	17
2.	FIN DEL PROYECTO.....	19
2.1.	Objetivo general del proyecto.....	20
2.2.	Objetivos específicos del proyecto	20
3.	MATERIALES Y METODOS.....	21
3.1.	Material de estudio.....	22
3.1.1.	Material particulado PM ₁₀	22
3.2.	Modelo biológico	22
3.2.1.	Condiciones de cultivo	23
3.3.	Ensayo de Viabilidad (MTS).....	23
3.4.	Determinación de especies reactivas de oxígeno por fluorometría	24
3.4.1.	Controles	24
3.4.1.1.	Control positivo	24
3.4.1.2.	Control negativo	24
3.4.2.	Técnica.....	24
3.4.3.	Análisis estadístico	25
3.5.	Viabilidad celular mediante ensayo de doble tinción de FDA-EtBr.....	25
3.6.	Ensayo cometa	25
3.6.1.	Controles	25
3.6.1.1.	Control positivo	25
3.6.1.2.	Control negativo	25
3.6.2.	Siembra y cosecha de la línea celular.....	25
3.6.3.	Técnica.....	26
3.6.4.	Análisis estadístico	27
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
4.1.	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno por fluorometría a distintas dosis de PM ₁₀	29

4.2.	Evaluación de la actividad citotóxica a distintas dosis de PM ₁₀	30
4.3.	Comparación de la actividad citotóxica entre todos los puntos y fases.....	35
4.4.	Evaluación de la genotoxicidad a distintas dosis de PM ₁₀	36
4.4.1.	Comparación del efecto genotóxico de las dos fases.	37
4.4.1.1.	Vega Muñoz y Hermano Miguel (Punto 1).....	37
4.4.1.2.	Av. Loja y Remigio Tamariz (Punto 2)	37
4.4.1.3.	Av. Ricardo Duran (Punto 3)	38
4.4.2.	Comparación del efecto genotóxico entre todos los puntos y fases.	40
	CONCLUSIONES	43
	RECOMENDACIONES	44
	BIBLIOGRAFIA.....	45
	ANEXOS.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Tamaño del PM y su capacidad para alcanzar diferentes tejido.....	9
FIGURA 2. Estrés oxidativo.....	11
FIGURA 3: Visualización de los cometas.....	18
FIGURA 4: A-549 (cáncer de pulmón).....	23

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Localización y periodo de monitoreo del Material Particulado (PM10) de la ciudad de Cuenca. Año 2013.....	22
TABLA 2. Porcentaje de viabilidad de células A-549 mediante ensayo MTS.....	29
TABLA 3. Porcentaje de viabilidad de células A-549 mediante ensayo de doble tinción FDA-BrEt.....	30
TABLA 4. Análisis de daño en el DNA, tal como se mide por el ensayo de cometa, en células A-549 expuestas a diversas concentraciones de PM10.....	41

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Especies reactivas de oxígeno Vega Muñoz y Hermano Miguel.....	31
GRÁFICA 2. Especies reactivas de oxígeno Av. Loja y Remigio Tamariz.....	32
GRÁFICA 3. Especies reactivas de oxígeno Av. Ricardo Duran.....	32
GRÁFICA 4. Comparación de producción de Especies reactivas de oxígeno entre todos los puntos y fases.....	35
GRÁFICA 5. Comparación del daño Vega Muñoz y Hermano Miguel.....	37
GRÁFICA 6. Comparación del daño genotóxico Av. Loja y Remigio Tamariz.....	38
GRÁFICA 7. Comparación del daño genotóxico Av. Ricardo Duran.....	38

ABREVIATURAS

A-549: línea celular de pulmón.

Br-Et: Bromuro de Etidio.

DCFDA: Diacetato de diclorofluoresceína.

HBSS: Solución salina de Hank's.

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

RESUMEN

PM₁₀ es una de las principales preocupaciones para la salud. El PM₁₀ posee características físicas las cuales le permiten que este logre ingresar muy profundo dentro del sistema respiratorio, y una vez dentro causar daño pulmonar incrementando la morbilidad y mortalidad. La toxicidad, efecto inflamatorio y genotoxicidad del material particulado está relacionado con su tamaño y la composición principalmente dentro de la fracción orgánica se encuentra hidrocarburos aromáticos policíclicos.

En esta investigación se evalúa el efecto inflamatorio, genotóxico y citotóxico de la fracción orgánica, para los estudios se utilizó la línea celular A-549 que fue expuesta al material particulado de tres zonas, a tres concentraciones distintas (0,82m³/mL; 1,25m³/mL; 1,63m³/mL), se evaluó mediante ensayo MTS, la producción de ROS mediante la técnica de Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, y efecto genotóxico mediante ensayo cometa. Se encontró que la fracción orgánica del PM₁₀ produce un efecto dosis dependiente y está relacionada con la inducción de inflamación a nivel pulmonar y también provocando un efecto genotóxico, constituyendo un riesgo de exposición a largo plazo para la población de la ciudad de Cuenca.

PALABRAS CLAVE: material particulado, fracción orgánica, efecto inflamatorio, daño genotóxico.

ABSTRACT

The mixture of airborne particles whose diameter is lesser than 10 μ m, called PM₁₀, is a major concern for health. PM₁₀ has physical characteristics that allow it to enter within the respiratory system, and, once inside, cause lung damage, increasing morbidity and mortality from cardiopulmonary diseases and lung cancer. The toxicity, inflammatory effects, and genotoxicity of the particulate material are related to its size and composition, in which we find some heavy metals but mainly an organic fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons.

In this research, the inflammatory, cytotoxic, and genotoxic effects of the organic fraction of PM₁₀ in the air of Cuenca city were evaluated by exposing cell cancer line A-549 (lung) to three different concentrations (0.82m³/mL, 1.25m³/mL, 1.63m³/mL) of PM₁₀. Cytotoxicity was evaluated by the MTS assay, the production of ROS (reactive oxygen species) by the diacetate 2',7'-dichlorofluorescein (DCFDA) technique, and genotoxicity by the alkaline comet assay. The organic fraction of PM₁₀ produces a dose-dependent effect associated to inflammation at lung level and genotoxicity, possibly endangering the population of the city of Cuenca.

KEYWORDS: particulate matter, organic fraction, inflammatory, genotoxic damage.

INTRODUCCIÓN

La población humana de las zonas urbanas se encuentra constantemente expuesta a contaminantes ambientales aéreos, entre los principales se encuentra el material particulado (PM) (Querol et al., 2001). Este contaminante es una mezcla altamente heterogénea de partículas suspendidas en el aire que poseen un tamaño menor a $10\mu\text{m}$ (PM_{10}) y posee características químicas, físicas y biológicas particulares, este PM puede estar conformado por sustancias de origen natural o antropogénico (EPA., 2004). La mayor cantidad de PM de origen antropogénico proviene de las emisiones de motores de los vehículos, actividades industriales y los procesos de combustión (Querol et al. 2001; Westerdahl et al. 2005).

Se cree que este PM tienen impacto en la actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica debido a que desestabilizan las cadenas de DNA de manera directa o mediante mecanismos que influyen en la formación de especies reactivas de oxígeno (Brunmark & Cadenas, 1989; Campos & Palomo, 2009). Además debido a su heterogeneidad química se puede encontrar sustancias como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), metales pesados, óxidos de azufre y de nitrógeno (Machado et al., 2007), El estrés oxidativo se produce en las células cuando la generación de ROS abruma defensas antioxidantes naturales de las células. Se cree que ROS y el daño oxidativo desempeñan un papel importante en muchas enfermedades humanas incluyendo cáncer y otras enfermedades neurodegenerativas. Por lo cual es de mucha importancia el estudio del posible daño oxidativo ocasionan las especies reactivas de oxígeno en la salud humana (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

La caracterización del material particulado corresponde a una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, a continuación se describen las dos fracciones por las cuales se encuentra conformado el PM.

La fracción insoluble o fracción se encuentra constituida por partículas llamadas "primarias" entre ellas encontramos a los sulfatos, se halla en fase sólida y compuesta primordialmente por carbono, también incluye partículas de pequeños tamaños como cenizas no combustibles, estas cenizas son derivadas principalmente de lubricantes, aditivos de combustibles y del desgaste del motor. En la fracción soluble o llamada igualmente Fracción Orgánica Soluble (FOS), esta involucra compuestos orgánicos de alto peso molecular y muy complejos en su estructura, son derivados del combustible y lubricantes (Suárez & Pérez, 2006).

Las investigaciones referentes a la presencia de HAPs en muestras del material particulado PM_{10} recolectado de la red de monitoreo de la ciudad de Cuenca y estudios previos ya realizados del extracto acuoso son el punto de partida para continuar con la ejecución de este estudio que se encuentra relacionados con las partículas atmosféricas, el desarrollo del trabajo permitió aportar con datos que muestran el nivel de impacto que las partículas del PM_{10} están ocasionando sobre la salud humana, esto se logró determinar mediante métodos que evalúan el daño inflamatorio alveolar y genotóxico que el PM_{10} está causando y que posiblemente están llevando a la muerte a personas susceptibles y cáncer pulmonar.

La presente investigación permitió estudiar in vitro el daño inflamatorio y genotóxico de la suspensión y extracto orgánico del PM_{10} recolectado en diferentes sitios de muestreo en la ciudad de Cuenca.

MARCO TEÓRICO

1.1. Contaminación Atmosférica

Se entiende por contaminación atmosférica a la presencia de sustancias en una cantidad que implica molestias o riesgos para la salud de las personas y de los demás seres vivos (Durand et al., 2012), han existido episodios de contaminación del aire en Bélgica en 1930, Londres en 1952 y Pensilvania en 1948 que serían los más destacables y característicos que pusieron en evidencia la relación entre la contaminación del aire y la salud humana (EPA., 2004).

Existe una gran cantidad de sustancia químicas que pueden contaminar y pueden proceder de emisiones naturales y las antropogenicas dentro de las más comunes están:

- Monóxido de carbono (CO)
- Dióxido de Carbono (CO₂)
- Metales pesados
- Ozono
- Material particulado
- Óxidos de nitrógeno (NO_x)
- Dióxido de azufre (SO₂)
- Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's)

La contaminación del aire representa una de los mayores riesgos sanitarios del mundo, según la OMS en el 2014 la contaminación del aire exterior provoco unos siete millones de defunciones prematuras. Se estima que un 6% de las defunciones relacionadas con la contaminación del aire exterior se deben a cáncer de pulmón (OMS, 2015).

Por esta razón cada país establece que se adopten acciones de monitoreo ambiental, estas acciones están dirigidas a la generación de diagnóstico de la situación ambiental y de la calidad el aire, para de esta manera caracterizar las fuentes de emisión, calidad del aire y los efectos sobre la salud, estas acciones tienen por misión proporcionar información correspondiente a la contaminación del aire (Durand et al., 2012).

1.2. Material Particulado Suspendido en el Aire

El material particulado (PM) por sus siglas en inglés (particulate matter) se encuentra acompañado de un número, el mismo que indicara el diámetro de la partícula, bajo este

nombre se engloba al conjunto de diminutas partículas sólidas y pequeñas gotas de líquido presente en el aire, que forman una mezcla compleja con naturaleza y composición química heterogénea (Pope, Dockery, Spengler, & Raizenne, 1991).

El PM se origina de una variedad de fuentes y procesos morfológicos, químicos y físicos. Ejemplos son las partículas producidas por los procesos de combustión, procesos fotoquímicos, partículas de sal formadas por el spray del océano y partículas de tierra resuspendidas. Algunas son líquidas y otras sólidas. Diferentes pueden contener un centro sólido rodeado por un líquido. El PM contiene iones inorgánicos, componentes metálicos, carbón elemental, compuestos orgánicos y compuestos en forma de cristales. Algunas partículas son higroscópicas. La parte orgánica es especialmente compleja porque contienen miles de compuestos (Gillies, Etyemezian, Kuhns, Nikolic, & Gillette, 2005).

Los límites máximos permitidos establecidos en la legislación ecuatoriana son $15\mu\text{g.m}^3$ (promedio anual) y $65\mu\text{g.m}^3$ (promedio 24 horas) para $\text{PM}_{2.5}$ y $50\mu\text{g.m}^3$ (promedio anual) y $150\mu\text{g.m}^3$ (promedio 24 horas) para PM_{10} . Estos valores son equiparables con los existentes en la mayoría de los países latinoamericanos e incluso con los fijados por la Agencia Estadounidense de Protección Ambiental, USEPA (Ramirez, Esparza Ponce, Varela Sortillón, Astorga Reyes, & Roman B, 2009).

1.2.1. Clasificación del Material Particulado

El PM se clasifica según su diámetro, en PM_{10} ($10\mu\text{m}$), PM grueso ($2,5$ a $10\mu\text{m}$) y PM ultrafino ($<2,5\mu\text{m}$) (Campos & Palomo, 2009). Por otro lado, el desarrollo de la nanotecnología y de la ingeniería de nanomateriales del carbón ha permitido generar nanopartículas de 1 a 100nm , nanotubos de pared simple, nanotubos de pared múltiple y PM estándar de $1,4\text{nm}$ (Bunn, Dinsdale, Smith, & Grigg, 2001). También, se ha preparado mezclas de partículas derivadas del carbón, partículas de carbón purificadas de poliestireno de 60nm (Bunn et al., 2001). Esto implica la interacción directa de material ultrafino en sangre. Se ha observado que aerosoles con PM entre 7 y 487nm de diámetro, marcados con Tc99 , se pueden difundir a la circulación (Campos & Palomo, 2009).

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 (penetran hasta nariz y boca), partículas torácicas (penetran en la laringe), partículas respirables de alto riesgo (partículas que pueden ir más allá de la laringe y llegar hasta el sistema respiratorio no ciliadas).

Otra clasificación existente es la que se basa en su composición química separándola en dos fracciones:

- Fracción Soluble.- la fracción soluble es llamada igualmente Fracción Orgánica Soluble (SOF). Involucra compuestos orgánicos de alto peso molecular y muy complejos en su estructura, son derivados del combustible y lubricantes. Las mayores agrupaciones son hidrocarburos no combustionados (alcalinos, aromáticos), hidrocarburos oxigenados (ésteres, ácidos orgánicos, éteres) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). En el PM₁₀ se encuentran 16 HAPs los cuales son: naftaleno, acenaftaleno, acenafticeno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz(a)antraceno, criseno, benzo(β)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(α)pireno (Suárez & Pérez, 2006).
- Fracción Insoluble.- es una fracción emitida por el motor, constituido por partículas llamadas “primarias”. Se encuentra en fase sólida y compuesta primordialmente por carbono, pero también incluye pequeños tamaños como cenizas no combustibles. Las cenizas son derivadas principalmente de lubricantes, aditivos de combustibles y del desgaste propio del motor (Suárez & Pérez, 2006).

El PM afecta a más personas que cualquier otro contaminante en vista que este es una mezcla de distintas partículas tales como iones y algunos metales pesados los cuales tienen el potencial toxico (OMS, 2014).

1.2.2. Ingreso del Material Particulado al Cuerpo Humano

La exposición por periodos largos de tiempo al PM suspendido en el aire ha sido correlacionado con un aumento en las probabilidades de padecer enfermedades respiratorias, cardiopulmonares y cáncer de pulmón (Ostro, Hurley, & Lipsett, 1999).

El ingreso del PM se da principalmente a través del sistema respiratorio como se muestra en la figura 1, la capacidad de ingreso se da básicamente por el diámetro aerodinámico del PM. A un mayor tamaño de partícula el PM se queda en las vías aéreas superiores ya que ahí existe la primera línea de defensa del sistema respiratorio (Li, Gilmour, Donaldson, & MacNee, 1996). El PM₁₀ avanza hasta las vías aéreas inferiores es en este punto donde el cuerpo activa su segunda línea de defensa que se trata de la fagocitosis por macrófagos alveolares, neutrófilos, y ocasionalmente eosinofilos. Además existe una tercera línea de defensa que esta mediada por células de respuesta inmune y las células de respuesta humoral específica. También existen defensas mecánicas como el estornudo, tos y depuración mucociliar, existe una gran probabilidad de que el PM_{2.5} alcance los alveolos donde es más difícil que se puedan eliminar y donde produce más daño (Nemmar, Holme, Rosas, Schwarze, & Alfaro-Moreno, 2013).

Cuando el PM haya logrado evitar los distintos mecanismos de defensa del sistema respiratorio este se distribuye en los tejido y células del pulmón donde podrían sufrir transformaciones metabólicas y ser activados para producir distintos efectos biológicos.

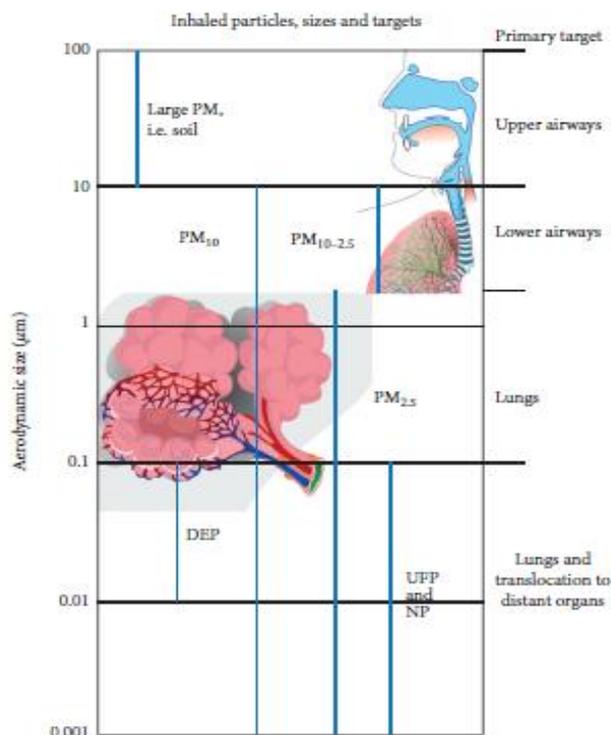


FIGURA 1: Tamaño del PM y su capacidad para alcanzar diferentes tejidos.
Fuente: Nemmar et al., (2013)

1.2.3. Efectos del material particulado sobre el pulmón

El pulmón, por su gran superficie y función, es un órgano diana para producirse lesiones oxidativas, por lo cual este posee un sistema de defensa extracelular para poder protegerse contra la oxidación excesiva de sus células epiteliales (Nemmar et al., 2013). La inflamación que se produce en los pulmones implica un conjunto complejo de respuestas moleculares y celulares resultantes de la exposición a estímulos exógenos tales como patógenos o sustancias nocivas, entre ellas el PM; las vías asociadas con la inflamación aguda en respuesta a la exposición de PM implica una secuencia cuidadosamente orquestada de eventos, mediada en parte por moléculas quimiotácticas (quimiocinas), una vez que las partículas se depositan dentro del pulmón las células fagocíticas son reclutadas hacia la partícula extraña por medio de las quimiocinas son llevadas por la escalera mecánica mucociliar hasta el tracto digestivo (Ristovski et al., 2012).

Estudios que se han realizado con líneas celulares de pulmón como la línea A-549 (adenocarcinoma de pulmón) muestran que las partículas del PM₁₀ producen inflamación y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y citotoxicidad, esta producción de especies reactivas de oxígeno y la inflamación pueden también generar daños al DNA de las células expuestas (Møller et al., 2014).

1.3. Estrés Oxidativo

Especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman constantemente en el cuerpo humano y se eliminan por las defensas antioxidantes. Las ROS son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales, un aspecto particular del estrés oxidativo es la producción de ROS, estas se producen en niveles bajos pero cuando sus estos aumentan se produce un daño a nivel celular el cual conlleva a disfunciones metabólicas y sistémicas que preceden padecimientos a la salud (Gastell & De Alejo, 2000). Los antioxidantes pueden actuar al eliminar biológicamente importantes especies reactivas de oxígeno (O₂, H₂O₂, ·OH, HOCl, ferrilo, peroxilo y alcoxilo), mediante la prevención de su formación, o mediante la reparación del daño que hacen (Halliwell, 1991).

En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el correcto funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. Como se explica en la figura 2 cuando el aumento del contenido intracelular de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Venereo Gutiérrez, 2002).



FIGURA 2. Estrés oxidativo cuando hay un exceso de radicales libres en comparación con las defensas antioxidantes. Como consecuencia, los radicales libres atacan y oxidan otros componentes. Esto lleva a lesión tisular y producir inflamación a la los sitios de lesión.

Fuente: Kelly, F. (2003)

1.3.1. Radicales libres

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el

punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubiquitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y benefician la quimiotaxis (Venereo Gutiérrez, 2002).

Los radicales libres se forman constantemente en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas, dentro de esas tenemos subproductos de reacciones metabólicas, humo de cigarrillo, contaminantes ambientales como emisiones de los automóviles e industrias, entre otras.

1.3.2. Especies reactivas de oxígeno

Las células constantemente están generando especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el metabolismo aeróbico. La generación de ROS tiene un papel protector y funcional en el sistema inmunológico, pero también pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de muchas enfermedades humanas incluyendo cáncer (Møller et al., 2014).

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias pro-oxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO^\bullet)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Oxígeno singlete (O_2)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono (O_3)

Existen sistemas de modulación redox, pero a pesar de la existencia de estos, una proporción de ROS escapa a la cadena respiratoria mitocondrial causando daño celular (Venereo Gutiérrez, 2002).

1.3.3. Biomarcadores para determinar especies reactivas de oxígeno

Existen tanto métodos directos como indirectos para poder determinar especies reactivas de oxígeno, en los métodos indirectos se basa en la medición de la concentración de agentes oxidantes pero ha resultado difícil en muchos casos, por tener éstos un tiempo de vida media muy corto. La espectrometría de la resonancia de la rotación (espín) de electrones es la única técnica analítica que mide directamente ROS, pero su aplicación en el ser humano no es factible aún, además de ser muy costoso. Los métodos indirectos se basan en la determinación de productos terminales de la acción oxidante, se han desarrollado métodos para medir algunas ROS, pero indirectamente, mediante los productos terminales resultantes de su acción oxidante sobre proteínas, DNA y lípidos (Gastell & De Alejo, 2000).

Las ROS inducen en las proteínas la acumulación de grupos carbonilos, que pueden ser evaluados después de la condensación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), comúnmente utilizado para evaluar la oxidación de proteínas celulares. Este método es muy laborioso, largo y utiliza gran cantidad de solventes, por lo que recientemente se ha desarrollado un nuevo método de espectrofotometría para medir este compuesto (Møller et al., 2014).

También se puede realizar la medición de la concentración de antioxidantes, los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar por diferentes enfermedades, por lo que al monitorearlos pueden ser utilizados como marcadores de enfermedades y para el seguimiento terapéutico, además de la medición del estado antioxidante total este estado antioxidante refleja el balance dinámico entre el sistema antioxidante y los pro-oxidantes y es utilizado como instrumento para estimar el riesgo de daño oxidativo (Gastell & De Alejo, 2000).

Son enormes los esfuerzos que se realizan a escala mundial para el desarrollo de nuevos y más sencillos métodos que nos llevarán a la mayor utilización de los datos aportados por la medición del daño oxidativo. Se espera que dentro de algunos años los

médicos indiquen a sus pacientes, de forma rutinaria, junto al colesterol o la glucosa, la medición de este tipo de daño.

1.3.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno por fluorometría

Para la determinación de ROS por este método utiliza sondas celulares permeables fluorescentes y quimioluminiscencias mediadas en un lector de placas o fluorómetro, esta técnica se basa en la medición del estado REDOX de cada célula mediante la cuantificación de fluorescencia desprendida de las mismas, mediante la adición de Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA), esta es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para medir el estado redox de una célula, la cual posee varias ventajas sobre otros métodos desarrollados, además de ser muy fácil de realizar, tiene una alta sensibilidad a los cambios en el estado redox de una célula y se puede utilizar para poder seguir los cambios en ROS en el tiempo (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

1.4. Genotoxicidad del material particulado

La industrialización y el aumento del tráfico vehicular han incrementado la exposición de la población humana a agentes potencialmente genotóxicos, que agreden mediante múltiples mecanismos el patrimonio genético (Tancell, Rhead, Pemberton, & Braven, 1996).

La inestabilidad de los compuestos químicos que conforma el DNA y los nucleótidos en condiciones de temperatura y pH determinados producen reacciones de hidrólisis espontáneas que generan sitios abásicos (Nemmar et al., 2013). Las especies reactivas de oxígeno conjuntamente con las especies reactivas de nitrógeno provocan diversas mutaciones, entre las más importantes están las roturas de cadena del DNA, tanto de simple cadena (SSB) como de doble cadena (DSB), si estas roturas de cadena no se reparan apropiadamente representan una seria amenaza para la estabilidad genética y supervivencia celular (Caldecott, 2008).

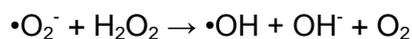
Debido a la gran cantidad de compuestos presentes en la atmósfera como contaminantes que pueden interactuar con el DNA y producir daño al mismo, se encuentra el PM, una gran cantidad de estudios ya realizados han demostrado que este posee una actividad genotóxica y mutagénica (Gutierrez-Castillo et al., 2006).

1.4.1. Mecanismos por los que el material particulado podría causar daños al DNA

Los mecanismos aún no se encuentran totalmente esclarecidos pero se ha mencionado que el estrés oxidativo podría ser uno de los principales mecanismos implicados, las ROS producen roturas de cadena en el DNA mediante la adición de OH en las uniones C=C y modificaciones químicas de la azúcar o de las bases nitrogenadas (Li et al., 1996).

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre las velocidades de producción y destrucción de las moléculas de las ROS, entre ellas nos encontramos iones de oxígeno, radicales libres, peróxidos tanto orgánicos como inorgánicos y metales de transición tales como cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), vanadio (Va) y titanio (Ti), los hidrocarburos poli aromáticos (HPA) y los aniones presentes en el PM contribuyen a la capacidad de inducir daño en el DNA de las células de pulmón (de Kok, Driee, Hogervorst, & Briedé, 2006). Un ejemplo claro es el hierro que cataliza la formación de ROS a partir del superóxido y del hidrogeno (Reacción de Fenton-Haber Weiss).

La reacción neta es:



(Esquema de la reacción Fenton- Haber Weiss. Catálisis de ROS, Koppenol, 2001)

Los daños en el DNA de la inducción por PM ha sido evaluado por diferentes métodos, lo que indica que componentes del PM, tales como hidrocarburos y metales son responsables de los cambios conformacionales de DNA, mutaciones puntuales, la formación de aductos y la oxidación del DNA (Villalobos-Pietrini, Blanco, & Gomez-Arroyo, 1995).

Los mecanismos mencionados están relacionados con la mala reparación de las roturas de cadena del DNA, por lo tanto implica una variedad de patologías humanas (Garcia F & Carreras A, 2008).

1.4.2. DNA y Genotoxicidad

El DNA es una macromolécula biológica muy estable, debido a su gran mecanismo de reparación, sin embargo, existe la posibilidad de que se produzcan cambios o alteraciones en la secuencia de nucleótidos, estas modificaciones se producen en la replicación, recombinación e incluso en la misma reparación.

Los productos químicos pueden aumentar el riesgo dañar directamente el DNA (reactividad DNA) o mediante el aumento de la proliferación celular (repeticiones de DNA), aumentando el número de oportunidades para que el daño del DNA sea espontáneo. Genotoxicidad es un término más amplio muchos de estos mecanismos, tales como clastogenicidad, la inhibición de la reparación del DNA, o daños en el aparato mitótico, producen daño en el DNA indirectamente. Estos mecanismos no reactivos con el DNA implican interacción con las proteínas y son mecánicamente fenómenos de umbral, 2-acetilaminofluoreno (AAF) es reactivo con el DNA. Su respuesta a la dosis para la formación de aducto de DNA es lineal, mientras que la respuesta a hacia un tumor no es lineal. La no linealidad está en la dosis a la que se produce aumento de la proliferación celular, relacionados con el fenómeno de umbral de citotoxicidad. No linealidad para los carcinógenos reactivos de DNA también se puede producir por cambios en los procesos metabólicos de la activación y/o desactivación debido a la cinética saturable. Numerosos agentes no genotóxicos han sido identificados como carcinógenos en modelos de roedores, la mayoría de actúan mediante la inducción de la citotoxicidad con la proliferación regenerativa. La citotoxicidad se puede producir por formación de productos químicos reactivos. Del mismo modo, la inducción química de la citotoxicidad es un fenómeno umbral conocida. Productos químicos no genotóxicos tienen una respuesta a la dosis umbral con respecto a la carcinogénesis, al igual que agentes más genotóxicos. Productos químicos reactivos de DNA tienen una respuesta a la dosis no lineal (Cohen, 2008).

Los mecanismos mencionados están relacionados con la mala reparación de las roturas de cadena del DNA, por lo tanto implica una variedad de patologías humanas (Garcia F & Carreras A, 2008).

1.4.3. Ensayo cometa

El ensayo cometa (electroforesis en gel de una sola célula) es un método simple para medir ácido desoxirribonucleico (DNA), que presenta roturas de cadena en células eucariotas. Las células embebidas en agarosa sobre un portaobjetos de microscopio se lisan para formar estructuras que contienen bucles superenrollado de DNA ligada a la matriz nuclear. La electroforesis es realizada a pH elevados y arroja resultados de estructuras similares a cometas, observadas por microscopía de fluorescencia; la intensidad de la cola del cometa respecto a la cabeza refleja el número de roturas en el DNA. La base probable para esto es que los bucles que contienen una rotura de DNA pierden su superenrollamiento y quedan libres para extenderse hacia el ánodo (Collins, 2004).

El ensayo del cometa se basa en que el DNA no dañado mantiene una asociación altamente organizada con una matriz de proteínas en el núcleo.

El ensayo tiene aplicaciones para pruebas de nuevos productos químicos que causen genotoxicidad, vigilancia de la contaminación del medio ambiente con genotoxinas, control biológico humano y la epidemiología molecular y la investigación fundamental en el daño del DNA y la reparación (Olive & Banáth, 2006).

Desde el desarrollo inicial de la prueba del ensayo cometa se han hecho esfuerzos para mejorar la sensibilidad y fiabilidad del ensayo, extender las aplicaciones para el análisis de los diferentes tipos de daño en el DNA en diferentes líneas celulares, aumentar la capacidad de manejo de muestras y estandarizar los protocolos y los esfuerzos de análisis para optimizar la tracción de la agarosa, tampones de lisis y las manchas de DNA. Una versión del método realizado en condiciones neutras permitió la detección de DNA de doble cadena, el daño base se pudo identificar mediante la incubación de las células lisadas con endonucleasas de daño específico antes de la electroforesis. La amplia fragmentación del DNA que ocurre en las células apoptóticas hizo estas células simples de detectar. La capacidad de medir la heterogeneidad en respuesta a agentes que dañan el DNA fue probado primero en las células expuestas a quimioterapia del cáncer. Una amplia gama de apariciones de los cometas indicó que algunos núcleos contenían un gran número de roturas de cadena, mientras que otros estaban en buen estado. La importancia de la heterogeneidad en el daño del DNA en la explicación de la

resistencia al tratamiento del cáncer se demostró posteriormente en las células tumorales de los modelos animales y biopsias clínicas (Olive & Banáth, 2006).

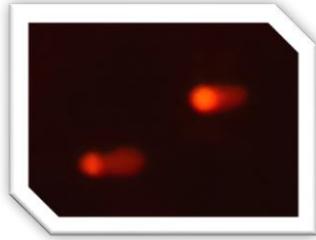


FIGURA 3: Visualización de los cometas en Microscopio de Fluorescencia, (400X)

Fuente: Sánchez, W. (2015)

2. FIN DEL PROYECTO

2.1. Objetivo general del proyecto

- Determinar la actividad citotóxica y efectos genotóxicos e inducción de ROS del material particulado soluble en solventes orgánicos del PM₁₀ de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana de pulmón A-549, para poder emitir criterios correspondientes a la calidad del aire presente en la ciudad.

2.2. Objetivos específicos del proyecto

- Establecer la actividad citotóxica (especies reactivas de oxígeno) como producto de las partículas (PM₁₀) en líneas celulares humanas A-549.
- 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 (PM₁₀).
- Determinar la cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas al exponer a las células de pulmón A-549 al PM₁₀ de la zona urbana de la ciudad de Cuenca mediante fluorimetría.
- Determinar la genotoxicidad que producen las distintas concentraciones del material particulado (PM₁₀) sobre la línea celular A-549 mediante el Ensayo Cometa.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material de estudio

3.1.1. Material particulado PM₁₀

Para el estudio se utilizó la parte del PM₁₀ que se logró disolver en etanol (solvente orgánico), del monitoreo de tres zonas urbanas distintas de la ciudad de Cuenca y en dos fases diferentes (épocas), el PM₁₀ fue recolectado en filtros de éster celulosa de 0.8µm (poro) y 47mm de diámetro por el personal del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, las muestras fueron llevadas al equipo de rotavapor para poder eliminar toda el agua contenida y luego poder ser resuspendidas en etanol, luego fueron llevadas a ultrasonificación, esta concentración madre se almaceno a 4°C en condiciones de oscuridad.

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

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

Fuente: Astudillo, A.(2014)

3.2. Modelo biológico

Para el estudio se utilizó la línea celular humana de cáncer de pulmón A-549 (figura 4) la misma que se procedió a criopreservar con el fin de tener un banco de células para poder realizar los ensayos correspondientes.

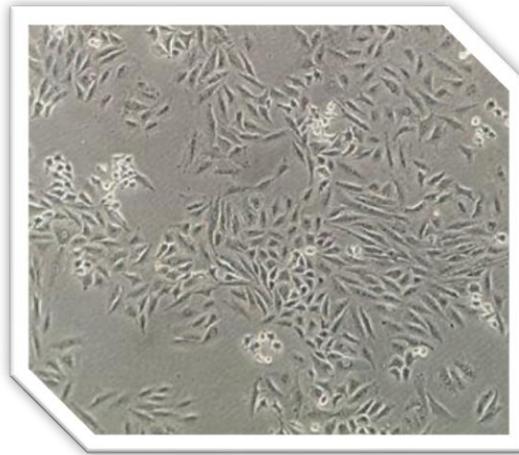


FIGURA 4: A-549 (Cáncer de pulmón) microscopio invertido ZEISS (40X).

Fuente: Sánchez, W. (2015).

3.2.1. Condiciones de cultivo

La línea celular A-549 fue cultivada con medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2mM) (GIBCO), y 1% de Antibiótico-Antimicótico (100 Unidades/mL de Penicilina G, 100µg/mL de Estreptomicina y 25µg/mL de Anfotericina B) (GIBCO). El cultivo se mantuvo en incubación de 37°C y en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂, el tiempo de duplicación de las células fue de 24 horas.

3.3. Ensayo de Viabilidad (MTS)

Para poder determinar el porcentaje de células viables para los ensayos se procedió a realizar el ensayo colorimétrico MTS.

Para la realización del ensayo se sembró 10.000 células/pocillo en un multiplato de 96 pocillos, la siembra se partió de cultivos en un 80-90% de confluencia, luego se procedió a incubar por 24 horas, una vez transcurrido el tiempo de incubación se aplicó tratamiento a las células con material particulado (PM₁₀) a las concentraciones de 0,82; 1,25; 1,63m³/mL. Se dejó incubar por dos horas, pasado este tiempo se aplicó 20µL de 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 490nm en un espectrofotómetro TECAN SUNRISE. La cantidad de producto formado (formasan) medido por la absorbancia, es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

3.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno por fluorometría

3.4.1. Controles

3.4.1.1. Control positivo

Como control positivo se utilizó peróxido de hidrogeno H_2O_2 a una concentración de $1\mu M$, 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.

3.4.1.2. Control negativo

Las muestras de PM fueron diluidas en etanol al 1%, por lo cual se lo utilizo como control negativo.

3.4.2. Técnica

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

Para la realización del ensayo se sembró 10.000 células/pocillo en un multiplato de 96 pocillos, luego de 24 horas de incubación las células fueron inoculadas con 200 μL de la solución de trabajo DCFDA 40 μM en solución Salina de Hank's (HBSS) y se mantuvo durante 30min a 37°C. Pasado este tiempo se desechó el medio y se lavó con PBS para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se reemplazó el medio previamente utilizado con medio HBSS y se expuso las células a las concentraciones de material particulado (PM_{10}) las mismas que fueron 0,82; 1,25; 1,63 m^3/mL . Se incubo las células por 2 horas a 37°C. La fluorescencia del DCFDA se midió una vez transcurrido el periodo de exposición en un fluorometro Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation) a una λ_{ex} : 485nm y λ_{em} : 528nm.

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

3.4.3. Análisis estadístico

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

3.5. Viabilidad celular mediante ensayo de doble tinción de FDA-EtBr

Para poder determinar nuevamente el porcentaje de viabilidad en el ensayo cometa se tomó 20 μ L de la resuspensión que se obtiene en la cosecha del ensayo cometa y se mezcló con 20 μ L de solución Diacetato de fluoresceína-Bromuro de Etidio (FDA 5mg/mL; EtBr 1mg/5mL). Colocamos la suspensión obtenida en placas portaobjetos (por duplicado). Se procedió a observar en un microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) y se contabilizó un total de 200 células por placa (400 células por punto de muestreo) y se realizó el ensayo por triplicado. La tinción otorga una coloración rojo (Bromuro de Etidio) nos indica que la célula ha sufrido una pérdida irreversible en la integridad de la membrana y se asume que están muertas, las células teñidas de color verde (FDA) son tomadas como vivas, a partir del número de células vivas y muertas se saca el porcentaje de viabilidad.

3.6. Ensayo cometa

3.6.1. Controles

3.6.1.1. Control positivo

Como control positivo se utilizó etilmetanosulfonato (EMS) a una concentración de 2 μ M. Se sabe que este compuesto reacciona con los grupos nucleofílicos del DNA donando un grupo etilo estas alteraciones se transforman en roturas de cadena al exponerlos a un tratamiento con hidróxido de sodio.

3.6.1.2. Control negativo

Se usó para el control negativo etanol al 1%, ya que se lo uso para disolver el PM₁₀.

3.6.2. Siembra y cosecha de la línea celular

Para dar inicio al ensayo se sembró 150.000 células/pocillo en cajas multiplato de 6 pocillos y en condiciones óptimas para realizar el ensayo, las células fueron incubadas

por 24 horas, luego retiramos el medio y lavamos con PBS, se expuso las células al material particulado (PM₁₀) a tres distintas concentraciones 0,82; 1,25; 1,63m³/mL, las células fueron incubadas por 24 horas más.

Para la cosecha se realizó un lavado con PBS y se procedió a disgregarlas del multiplato con 1mL de tripsina, esta suspensión se transfirió a tubos cónicos de 15mL, se centrifugo por 5min a 5000rpm, se desechó el medio y se resuspendió el pellet obtenido con 1mL de medio de cultivo, pasamos la nueva resuspensión a tubos cónicos de 1.5mL y centrifugamos por 2min a 1000rpm, eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet con 40μL de medio.

3.6.3. Técnica

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

A partir de la suspensión obtenida de la cosecha tomamos 20μL y mezclamos con 150μL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 1%, la nueva suspensión fue vertida en dos diferentes placas portaobjetos 75μL en cada una y las cubrimos inmediatamente con un cubreobjetos, las placas fueron llevadas a refrigeración por 5min, transcurrido el tiempo se retira el cubreobjetos y colocamos 130μL de agarosa de bajo punto de fusión y volvemos a colocar un cubreobjetos, nuevamente las llevamos a refrigeración por 5min adicionales, al pasar este tiempo retiramos los cubreobjetos y dejamos las laminillas en la solución de lisis (10% de DMSO, 1% de tritón X-100, 2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris y pH 10) por un tiempo entre 1 hora y 15 días.

Antes de proceder con la electroforesis se dejó reposar los portaobjetos con las muestras por 20min en el buffer de electroforesis, el mismo que contiene 300mM NaOH y 1mM EDTA, ajustado a pH 13, transcurrido el tiempo se procedió a la electroforesis concordando las condiciones de 25V, 300mA por 20min. Posteriormente los portaobjetos fueron sometidos a buffer de neutralización ajustado a pH 7.5, finalmente las deshidratamos con metanol para su análisis.

Para realizar el análisis de las placas estas fueron hidratadas con agua desionizada fría y se tiñeron con 60μL de bromuro de Etidio (30μg/mL). Para evaluar el daño medimos la longitud de la cola en μm usando un micrómetro ocular, en un microscopio de

fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con un aumento de 400x, se contabilizo 50 cometas por cada placa.

3.6.4. Análisis estadístico

Para el análisis se realizó tres réplicas del ensayo cometa por duplicado, se examinó la normalidad de los datos con el test de normalidad Shapiro-wilk y el test no paramétrico de Kruscal-Wallis para compararlo con el control negativo, comparar las dos fases y comparar entre todos los puntos, todo esto usando el software estadístico GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno por fluorimetría a distintas dosis de PM₁₀

La determinación de citotoxicidad se la realizó mediante dos técnicas, el ensayo colorimétrico MTS (Tabla 2) y el ensayo de doble tinción FDA-BrEt (Tabla 3), los cuales fueron utilizados con el fin de obtener el porcentaje de viabilidad, se expuso la línea celular A-549 a tres concentraciones diferentes de PM₁₀ correspondientes a las zonas de muestreo establecidas: Vega Muñoz y Hermano Miguel (Punto 1); Av. Loja y Remigio Tamariz (Punto 2); Av. Ricardo Duran (Punto 3), tanto para primera y segunda fase.

En la tabla 2 se detalla el porcentaje de viabilidad de las células A-549 expuestas a distintas dosis de PM₁₀, obtenido mediante el ensayo MTS.

TABLA 2. Porcentaje de viabilidad de células A-549 mediante ensayo MTS

Dosis m ³ /mL	% de Viabilidad					
	Primera Fase			Segunda Fase		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
C-	100 ± 2,41	100 ± 2,41	100 ± 2,41	100 ± 2,41	100 ± 2,41	100 ± 2,41
0,82	87,62 ± 1,84	89,11 ± 1,26	89,11 ± 0,51	86,20 ± 2,07	96,93 ± 1,07	91,32 ± 0,15
1,25	85,40 ± 2,46	81,81 ± 0,39	83,52 ± 0,31	84,47 ± 3,12	91,45 ± 1,98	89,44 ± 0,28
1,63	77,71 ± 3,88	64,20 ± 3,26	81,72 ± 0,41	75,31 ± 4,03	87,10 ± 2,22	69,02 ± 3,02
C+	71.69 ± 0.46	71.69 ± 0.46	71.69 ± 0.46	71.69 ± 0.46	71.69 ± 0.46	71.69 ± 0.46

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

Elaboración. Sánchez, W. (2015)

En la tabla 3 se muestra el porcentaje de viabilidad de las células A-549 expuestas a distintas dosis de PM₁₀, obtenido mediante ensayo de doble tinción FDA-BrEt.

TABLA 3. Porcentaje de viabilidad de células A-549 mediante ensayo de doble tinción FDA-BrEt.

Dosis m ³ /mL	% de Viabilidad					
	Primera Fase			Segunda Fase		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
C-	97,95 ± 0,21	97,95 ± 0,21	97,95 ± 0,21	97,95 ± 0,21	97,95 ± 0,21	97,95 ± 0,21

0,82	92,97 ± 0,77	92,89 ± 0,89	93,06 ± 0,93	91,67 ± 0,38	91,68 ± 0,81	91,41 ± 0,21
1,25	89,45 ± 0,19	87,87 ± 1,02	86,29 ± 0,91	89,27 ± 0,53	87,42 ± 0,36	87,35 ± 0,83
1,63	78,79 ± 0,38	75,70 ± 0,96	78,39 ± 1,13	78,34 ± 1,27	77,95 ± 0,65	78,01 ± 0,43

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

Elaboración. Sánchez, W. (2015)

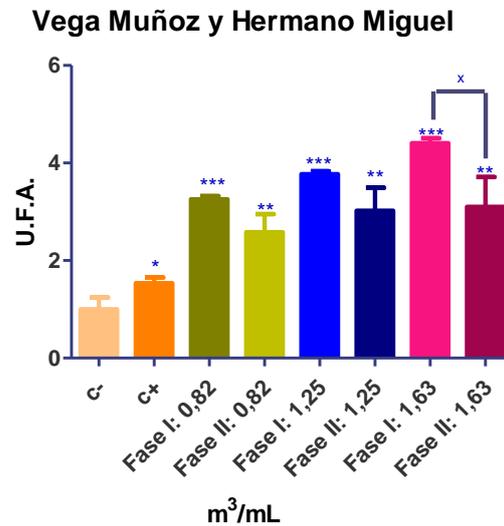
Los resultados obtenidos mediante ensayo MTS y Ensayo de doble tinción FDA-EtBr muestran que no existen diferencias significativas entre los PM₁₀ de las tres zonas de cada una de las fases de muestreo. Y nos permitió concluir que el material particulado PM₁₀ no altero la viabilidad de las células A-549 por debajo del 70%, así que podemos estar seguros que el daño causado se da por un efecto inducido por las soluciones de PM₁₀, mas no por muerte celular. El efecto que demostró el PM₁₀ fue dosis dependiente de la concentración, es decir que a medida que aumentaba la concentración, la viabilidad disminuye paulatinamente, el resultado fue similar para todos los puntos de muestreo.

4.2. Evaluación de la actividad citotóxica a distintas dosis de PM₁₀

La producción de ROS liberadas por el PM₁₀ no pueden ser detectadas directamente por sus breves tiempos de vida media, por lo que se han desarrollado algunos métodos alternativos. En el método, una muestra molecular reacciona con las especies reactivas y forma un producto estable que puede ser analizado con variedad de técnicas (Ricardo Beleño, Alfonso Quijano, & Iván Meléndez, 2013), como el análisis mediante fluorimetría que es el ensayo aplicado en la presente investigación. Nuestro estudio se enfocó en cuantificar la cantidad de especies reactivas de oxígeno liberadas por la parte del PM₁₀ que es soluble en solventes orgánicos, recolectado en tres zonas de la ciudad de Cuenca, mediante el ensayo de Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína como indicador de ROS.

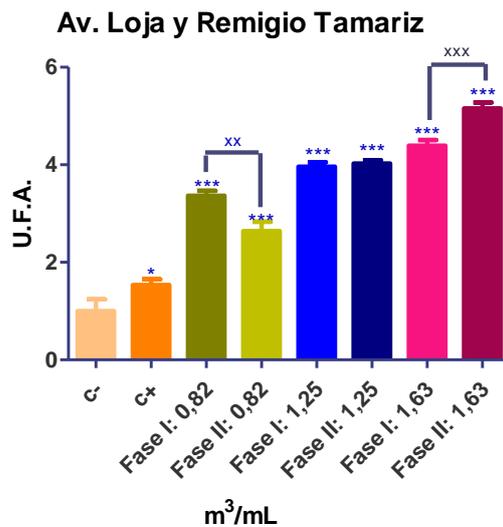
En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos después de 2 horas de la exposición con la parte soluble en un solvente orgánico del PM₁₀ correspondiente a la fase I y II del punto de muestreo número I (Vega Muñoz y Hermano Miguel) sobre la línea celular A-549, se puede observar que la cantidad de especies reactivas de oxígeno se incrementan significativamente conforme aumenta la concentración del

material particulado, en comparación con el control negativo, sin embargo, al haber realizado el 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 I a la dosis de $1,63\text{m}^3/\text{mL}$ y existe una diferencia significativa la cual indica que existe una mayor producción de ROS



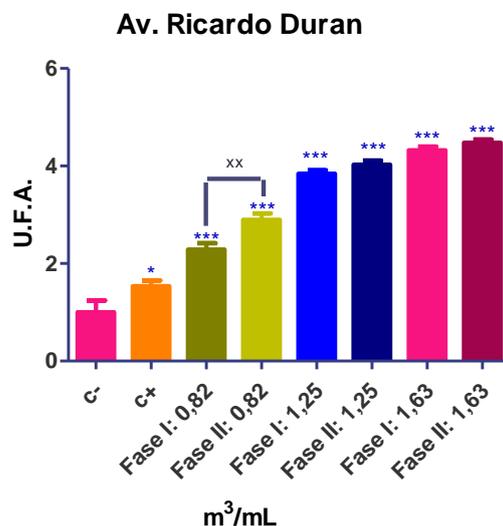
GRÁFICA 1. Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de PM_{10} . Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. UFA (Unidades de fluorescencia arbitrarias). Prueba de Anova y post test de Dunnett (* $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$) Prueba de Anova y test Bonferroni ($p < 0.05$).

En la gráfica 2 se puede observar que la cantidad de ROS producidas por la parte del PM_{10} soluble en un solvente orgánico, correspondientes al segundo punto de muestreo (Av. Loja y Remigio Tamariz) tanto de la fase I y II, sobre la línea celular A-549, los mismos que fueron dependientes de la concentraciones y significativamente diferentes al grupo de control, mostrando diferencias significativas en las dosis de 0,82 y $1,63\text{m}^3/\text{mL}$, en la fase I la dosis de $0,82\text{m}^3/\text{mL}$ muestra una mayor producción de ROS, mientras que en la dosis de $1,63\text{m}^3/\text{mL}$ es la fase II la que muestra una mayor producción.



GRÁFICA 2. Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de PM₁₀. Cada barra representa la media ±EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. UFA (Unidades de fluorescencia arbitrarias) Prueba de Anova y post test de Dunnett (*p<0.05; ***p<0.0001) Prueba de Anova y test Bonferroni (xxx p<0.0001).

En la gráfica 3 se puede observar que la cantidad de ROS para cada etapa aumenta según las concentraciones del PM₁₀, de manera dosis respuesta, es decir que a medida que aumenta la concentración de 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 del tercer punto de muestreo (Av. Ricardo Duran) tiende a producir mayor cantidad de ROS en comparación a la fase I de la misma zona, esto se comprobó mediante la obtención de datos significativos con relación la dosis de 0.82m³/mL, así mismo la tendencia de la fase II indica la mayor producción de ROS.



GRÁFICA 3. Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de PM₁₀. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. UFA (Unidades de fluorescencia arbitrarias) Prueba de Anova y post test de Dunnett (* $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$) Prueba de Anova y test Bonferroni (^{xx} $p < 0.001$).

El PM₁₀ es capaz de inducir la producción de ROS después de 1 hora de exposición sostenida, aun cuando la generación de ROS tiende a disminuir conforme aumenta las horas el daño celular se mantiene evidente mediante la observación de muerte celular según afirma Chirino et al., (2010). Nuestros resultados son similares a los que fueron obtenidos por Eruslanov & Kusmartsev, (2010), de los cuales se tomó la referencia de 2 horas de exposición de las células frente al PM₁₀, dentro de este tiempo es donde la intensidad de fluorescencia alcanzan valores pico y empiezan a caer después de las 12 horas, es decir, que a las 2 horas de exposición frente al PM₁₀, las intensidades de las fluorescencias son las óptimas para realizar la medición de fluorescencia frente a las células de control no expuestas.

El PM₁₀ puede depositarse muy fácilmente en el sistema respiratorio se ha descrito que los efectos inflamatorios son inmediatos y graves por la fracción gruesa del PM, ya que esta contiene una gran cantidad compuestos orgánicos principalmente HAPs que inducen hacia una respuesta pro-inflamatoria (Montiel Dávalos, Ibarra Sánchez, Ventura Gallegos, Alfaro Moreno, & López Marure, 2010).

Los resultados de esta investigación demuestran que la producción de ROS fue mayor en una población expuesta al PM₁₀, con respecto a la que se observó en el control negativo de manera que la producción de ROS fue incrementándose en todos los casos al incubar las células con concentraciones más crecientes de PM₁₀. Jung (2012) en Corea mostro resultados similares en las células A-549 frente al PM₁₀, generando ROS de una manera dosis dependiente. Dentro de los resultados se muestra que la fase II tanto del punto de muestreo 2 y 3 presentan las concentraciones de ROS más alta con respecto al PM de la mismas zonas de la fase I, esta aseveración se sostiene en el hecho de que en un estudio similar que corresponde a la composición química del PM muestra la presencia elevada de HAPs en el estudio realizado por Gualtieri et al., (2012) y por ende una mayor concentración de de estos HAPs son los que llevarían a que el PM₁₀ recolectado en la fase II a ser un mayor productor de ROS, las etapas que se mencionaron anteriormente se podría deber a un aumento del parque automotor y por ende las emisiones de los mismos, influenciado por las temporadas.

Una vez analizados todos los resultados de la producción de ROS en células A-549, se puede observar que cada PM_{10} recolectado tiene respuesta diferente dentro del mismo ensayo, esto puede estar atribuido a que el PM_{10} tiene un potencial diferente que es influenciado por características fisicoquímicas y las influencias combinadas de las mismas como lo sostiene Querol (2008). También hay que tener en cuenta que los HAPs y otros productos químicos asociados al PM_{10} pueden ejercer efecto tanto inflamatorio como pro-inflamatorio en el sistema respiratorio e inducir a la producción de ROS, aunque hasta la presente fecha no existe un estudio el cual identifique y asocie a componentes responsables de la toxicidad del PM_{10} los que pueden ser mediadores importantes en el daño celular.

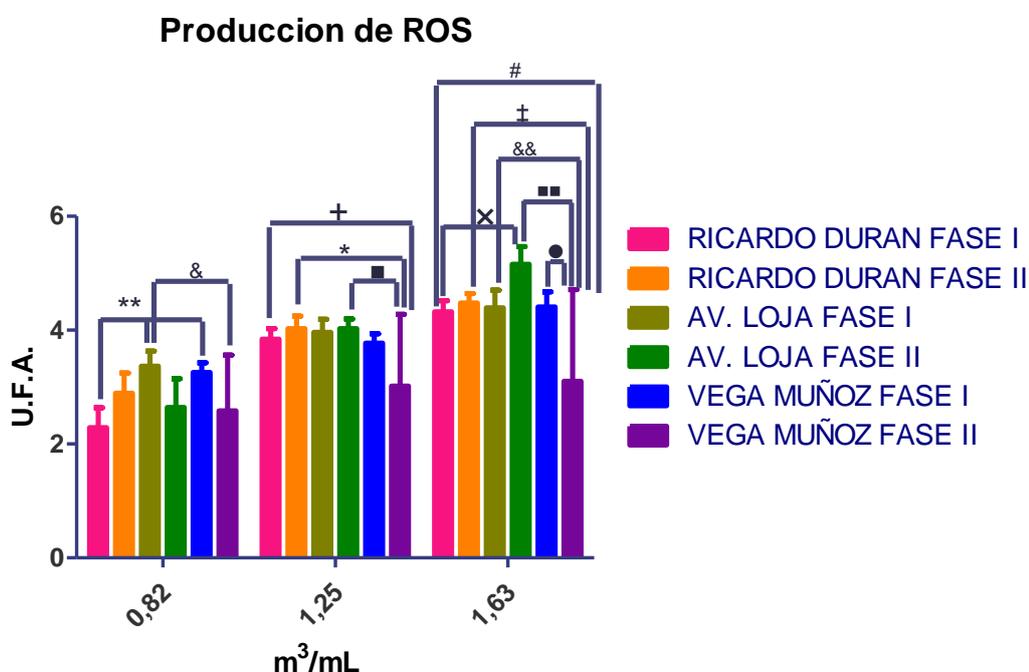
Cabe destacar que el punto que se encuentra presentando una mayor producción de ROS es el que se encuentra en la Av. Loja y Remigio Tamariz, esto se atribuye a que este lugar es el principal ingreso al Centro Histórico, el mismo que es considerado una zona de alto flujo vehicular y por ende existe una mayor concentración de HAPs dentro del PM_{10} que son derivados de lubricantes, aditivos de combustibles y del desgaste propio del motor como lo afirma Suárez & Pérez (2006).

Al comparar nuestros resultados con el estudio de la fracción acuosa de González (2014), los que fueron obtenidos bajo las mismas condiciones y al ser realizados con las mismas muestras podemos asegurar que tanto la parte acuosa como la parte soluble en un solvente orgánico se encuentran generando ROS de una manera dosis dependiente, sin embargo la parte orgánica indica que está se encuentra provocando una mayor producción de ROS que la parte acuosa, ya que prácticamente los resultados de la parte orgánica se encuentran duplicando la producción de ROS en todas sus dosis y fases. Todo esto afirma que dentro de la parte orgánica existen compuestos diferentes a los existentes dentro de la parte acuosa principalmente los HAPs los cuales son los responsables de la producción elevada de ROS. Los HAPs poseen efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutagénico estos efectos se atribuyen a la presencia conjunta de más de un compuesto la familia y sus derivados siendo los principales los nitroderivados, todos los efectos mencionados solo se pueden lograr mediante una exposición prolongada y pasando por un mecanismo de activación metabólica y la consecuente formación de aductos entre los HAPs y el DNA, todo este proceso es influenciado por la susceptibilidad individual y otros factores como la edad, sexo, etnia, estado de salud y nutrición (Mastandrea et al., 2005).

Si extrapolamos nuestros resultados podemos suponer que la exposición al PM y a una contaminación atmosférica es un riesgo ya que causarían efectos sobre la salud, conjuntamente con una dosis elevada una inadecuada remoción de ROS y los componentes reactivos que se generan en la respuesta hacia el estrés oxidativo, pueden terminar en graves efectos como disfunciones metabólicas, daño biológico y al final en inflamación pulmonar que en última instancia terminaría en cáncer de pulmón.

4.3. Comparación de la actividad citotóxica entre todos los puntos y fases.

Se realizó un análisis entre todas las fases y puntos para determinar cuál es el que estaría provocando más actividad citotóxica en la gráfica 4 se muestra el análisis realizado mediante el cual se observa que existe una diferencia significativa que hace que destaque el punto Ricardo Duran Fase I en todas sus dosis frente a Av. Loja en sus dos fases y Vega Muñoz también en sus dos fases, también a la Av. Loja en tanto en la Fase I y II las dosis de 1,25 y 1,63m³/mL frente a Vega Muñoz, por ultimo también el punto Vega Muñoz Fase I mostro diferencia significativa contra Vega Muñoz Fase II en la dosis de 1,63m³/mL.



GRÁFICA 4. Comparación de producción de Especies reactivas de oxígeno en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de PM₁₀ entre todos los puntos y fases. Cada barra representa la media ±EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. UFA (Unidades de fluorescencia arbitrarias). Ricardo Duran Fase I 0.82m³/mL vs. Av. Loja Fase I 0.82m³/mL, Vega Muñoz Fase I 0.82m³/mL (**p<0.001), Ricardo Duran Fase I 1.63m³/mL vs. Av. Loja Fase II 1.63m³/mL (x p >0.05), Ricardo Duran Fase I 1.25m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II

1.25m³/mL (+p >0.05), Ricardo Duran Fase I 1.63m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 1.63m³/mL (#p >0.001), Ricardo Duran Fase II 1.25m³/mL vs Vega Muñoz Fase II 1.25m³/mL (*p >0.01), Ricardo Duran Fase II 1.63m³/mL vs Vega Muñoz Fase II 1.63m³/mL (‡p >0.001), Av. Loja Fase I 0.82m³/mL, 1.25m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 0.82m³/mL, 1.25m³/mL (&p >0.05), Av. Loja Fase I 1.63m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 1.63m³/mL (&&p >0.001), Av. Loja Fase II 1.25m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 1.25m³/mL (■p >0.01), Av. Loja Fase II 1.63m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 1.63m³/mL (■■p >0.001), Vega Muñoz Fase I 1.63m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 1.63m³/mL (● p >0.001). Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de control (Anova y post test de Dunnett t).

Podemos concluir que el punto Ricardo Duran Fase I es que se encuentra causando mayor producción de ROS dentro de estudios in vitro realizado en la línea celular A-549 este punto tiene una mayor capacidad para inducir a la producción de ROS, el mecanismo mediante el cual se encuentra produciendo ROS aún no se puede esclarecer dentro de este estudio porque no conocemos la composición del fracción orgánica la cual se está probando, pero según estudios similares la mayor producción de ROS se atribuye a la gran reactividad de hierro (Fe) y a la reacción de Fenton que involucra al mismo, pero como se menciona que no hay un estudio de caracterización de la composición no se puede esclarecer la causa de la producción de ROS.

4.4. Evaluación de la genotoxicidad a distintas dosis de PM₁₀

El objetivo principal de esta investigación fue determinar si la parte orgánica del PM₁₀ ocasiona lesiones en el DNA de las células epiteliales alveolares (A-549), es decir determinar si la fracción orgánica soluble del PM₁₀ causa genotoxicidad en un estudio in vitro, este daño causado se valoró utilizando el ensayo cometa alcalino.

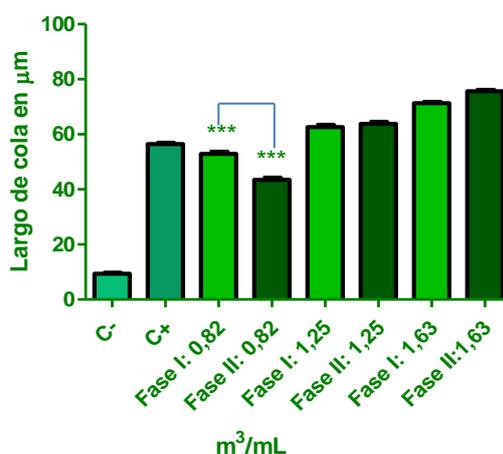
Analizamos el daño ocasionado por el PM₁₀ en el DNA observado en cultivos celulares sobre la línea celular A-549 y comparándolo con el control negativo, la comparación se lo realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, este test nos indicó que el PM₁₀ recolectado en los distintos puntos y fases está causando un efecto genotóxico sobre la línea celular A-549, existiendo una relación dosis respuesta en todos los puntos de muestreo.

El PM₁₀ está causando daño genotóxico a la línea celular A-549 y realizamos un análisis para determinar cuál de las dos fases es la que causa un daño mayor con respecto a la misma fase de los tres puntos de muestreo.

4.4.1. Comparación del efecto genotóxico de las dos fases.

4.4.1.1. Vega Muñoz y Hermano Miguel (Punto 1)

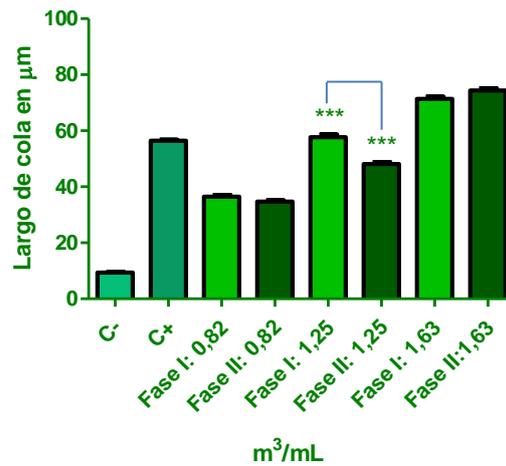
Una vez realizado el análisis se puede observar en la gráfica 5 que al comparar la dosis correspondiente se muestra que existe una diferencia significativa en la primera dosis, los valores de las siguientes dosis no son significativos por lo que la dosis de $0,82\text{m}^3/\text{mL}$ de la fase I está causando mayor daño genotóxico con respecto al punto de muestreo número 1.



GRÁFICA 5. Comparación del daño genotóxico en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de el PM_{10} de las dos fases del punto 1(Vega Muñoz y Hermano Miguel). Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. Prueba de Kruskal-Wallis (***) $p < 0.0001$.

4.4.1.2. Av. Loja y Remigio Tamariz (Punto 2)

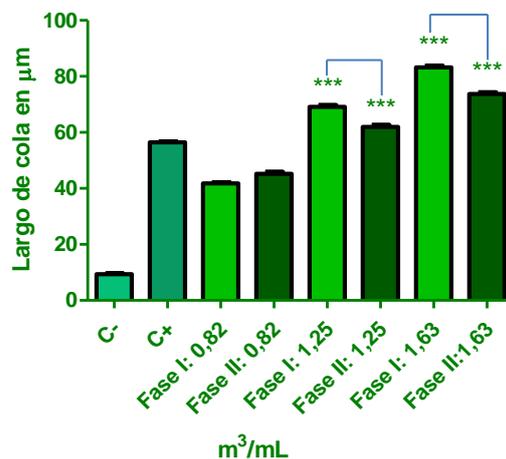
En la gráfica 6 podemos observar que al haber realizado la comparación del punto 2 de muestreo, existe una diferencia significativa en la dosis de $1,25\text{m}^3/\text{mL}$ donde se puede apreciar que es la fase I la que está causando un daño genotóxico mayor en comparación con las otras fases y dosis del mismo punto de muestreo, ya que en las otras dos dosis no existe una diferencia significativa entre ellas.



GRÁFICA 6. Comparación del daño genotóxico en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de el PM₁₀ de las dos fases del punto 2 (Av. Loja y Remigio Tamariz). Cada barra representa la media ± EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. Prueba de Kruskal-Wallis (***)p<0.0001).

4.4.1.3. Av. Ricardo Duran (Punto 3)

En la gráfica 7 la tendencia indica que el PM₁₀ de la fase I produce más efectos genotóxicos pues la segunda y tercera dosis muestran un daño genotóxico mayor mientras que en la primera dosis el test nos indica que el efecto del PM₁₀ es similar, a pesar de eso la tendencia indica que existe un mayor daño genotóxico en la primera fase.



GRÁFICA 7. Comparación del daño genotóxico en células A-549 tratadas con diferentes concentraciones de el PM₁₀ de las dos fases del punto 2 (Av. Ricardo Duran). Cada barra representa la media ± EE de tres experimentos independientes cada uno por triplicado. Prueba de Kruskal-Wallis (***)p<0.0001).

Se utilizó la versión alcalina del ensayo cometa ya que en esta podemos evaluar la formación de roturas de doble y simple cadena además de sitios álcali lábil, las

cuales son las modificaciones más importantes que se pueden observar en el DNA (Møller et al., 2014).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos mencionar que la fase 1 de los tres puntos de muestreo está causando más daño genotóxico sobre la línea celular A-549 se usó esta línea celular ya que se deriva del epitelio de pulmón humano y tiene la capacidad de transformar los compuestos en sus formas genotóxicas, además esta línea celular ha sido utilizada para evaluaciones del DNA inducido por contaminantes ambientales (Foster, Oster, Mayer, Avery, & Audus, 1998).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la fracción orgánica del PM₁₀ produce un daño genotóxico de tipo dosis respuesta, ya que al aumentar la dosis del PM₁₀ aumenta así mismo el nivel de daño en el DNA, resaltando que la fase I está causando un mayor daño que la fase II, esto no se puede a que su composición era diferente o contenía mayor cantidad de componentes ya que el PM es una mezcla de distintos componentes, no se puede atribuir a aspectos meteorológicos, sino más bien al tráfico vehicular existente y este factor es uno que no podemos controlar en el estudio.

La fracción orgánica del punto 3 (Av. Ricardo Duran) es la que se está causando un mayor daño genotóxico comparado con los otros dos puntos de muestreo, este punto presenta una vía de alta circulación vehicular además de que la mayoría de su suelo esta designado a la vivienda y existe una baja cantidad de vegetación, el daño genotóxico está siendo causado por los HAPs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) que no pudieron ser absorbidos especies fúngicas que se encuentran asociadas a la vegetación según afirma Petit et al, (2013).

En comparación con el estudio de genotoxicidad de la parte acuosa realizado por Gutiérrez (2014), se muestra claramente que la parte orgánica del PM₁₀ se encuentra provocando mayor daño genotóxico y de manera muy distinta a los resultados de la parte acuosa, esto se explica porque se encuentran compuestos que no se pudieron disolver o arrastrar en la parte acuosa pero que si están presentes en la parte orgánica principalmente algunos HAPs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos).

Es por eso que la gran cantidad de moléculas contenidas dentro de la fracción orgánica del PM₁₀ producen distintos efectos genotóxicos, y en vista que no contamos con un estudio en el cual no se detalle la composición de la parte orgánica del PM₁₀ no podemos identificar cual es el principal compuesto o interacciones de

compuestos que está causando dicho daño al DNA, pero algunos estudios atribuyen que el posible factor de daño serían los HAPs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) pero como ya se mencionó por falta de estudios se desconoce el causante real (Brits, Schoeters, & Verschaeve, 2004).

4.4.2. Comparación del efecto genotóxico entre todos los puntos y fases.

Se realizó un análisis entre todas las fase y puntos para determinar cuál es el que estaría causando más daño genotóxico para lo cual realizamos una clasificación en base al nivel de daño causado por el PM₁₀, esta clasificación se basó en 4 niveles según el largo de cola de los cometas presentes en cada dosis y fase, y al final se realizó el cálculo de GDI (Índice de Daño Genético), el cual es una medida mediante la cual podemos evaluar el daño de los distintos puntos y fases para un análisis entre todos los puntos.

En la tabla 4 se muestra el análisis de los datos resaltando los resultados significativos, estos muestran que existe un punto el cual está causando un mayor daño genotóxico que todos los demás puntos, el cual es Av. Loja Fase II 1,63m³/mL, mostrando estadísticamente que este es el punto que ha causado mayor daño genotóxico dentro del ensayo cometa realizado sobre la línea celular A-549.

Además se puede observar que el punto Av. Loja Fase II 1,63m³/mL muestra diferencia significativa con el punto Ricardo Duran Fase II 1,63m³/mL también con el punto Vega Muñoz Fase I 1,63m³/mL teniendo con estos dos puntos una diferencia bien establecida, también el mismo punto Av. Loja Fase II 1,63m³/mL muestra una diferencia contra el punto Vega Muñoz Fase II 1,63m³/mL y contra el punto Av. Loja Fase I 1,63m³/mL en este caso existe también una diferencia significativa pero no tan elevada como en el caso anterior, por último el punto de la Av. Loja Fase II 0,82m³/mL mostro una diferencia significativa con el punto Vega Muñoz Fase I 0,82m³/mL con una diferencia también no tan elevada, pero igual son resultados que nos indican que existe un daño más significativo con respecto a todos los puntos de muestreo.

TABLA 4. Análisis de daño en el DNA, tal como se mide por el ensayo de cometa, en células A-549 expuestas a diversas concentraciones de PM₁₀.

PUNTOS DE MUESTREO	FASE	DOSIS	0	I	II	III	IV	GDI
RICARDO DURAN	FASE I	C-	100	0	0	0	0	1 ± 0.00
		C+	0	5	95	0	0	1.95 ± 0.01
		0.82	0	23.33	76.66	0	0	1.76 ± 0.28
		1.25	0	0	91	9.33	0	2.09 ± 0.22
		1.63	0	0	26	72.66	0	2.70 ± 0.28
	FASE II	C-	100	0	0	0	0	1 ± 0.00
		C+	0	5	95	0	0	1.95 ± 0.01
		0.82	0	21.33	78.66	0	0	1.78 ± 0.12
		1.25	0	0	96	4	0	2.04 ± 0.14
		1.63	0	0	77.33	22.66	0	2.22 ± 0.13 **
AV LOJA	FASE I	C-	100	0	0	0	0	1 ± 0.00
		C+	0	5	95	0	0	1.95 ± 0.01
		0.82	0	58.66	41.33	0	0	1.41 ± 0.31
		1.25	1.33	1.33	94	3.33	0	1.99 ± 0.15
		1.63	0	0	76	24	0	2.24 ± 0.28 ⁺
	FASE II	C-	100	0	0	0	0	1 ± 0.00
		C+	0	5	95	0	0	1.95 ± 0.01
		0.82	0	74.66	25.33	0	0	1.25 ± 0.44 ^x
		1.25	0	16	84.00	0	0	1.84 ± 0.22
		1.63	0	0	65.99	34	0	2.33 ± 0.86 ^{**+}
VEGA MUÑOZ	FASE I	C-	100	0	0	0	0	1 ± 0.00
		C+	0	5	95	0	0	1.95 ± 0.01
		0.82	0	8.66	91.33	0	0	1.91 ± 0.11 ^x
		1.25	0	1.33	98.66	0	0	1.98 ± 0.07
		1.63	0	0	89.33	10.66		2.10 ± 0.04 ^{**}
	FASE II	C-	100	0	0	0	0	1 ± 0.00
		C+	0	5	95	0	0	1.95 ± 0.01
		0.82	0	33.33	66.66	0	0	1.66 ± 0.14
		1.25	0	0	96	4	0	2.04 ± 0.10
		1.63	0	0	74	26	0	2.26 ± 0.29 ⁺

Los resultados se muestran como la media ± EE de tres experimentos independientes. 0-IV indica los grados de daño en el DNA Categoría I: baja; II: media; III: alta y IV: Las células totalmente dañadas. GDI, índice de daño genético (Tipo I + 2 x Tipo II + 3 x Tipo III + 4 x Tipo IV) / (Tipo 0 + I + II + III + IV). Av. Loja Fase II 1.63m³/mL vs. Ricardo Duran Fase II 1.63m³/mL, Vega Muñoz Fase I 1.63m³/mL (**p<0.001), Av. Loja Fase II 1.63m³/mL vs. Vega Muñoz Fase II 1.63m³/mL, Av. Loja Fase I 1.63m³/mL (+ p > 0.05), Av. Loja Fase II 0.82m³/mL vs. Vega Muñoz Fase I 0.82m³/mL (x p > 0.05). Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de control (Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn)

De acuerdo a todos los resultados obtenidos podemos aludir que en todo el estudio indico una tendencia de dosis-dependiente, indicándonos que el daño al DNA existe y siempre va a aumentar cuando la dosis del PM₁₀ aumente según un estudio realizado el cual nos muestra que aún se pueden aumentar la dosis del PM₁₀ y seguir

aumentando el daño, por lo cual la máxima dosis que se ha probado en este estudio es de $1,63\text{m}^3/\text{mL}$, pero si se siguiera con una dosis más alta se podría mostrar un mayor tamaño de la cola del cometa como indica el estudio de Brits et al., (2004).

El daño genotóxico causado por el PM_{10} se puede atribuir a la presencia de distintos HAPs en la composición de la parte orgánica del PM_{10} como lo menciona el estudio de Brits et al., (2004), la presencia de HAPs dentro del PM_{10} esto se puede atribuir a que dentro de los puntos de muestreo se desarrolla una gran actividad automovilística por tratarse de vías muy transitadas, pero al no conocer la composición de la parte orgánica no se puede identificar con seguridad cual es el compuesto o interacciones de compuestos responsables del daño al DNA, además las concentraciones de las moléculas varían entre las muestras y es difícil atribuir el efecto solo a algunos compuestos contenidos en la muestra.

Si extrapolamos nuestros resultados podemos suponer que la exposición prolongada al PM y a una contaminación atmosférica es un riesgo ya que causarían serios efectos sobre la salud, todo esto conjuntamente con una dosis elevada puede terminar en graves efectos como alteraciones genéticas, daño biológico y al final en última instancia podría terminaría en cáncer de pulmón.

CONCLUSIONES

El estudio realizado se ejecutó en modelos in vitro arrojando resultados que aportan evidencias y apoyan a las siguientes conclusiones:

- El material particulado fracción respirable PM_{10} en una zona de flujo vehicular alto todos los puntos de muestreo pueden ser uno de los factores de riesgo que se encuentran contribuyendo a un daño tanto citotóxico y genotóxico a la población expuesta de manera dosis dependiente.
- El material particulado recolectado en el punto Av. Loja y Remigio Tamariz es el que se encuentra generando una mayor producción de ROS, sin embargo esta producción de ROS no se puede asociar al daño genotóxico porque existen otros puntos que cuentan con alta producción de ROS pero con un daño genotóxico menor.
- La fracción orgánica del PM_{10} induce un efecto genotóxico, el mismo que es dosis dependiente a mayor dosis incrementa el efecto, dentro de todas las zonas muestreadas el material particulado recolectado en el punto Av. Ricardo Duran es el que se encuentra produciendo un mayor daño genotóxico que todos los demás puntos de muestreo, pero cabe recalcar que todos los puntos causan un daño genotóxico.
- La fracción orgánica del PM_{10} se encuentra provocando una mayor producción de ROS y daño genotóxico que la fracción acuosa.

RECOMENDACIONES

- Caracterizar químicamente la fracción orgánica del PM₁₀, para identificar cuáles son exactamente las moléculas que se encuentran relacionadas con la producción de ROS y lesiones al DNA.
- Realizar investigaciones más específicas y profundas sobre las consecuencias toxicológicas debido a la heterogeneidad del PM.
- Los resultados obtenidos son indicativo para tomar medidas de control y de remediación hacia las personas que se encuentran expuestas en zonas de alta concentración de material particulado.
- Iniciar con modelos in vitro de remediación del aire que sean aplicables a la población.

BIBLIOGRAFIA

- Astudillo, A. L. (2014). ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO (PM10) DE LA ZONA URBANA DEL CANTÓN CUENCA MAGISTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL. *Tesis Previa a La Obtencion de de Titulo de Magister En Toxicologia Industrial Y Ambiental*.
- Brits, E., Schoeters, G., & Verschaeve, L. (2004). Genotoxicity of PM10 and extracted organics collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium. *Environmental Research*, 96(2), 109–118. doi:10.1016/j.envres.2004.03.006
- Brunmark, A., & Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology & Medicine*, 7(4), 435–477. doi:10.1016/0891-5849(89)90126-3
- Bunn, H. J., Dinsdale, D., Smith, T., & Grigg, J. (2001). Ultrafine particles in alveolar macrophages from normal children. *Thorax*, 56(12), 932–934. doi:10.1136/thorax.56.12.932
- Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(8), 619–631. doi:10.1038/nrg2380
- Campos, J., & Palomo, I. (2009). Polución aérea y estado protrombótico, 70(1), 41–44.
- Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A. R., Morales-Bárceñas, R., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Segura-García, Y., ... García-Cuellar, C. M. (2010). PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters*, 193(3), 209–16. doi:10.1016/j.toxlet.2010.01.009
- Cohen, S. M. (2008). Thresholds in Genotoxicity and Carcinogenicity: Urinary Bladder Carcinogenesis. *Genes and Environment*, 30(4), 132–138. doi:10.3123/jemsge.30.132
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–61. doi:10.1385/MB:26:3:249
- 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
- Durand, J. S., Gallego, A., González, I. A., Sánchez, B., Fernández, P., Garcinuño, R. M., ... Navarro, R. (2012). Contaminación atmosférica, 101.
- EPA., U. S. (2004). Air Quality Criteria for Particulate Matter (Final Report, Oct 2004). *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA 600/P-99/002aF-bF*. doi:EPA 600/P-99/002aF-bF
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 594, 57–72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1-4
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for

drug metabolism. *Experimental Cell Research*, 243(2), 359–66.
doi:10.1006/excr.1998.4172

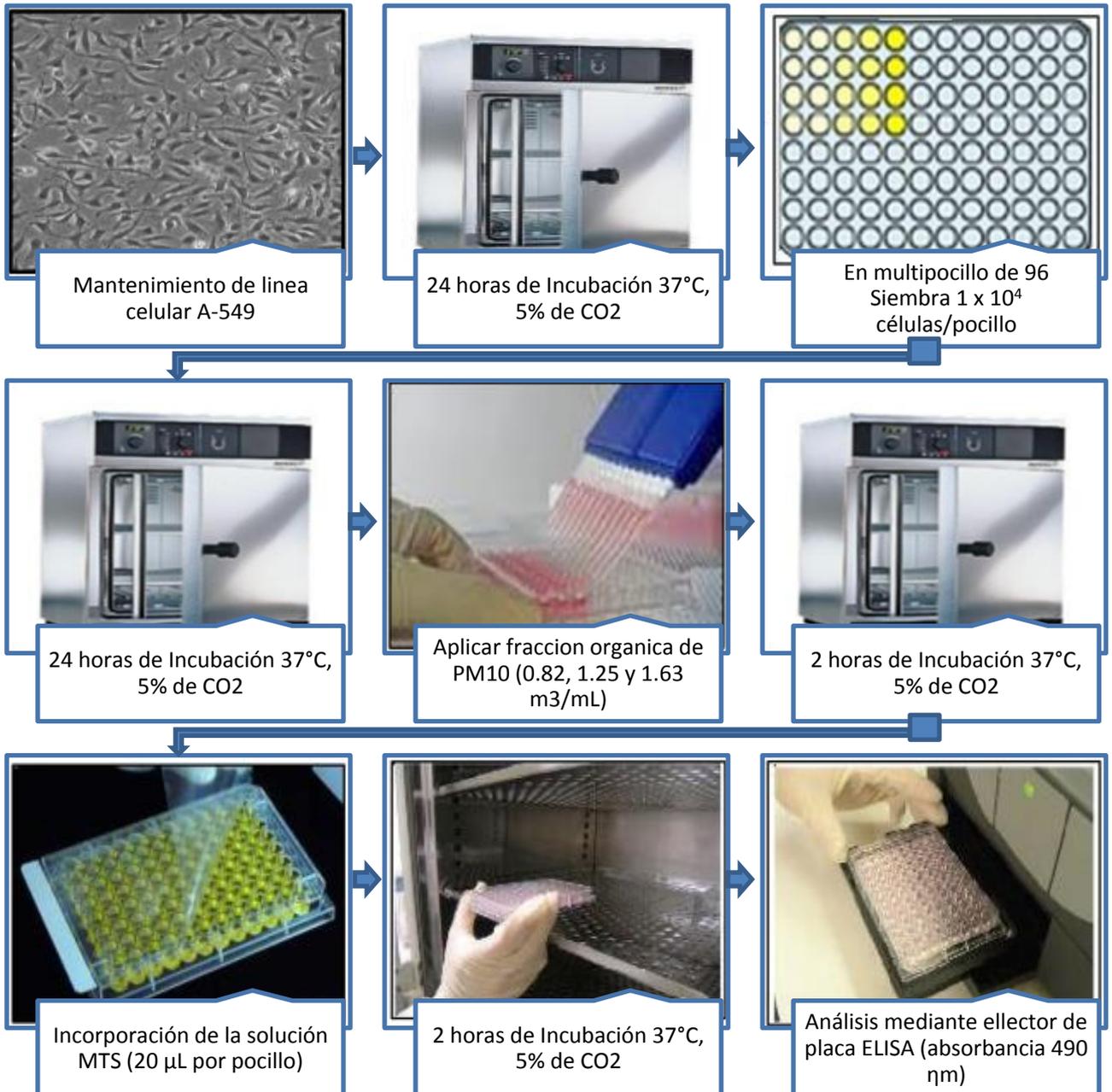
- Garcia F, M. F., & Carreras A, H. A. (2008). Genotoxicity analysis of particle formed material collected in two cities in the Province of Cordoba, Argentina, by means of a Micronuclei Assay., 17(1).
- Gastell, P. L. P., & De Alejo, J. L. P. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192–198.
- Gillies, J. A., Etyemezian, V., Kuhns, H., Nikolic, D., & Gillette, D. A. (2005). Effect of vehicle characteristics on unpaved road dust emissions. In *Atmospheric Environment* (Vol. 39, pp. 2341–2347). doi:10.1016/j.atmosenv.2004.05.064
- González Arevalo, G. J. (2014). Actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM10) de la zona urbana del canton Cuenca en la Linea celular humana A-549. *Tesis Previa a La Obtencion de de Titulo de Bioquimico Farmaceutico*, 49.
- Gualtieri, M., Longhin, E., Mattioli, M., Mantecca, P., Tinaglia, V., Mangano, E., ... Battaglia, C. (2012). Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5. *Toxicology Letters*, 209(2), 136–145. doi:10.1016/j.toxlet.2011.11.015
- Gutiérrez Valle, I. A. (2014). Evaluación del daño genotóxico de la línea celular A-549 expuesta al material particulado (PM10) recogido en la zona urbana del cantón Cuenca. *Tesis Previa a La Obtencion de de Titulo de Biologo*, 49.
- Gutierrez-Castillo, M. E., Roubicek, D. A., Cebrian-Garcia, M. E., Vizcaya-Ruiz, A. D., Sordo-Cedeno, M., & Ostrosky-Wegman, P. (2006). Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS*, 47(3), 199–211.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S14–S22.
doi:10.1016/0002-9343(91)90279-7
- 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
- Kelly, F. J. (2003). Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occupational and Environmental Medicine*, 60(8), 612–616. doi:10.1136/oem.60.8.612
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 6(4), 229–234.
doi:10.1179/135100001101536373
- Li, X. Y., Gilmour, P. S., Donaldson, K., & MacNee, W. (1996). Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax*, 51(12), 1216–1222. doi:10.1136/thx.51.12.1216

- Machado, A., Velazquez, H., García, N., García, C., Acosta, L., Córdova, A., & Linares, M. (2007). Metales en PM10 y su dispersión en una zona de alto tráfico vehicular. *Interciencia*, 32(5), 312–317.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Héctor, S., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), 27–36. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572005000100006&..>
- Møller, P., Danielsen, P. H., Karottki, D. G., Jantzen, K., Roursgaard, M., Klingberg, H., ... Loft, S. (2014). Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 762, 133–166. doi:10.1016/j.mrrev.2014.09.001
- Montiel Dávalos, A., Ibarra Sánchez, M. de J., Ventura Gallegos, J. L., Alfaro Moreno, E., & López Marure, R. (2010). Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 24(1), 135–41. doi:10.1016/j.tiv.2009.08.004
- 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*. doi:10.1155/2013/279371
- 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
- Ostro, B. D., Hurley, S., & Lipsett, M. J. (1999). Air pollution and daily mortality in the Coachella Valley, California: a study of PM10 dominated by coarse particles. *Environmental Research*, 81(3), 231–238. doi:10.1006/enrs.1999.3978
- Petit A, K., Colina L, J., Yegres E, F., Moran G, H., & Richard-yegres, N. (2013). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo , podredumbre blanca , y acíbar de Aloe vera Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungi isolated from water co. *Revista Química Viva*, 3.
- Pope, C. A., Dockery, D. W., Spengler, J. D., & Raizenne, M. E. (1991). Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *The American Review of Respiratory Disease*, 144(3 Pt 1), 668–74. doi:10.1164/ajrccm/144.3_Pt_1.668
- Querol, X. (2008). Calidad del aire, partículas en suspensión y metales. *Revista Espanola de Salud Publica*, 82(5), 447–453. doi:10.1590/S1135-57272008000500001
- Querol, X., Alastuey, A., Rodriguez, S., Plana, F., Mantilla, E., & Ruiz, C. R. (2001). Monitoring of PM10 and PM2.5 around primary particulate anthropogenic emission sources. *Atmospheric Environment*, 35(5), 845–858. doi:10.1016/S1352-2310(00)00387-3
- Ramirez, R., Esparza Ponce, H., Varela Sortillón, A., Astorga Reyes, A., & Roman B, A. (2009). Characterization of Inhalable Particulate Matter in Ambient Air by Scanning Electron Microscopy and Energy-Dispersive X-ray Analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 15(S2), 1320–1321. doi:10.1017/S1431927609097335

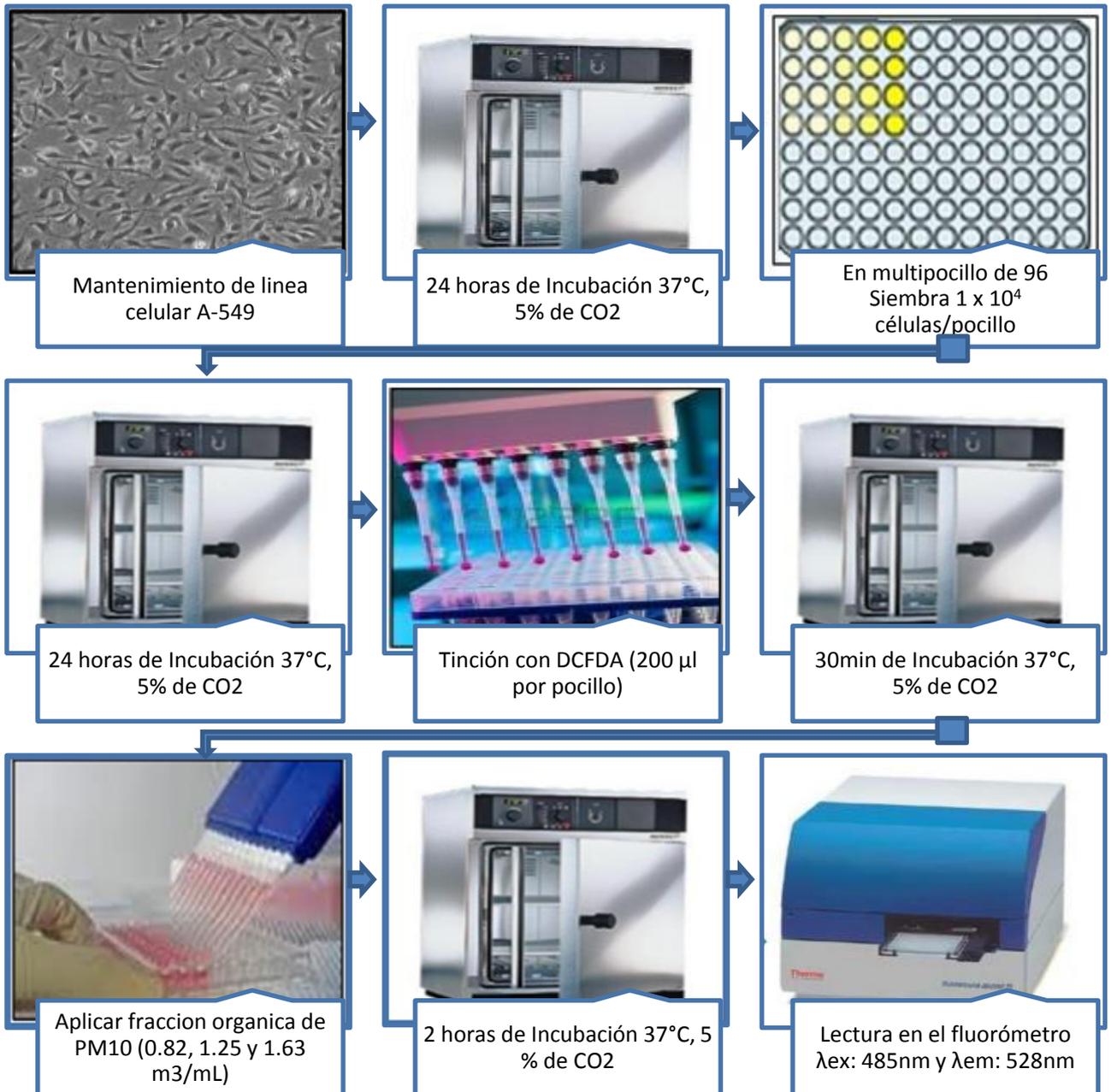
- Ricardo Beleño, H., Alfonso Quijano, P., & Iván Meléndez, G. (2013). Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM2.5 en Cúcuta, Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 18(SUPPL.), 3731–3737.
- Ristovski, Z. D., Miljevic, B., Surawski, N. C., Morawska, L., Fong, K. M., Goh, F., & Yang, I. a. (2012). Respiratory health effects of diesel particulate matter. *Respirology*, 17(2), 201–212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126432>
- Suárez, V. D., & Pérez, C. P. (2006). Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras, 3, 308–322.
- Tancell, P. J., Rhead, M. M., Pemberton, R. D., & Braven, J. (1996). Diesel combustion of an alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon. *Fuel*, 75, 717–723–.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Villalobos-Pietrini, R., Blanco, S., & Gomez-Arroyo, S. (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmospheric Environment*. doi:10.1016/1352-2310(94)00247-I
- Westerdahl, D., Fruin, S., Sax, T., Fine, P. M., & Sioutas, C. (2005). Mobile platform measurements of ultrafine particles and associated pollutant concentrations on freeways and residential streets in Los Angeles. *Atmospheric Environment*, 39(20), 3597–3610. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.02.034

ANEXOS

Anexo1. Esquema de Viabilidad Celular por MTS



Anexo 2. Esquema para determinación de ROS.



Anexo 3. Esquema de ensayo Cometa

