Efecto Genotóxico del material particulado PM2.5 recolectado en la zona urbana de Cuenca - Ecuador sobre la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1

Narváez M[1], Astudillo A , García N [†], Moscoso D[1], Mejía D[1], Vásquez P[1], Maza D[2], Bailón N[3].*

[1] Centro de Estudios Ambientales, Universidad de Cuenca (CEA), Cuenca-Ecuador.
[2] Departamento de Química y Ciencias Exactas, Sección de Ingeniería Ambiental de la Universidad Técnica Particular de Loja_Ecuador.
[3] Departamento de Ciencias de la Salud, Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja_Ecuador.

Resumen: Estudios toxicológicos y epidemiológicos ponen de manifiesto que el material particulado (PM) específicamente el $PM_{2.5}$ tiene efectos negativos significativos en la salud humana, asociado con mortalidad, insuficiencia cardíaca, trastornos respiratorios, enfermedades pulmonares y cáncer. La toxicidad y el efecto inflamatorio de estas partículas están relacionados con su tamaño y características químicas. En este estudio se determinaron las características químicas de las fracciones acuosas y orgánicas solubles del $PM_{2.5}$ recolectado en tres sitios de monitoreo del área urbana de la ciudad de Cuenca-Ecuador y se evaluó su actividad genotóxica mediante el ensayo del cometa en la línea celular de ovario de hámster chino, CHO-K1. El análisis gravimétrico de las muestras reveló que dos de los sitios de estudio superaron el límite de 25 µg/m^3 establecido por la Organización Mundial de la Salud. En la caracterización de las fracciones acuosas y orgánicas se determinó la presencia de metales como el hierro y zinc e hidrocarburos aromáticos tales como el benzo(a) antraceno respectivamente. Las células fueron expuestas a 3,26 m^3 de aire /mL de los extractos acuosos y 1,63 m^3 de aire/mL de los extractos orgánicos. Finalmente se observó que los extractos obtenidos de $PM_{2.5}$ inducen daño genotóxico en la longitud del largo de cola medido mediante el ensayo del cometa; este tipo de daño pueden atribuirse a la combinación de las especies químicas detectadas.

Palabras claves: Material particulado; genotoxicidad; ensayo del cometa; metales pesados; hidrocarburos aromáticos; $PM_{2.5}$.

Abstract: ***Genotoxic effect of $PM_{2.5}$ particulate material collected in the urban area of the city of Cuenca - Ecuador in the Chinese hamster ovary cells line CHO-K1*.**

Toxicological and epidemiological studies have a manifesto that particulate matter (PM), specifically $PM_{2.5}$ has negative effects on human health, associated with mortality, heart failure, respiratory disorders, lung diseases, and cancer. The toxicity and inflammatory effect of these particles are related to their size and chemical characteristics. The objective of this study was to determine the characteristics of the soluble aqueous and organic fractions of the particulate material $PM_{2.5}$ collected in the monitoring sites of the urban area of the city of Cuenca-Ecuador and to evaluate its genotoxic activity by means of the test of the comet of in the Chinese hamster ovary cells line CHO-K1. The gravimetric analysis of the samples revealed that two of the study sites exceeded the limit of 25 ug / m^3 established by the WHO. In the characterization of water and organic fractions, the presence of metals such as Fe and Zn and aromatic hydrocarbons such as benzo(a) anthracene determined, respectively. Cells were exposed to 3,26 m^3 of air /mL of aqueous extracts and 1,63 m^3 of air/ mL of organic extracts. Finally, it was observed that the extracts obtained from $PM_{2.5}$ induce genotoxic in the length of tail length measured by the comet assay; this type of damage can be attributed to the combination of the detected chemical species.

Keywords: Particulate matter; genotoxicity; comet assay; heavy metals; aromatic hydrocarbons

Introducción

El desarrollo industrial y el crecimiento urbano asociados a las emisiones de una variedad de fuentes, incluyendo la combustión de gasolina y diésel así como las industriales, ha traído como consecuencia el deterioro del ambiente, afectando la calidad del aire (Lacasaña et al., 1999; Vasconcellos et al., 2007). Entre los distintos contaminantes del aire, el material particulado (PM) constituye uno de los más importantes por sus efectos asociados con la química de los procesos atmosféricos, el clima (Sienra et al., 2002; Vasconcellos et al., 2007), y la salud, (Pope III et al., 2002; Valavanidis et al., 2008) induciendo en algunos casos enfermedades cardiovasculares (Shah et al., 2013), respiratorias (Porredon et al., 2014), y trastornos neurodegenerativos. El PM está formado por una mezcla de partículas finas y ultrafinas, presentado mayor interés las partículas $PM_{2.5}$ ya que pueden ingresar en los pulmones, que por su gran superficie de contacto, pueden absorber diversas sustancias de conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) (Abou et al.,2007; Bełcik et al., 2018; Gutiérrez et al., 2006), especies aniónicas y catiónicas, (Astudillo et al., 2015), las cuales asociadas a las partículas atmosféricas inducen estrés oxidativo en las células, las mismas que inician con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), capaces de inducir cambios en ciclo redox celular y por tanto desencadenar una serie de eventos en cascada como la apoptosis, inflamación y daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Actualmente, por convención internacional se encuentran reguladas y consideradas como contaminantes críticos, las partículas en suspensión de PM_{10} ($\leq$ 10 µm) y $PM_{2.5}$ ($\leq$ 2.5 µm), por su presunta contribución en la mortalidad y morbilidad por afecciones a largo plazo como el decremento en la función pulmonar y la aparición de cáncer (Sahagún, 2009). La presente investigación tiene por objetivo caracterizar químicamente las fracciones acuosas y orgánicas solubles del material particulado $PM_{2.5}$; y evaluar sobre la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1), el posible efecto genotóxico mediante el ensayo del cometa, el cual es un método rápido, sensible y económico. Dicho análisis pone de manifiesto la hipótesis de que los metales pesados e hidrocarburos aromáticos presentes en los extractos solubles de $PM_{2.5}$ estarían relacionados con los daños genotóxicos ocasionados en las células tras 24 horas (h) de exposición.

Metodología

Selección de sitios de estudio

La selección de los puntos de monitoreo se realizó en función de un estudio preliminar, ejecutado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, cuyo objetivo fue determinar las áreas con mayores concentraciones de material particulado. Se seleccionaron tres puntos que se consideraron significativos recogidos en la Figura 1 y cuyas coordenadas geográficas son: punto P1 (2°53’37,63”S 79° 0’13,92”O) localizado en el centro histórico de la ciudad, el cual se caracteriza por presentar altas emisiones vehiculares y poca vegetación; punto P2 (2°53’7,86”S 79° 0’33,23”O) localizado al oeste de la ciudad, este sector está designado de acuerdo a la ordenanza de uso de suelo como vivienda y el punto P3 (2°54’48,19”S 79° 2’14,08”O), asignado de acuerdo a la ordenanza como uso principal vivienda. (Figura 1).

Recolección de las muestras y determinación de las concentraciones

Se empleó un equipo de bajo caudal (Partisol 2000i), con un flujo de 16,3 L de aire/min. Se utilizaron filtros de fibra de teflón de 47 mm de diámetro y 2 µm de poro. Los filtros fueron expuestos a 24 h de monitoreo (Legal Information Institute, 1992). La concentración de las partículas fue determinada por análisis gravimétrico, previa

*e-mail: *monica.narvaez@ucuenca.edu.ec*

estabilización de los filtros (40 % - 45 %) de humedad relativa y temperatura (entre 15 ºC y 30 ºC), pesados antes y después de la recolección. Las concentraciones fueron corregidas de acuerdo a lo establecido en la normativa nacional ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio de Ambiente (Lexis Finder, 2015).

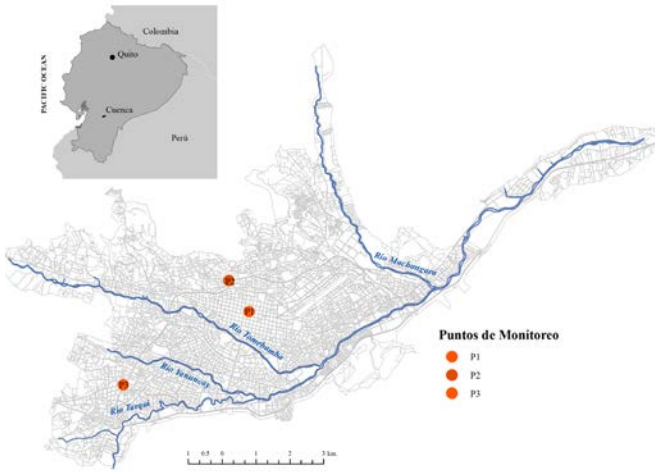


Figura 1: Mapa de las zonas de monitoreo de material particulado PM $_{2,5}$

Obtención del extracto acuoso soluble de material particulado y su caracterización

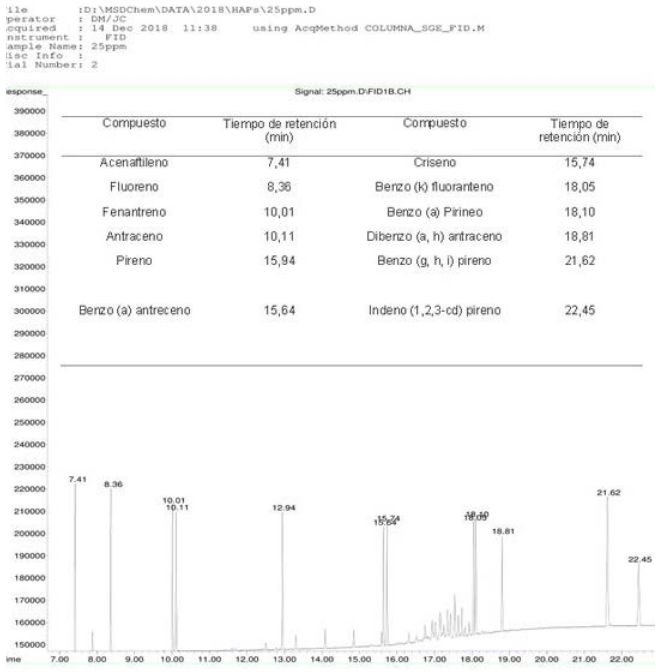
Las partículas contenidas en los filtros fueron extraídas con agua ultra pura, empleando un equipo de ultrasonido modelo Cole- Parmer 8894, durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente el extracto fue centrifugado a 2500 g durante 30 min para sedimentar la materia insoluble. Las soluciones frescas preparadas fueron almacenadas a 4 ºC, para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad. Para el análisis de los metales pesados Fe, Al, Ni, Pb, Cu; en los extractos acuosos se empleó el método analítico NIOSH 7082 por espectroscopia de absorción atómica, empleando el equipo de marca Perkin Elmer AA400.(The Perkin-Elmer Corporation, 1996)

Obtención del extracto orgánico soluble de material particulado y su caracterización

Para los extractos orgánicos los filtros fueron sonicados con 10 mL de una mezcla diclorometano-acetona **(50% - 50%)** durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio a 10 mL, y fueron centrifugados a 2500 g durante 30 min, el sobrenadante fue evaporado a sequedad y posteriormente resuspendido en 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), las muestras fueron almacenadas a 4 ºC, para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad. Para la caracterización de los extractos orgánicos, [benzo (b) fluoranteno], [benzo(a) pireno], [benzo(a) antraceno], y [fenantreno], se aplicó el método adaptado de referencia EPA 610 PAH (Environmental Protectión Agency, 1984). La cuantificación se realizó mediante un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N en detector FID (Flame Ionization Detector) y se utilizó una columna ID-BPX5 de 50 m de longitud, 0,22 mm de diámetro y de 0,25 µm de porosidad. Para la cuantificación de los HAPs se utilizó el estándar de 13 hidrocarburos de Sigma-Aldrich (catálogo# 48953-U EPA 525 PAH MIX-A, 1X1 ML, 500 mg). El análisis CG-FID se realizó en las siguientes condiciones de operación: detector FID a 250 °C mezcla (ml/min): Aire 300 – H_2 30 – N_2 45. Se inyectó 1 µl en modo splitless a 250 °C. La temperatura inicial fue 45 °C por 1 min y se incrementó de la siguiente manera 25 °C/min hasta llegar a 200 °C, 8 °C/min hasta 280 °C, 10 °C/min hasta 330 °C durante 5 min. El tiempo de análisis es de 25 min. El gas de arrastre empleado fue He con un flujo de 1,8 mL/min. La temperatura de inyección fue 250 °C. (Figura 2).

Modelo Biológico

Para los ensayos biológicos se empleó células CHO-K1 que fue cultivada en medio base HAMF-12 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), L-glutamina (2 mM, GIBCO



Compuesto	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Tiempo de retención (min)
Acenaftileno	7,41	Criseno	15,74
Fluoreno	8,36	Benzo (k) fluoranteno	18,05
Fenantreno	10,01	Benzo (a) Pirineo	18,10
Antraceno	10,11	Dibenzo (a, h) antraceno	18,81
Pireno	15,94	Benzo (g, h, i) pireno	21,62
Benzo (a) antreceno	15,64	Indeno (1,2,3-cd) pireno	22,45

Figura 2: Cromatograma y picos registrados para los compuestos orgánicos

Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y antibiótico-antimicótico (100 unidades/ml de Penicilina G, 100 µg/mL de Estreptomicina y 25 µg/mL de Amfotericina B, GIBCO Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda con el 5 % de CO_2, con un tiempo de duplicación de 24 h. Las células fueron expuestas a distintas concentraciones (0,82 m^3 de aire/mL, 1,63 m^3 de aire /mL y 3,23 m^3 de aire /mL) tanto de extractos acuosos como de los extractos orgánicos. Como control positivo, se usó el doxorrubicina 2 µM. Además, se trabajó como control negativo de células en agua destilada, y los blancos de cultivo celular con soluciones acuosas y orgánicas de filtros libres de partículas.

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos, con un total de 3,5 x 10^3 células por pocillo, se incubó por 24 h, transcurrido este tiempo se adicionó el tratamiento respectivo por 24 h de exposición.

Ensayo de citotoxicidad por FDA/BrEt

Tras 24 h de exposición se realizó el ensayo de viabilidad según el protocolo descrito por Jones y Senft (Jones, 1985), con ligeras modificaciones. A la suspensión celular se adicionó una solución de diacetato de fluoresceína (5 mg/mL) – bromuro de etidio (0,2 mg/mL). Se contabilizaron 200 células por placa cada una por duplicado y se analizó en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus).

Determinación de daño genotóxico mediante ensayo del cometa in vitro en células CHO-K1

El protocolo para el ensayo cometa se fundamentó en el descrito por (Olive y Banáth, 2006) adaptado a las condiciones del laboratorio. Transcurrido el tiempo de exposición, las células fueron tripsinizadas y lavadas con medio suplementado, dos veces consecutivas. Las células se suspendieron con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión 1 % (LMP) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 37 ºC y fueron colocadas sobre un portaobjetos que contenía una capa de agarosa. Se añadió una tercera capa de agarosa LMP. Las placas fueron colocadas

en una solución de lisis [10 % de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1 % Tritón X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2,5M NaCl (Merck), 100 mM EDTA (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA), 10 mM Tris (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) y pH 10] por 24 h. Desde este paso en adelante se trabajó en oscuridad, a 4 ºC. Posteriormente, las placas se dejaron reposar en un buffer de electroforesis [300 mM NaOH (Merck Germany), 1mM EDTA, pH>13], por un período de 20 min. La electroforesis se efectuó en condiciones de 25 voltios, 300 mili-Amperios durante 20 min. Después de este tiempo, las placas se colocaron en una solución de neutralización (pH 7,5), y deshidratadas con metanol para su análisis posterior.

Para el análisis, se tiñeron con 60 µL de bromuro de etidio (1,5 µg/mL). En el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus), se analizaron 100 células, en cada placa, mediante el uso del software Comet Assay IV, que permiten obtener parámetros de medición de la migración del ADN, donde se evaluaron dos parámetros, la longitud de la cola del cometa medida desde el centro del núcleo hacia el final de la cola. El otro parámetro fue el porcentaje de ADN en la cola dado por 100 multiplicado por la intensidad del ADN en cola con respecto a la intesidad del ADN en la célula.

El análisis estadístico para los ensayos de viabilidad y efectos genotóxicos se realizó mediante el análisis estadístico de varianza (ANOVA), seguido del test Dunnet. En el caso del ensayo genotóxico se aplicó el estadígrafo de Kruskal-Wallis usando el programa GraphPad Prism 8.0.

Resultados

Concentraciones de $PM_{2.5}$

El análisis de las concentraciones de $PM_{2.5}$ muestra valores similares en los puntos P1 y P3. El punto P2 presenta una concentración significativamente menor en comparación a los otros sitios de estudio ($p < 0,001$) (Tabla 1).

Tabla 1. *Concentración promedio de 22 muestras de material particulado $PM_{2.5}$ recolectado durante un período de 24 h continuas, con intervalos de tres días, en cada sitio de estudio.*

Sitios de estudio	Concentración mínima (µg/m^3)**	Concentración máxima (µg/m^3)**	Concentración promedio (µg/m^3)** ±DS
P1	16,09	59,56	29,81*±11,44
P2	5,44	38,52	19,93 ±10,25
P3	16,20	60,14	37,31*±14,02

El monitoreo se realizó de acuerdo a los estipulado en la normativa Nacional Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del ministerio del Ambiente, Libro VI, Anexo IV, el equipo empleado para la recolección de las muestras fue el Partisol 2000i. (*) Concentraciones que superan la normativa dada por la OMS (25,00 µg/m^3). (**) µg de PM/ m^3 de aire.

Caracterización de la fracción acuosa.

Los resultados de la caracterización de la fracción acuosa del $PM_{2.5}$ no registraron valores de concentración para Ni, Pb y Cd. Sin embargo, se registraron concentraciones de Fe y Zn (Tabla 2). De acuerdo a la normativa Española (INSHT) (Instituto Nacional de Seguridad y Bienestar en el Trabajo (INSSBT), O.A., 2018) los tres puntos de monitoreo sobrepasaron el límite de exposición permitido para el Fe (1,00 mg/m^3). Como se observa en la Tabla 2, todos los sitios de muestreo, sobrepasan la normativa canadiense (Astete et al., 2014) para Zn (120 µg/m^3).

Tabla 2. *Concentraciones de metales pesados presentes en las 22 muestras del extracto acuoso de material particulado $PM_{2.5}$ de los sitios de estudio, mediante técnica de espectrometría de absorción atómica.*

Sitios de estudio	Fe mg/L	Zn mg/L	Ni mg/L	Pb mg/L	Cd mg/L
P1	1,42	0,11	N.C.	N.C.	N.C.
P2	1,46	0,10	N.C.	N.C.	N.C.
P3	2,25	0,19	N.C.	N.C.	N.C.

Método: Digestión ácida y lectura por espectrometría absorción atómica, Equipo Perkin Elmer Aanalyst 400. Límite de detección de Cadmio: 0,03 mg/L, límite de detección de Plomo: 0,15 mg/L, límite de detección de Níquel: 0,10 mg/L; N.C. =No cuantificado.
En la fracción orgánica de los extractos de $PM_{2.5}$; el único elemento identificado fue el benzo(a) antraceno en el punto P1, con una concentración igual 3,63 ppm.

Caracterización de la fracción orgánica

En la caracterización de los extractos para la determinación de HAPs mediante GC-FID se preparó una curva de calibración a partir de 3, 5, 10 y 25 mg/L del mix HAPs obteniendo un coeficiente de correlación $r2 \geq 0.995$ en cada uno.

En la figura 2 se presenta los tiempos de retención de los compuestos orgánicos en estudio.

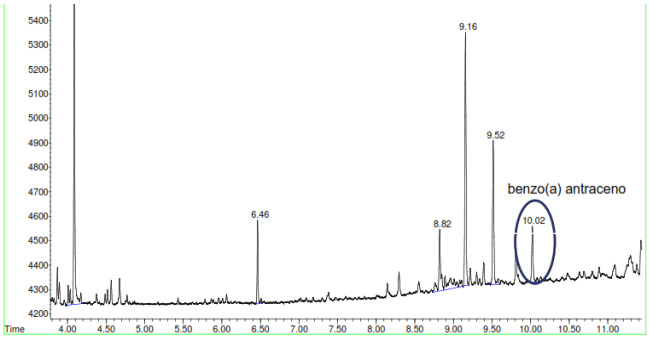


Figura 3: GC-FID del punto P1 presencia de benzo(a) antraceno

Luego se evaluaron las muestras de los extractos dando como resultado en una muestra la presencia de benzo(a) antraceno a un tiempo de retención de 15,656 con una concentración de 3,64 mg/L. (Figura 3).

Ensayo cometa para la evaluación de genotoxicidad.

Se determinó la viabilidad de las células expuestas a los extractos a 0,82

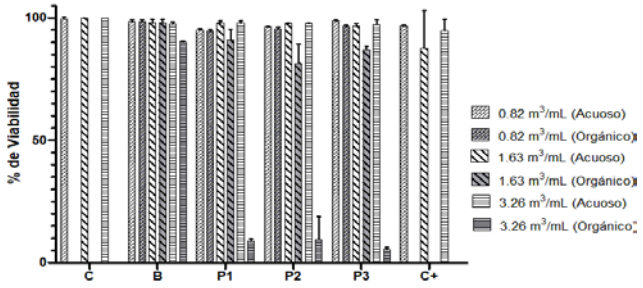


Figura 4: Porcentaje de Viabilidad de células CHO-K1 expuestas a diferentes concentraciones de las fracciones acuosas y fracciones orgánicas. Los datos representan 3 experimentos por duplicado.

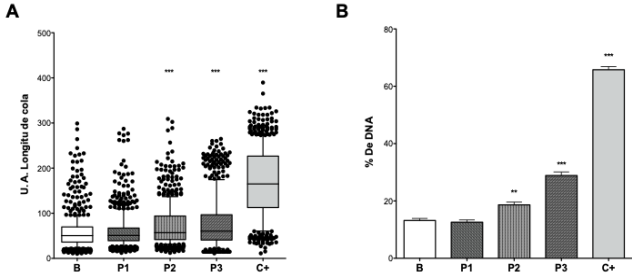


Figura 5: Efectos en el DNA en células CHO expuestas a los extractos acuosos (3,26 m^3/mL). A. Longitud de la cola. B. % de DNA en la cola. Test Kruskal-Wallis y post test Dunns. Los datos representan 3 experimentos por duplicado. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

m^3/mL; 1,63 m^3/mL y 3,26 m^3/mL; sin embargo, la viabilidad de las células en el extracto orgánico a 3,26 m^3/mL fue menor al 20 % mientras que las células expuestas al extracto acuoso en ambas concentraciones la viabilidad es mayor al 90 %, lo que se consideró que los extractos orgánicos se probaran a 1,63 m^3/mL mientras que los extractos acuosos a 3,26 m^3/mL 8 (Figura 4); dosis adecuadas para realizar los ensayos de genotoxicidad. De los dos parámetros analizados del ensayo del cometa asociados a la exposición a 3,26 m^3/mL, los extractos acuosos de material particulado $PM_{2.5}$ indican que hay diferencias significativas ($p < 0,0001$) tanto en la longitud de cola como en el porcentaje de ADN al comparar con el Blanco (B) en los sitios de muestreo P2 y P3 (Figura 5).

Al exponer las células a los extractos orgánicos a una dosis más baja debido a sus efectos en la viabilidad, no existen diferencias significativas de la longitud de cola del cometa entre los puntos y el blanco (B). Sin embargo, en intensidad existe diferencia con respecto al punto P1 (Figura 6).

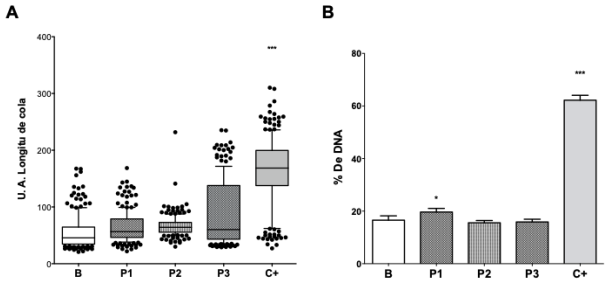


Figura 6: Determinación de los parámetros que afectan el DNA de la línea celular de hámster chino CHO-expuestas a los extractos orgánicos (1,63 m^3/mL) A. Longitud de la cola.B. % de DNA en la cola. Test Kruskal-Wallis y post test Dunns. Los datos representan 3 experimentos por duplicado. * $p < 0.01$;*** $p < 0.0001$

Discusión

Concentración del material particulado 2.5 ($PM_{2.5}$)

Las concentraciones de $PM_{2.5}$ están condicionadas al uso de suelo. Registrándose las mayores concentraciones en los sectores donde la actividad comercial y flujo vehicular son elevados, coincidiendo con lo manifestado por otros investigadores quienes afirman que la mayor frecuencia de exposición a contaminantes mutágenos ocurre en las ciudades con mayor intensidad de tráfico vehicular (Morales y Arias, 2013). Las concentraciones reportadas en los tres sitios de monitoreo superan los 25 µg/m^3, valor límite estipulado en la guía de calidad del aire de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005). Un hallazgo interesante es que el punto de estudio P2, localizado a mayor altitud, presenta menores concentraciones $PM_{2.5}$ coincidiendo con lo manifestado por (Opazo, 2009), quien establece que aquellas estaciones que están ubicadas en lugares muy altos registran los niveles más bajos de contaminación, siendo la altura un factor que influye en la determinación de las concentraciones de PM (Opazo, 2009).

Caracterización de los extractos acuosos

De los elementos caracterizados en el extracto acuoso, el que mostró una tendencia general de niveles más altos fue el Fe. Esta observación es consistente con los resultados reportados en la literatura (Quijano et al., 2010 ; Astudillo et al., 2015). Estudios previos manifiestan que la presencia de este elemento en el aire ambiente podría atribuirse a las fracciones geoquímicas, tráfico vehicular y fuentes industriales (Fernández et al., 2000). Seguido de este se registran concentraciones de Zn, el cual está formando parte de aditivos de lubricantes, además de las fracciones geoquímicas (Ewen et al., 2009). El Fe es un elemento señalado como irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal al ser inhalado. Además en casos de exposición prolongada a una mezcla de polvo de Fe y otros metales la función pulmonar se ha visto comprometida (Astudillo et al., 2015). Un hallazgo inesperado fue que la caracterización del extracto acuoso de $PM_{2.5}$ no permitió cuantificar concentraciones de Ni, Pb y Cd; probablemente por el limitante de detección del método (Astudillo et al., 2015). Este hallazgo resulta contrario a lo manifestado en otras investigaciones donde se reportan elevadas concentraciones de estos metales (Ewen et al., 2009; Quijano et al., 2014; Quijano et al., 2010; Bełcik et al., 2018), los cuales son responsables de ocasionar efectos genotóxicos. Sería recomendable estudios posteriores que permitan establecer con mayor precisión su concentración.

Caracterización de los extractos orgánicos

Al realizar la caracterización de la fracción orgánica de los extractos de $PM_{2.5}$ en los tres sitios de estudio, no se registran concentraciones para benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno y fenantreno. Este hallazgo fue inesperado, dado que otras investigaciones evidencian que el material particulado tiene como parte de su composición compuestos orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Atkinson y Arey 1994; Hu et al., 2018; Quijano y Meléndez, 2014). La concentración tóxica equivalente de benzo(a) antraceno determinada en el punto P1 igual a 3,635 ppm excede el valor propuesto por la Comisión Europea, cuyo valor límite es de 1 ng/m^3 lo que sugiere que existe riesgo para la salud de los habitantes (Vargas et al., 2013). Una posible explicación de la ausencia de los compuestos podría ser la limitada cantidad de muestra analizada, o el limitante de la detección del método.

Ensayo cometa para la evaluación de genotoxicidad.

Los efectos que ocasionan las diferentes concentraciones de material particulado con metales pesados e hidrocarburos aromáticos sobre las células CHO-K1, se evaluaron mediante los parámetros de longitud de cola y porcentaje de DNA en la cola. En las dosis probadas todas generan un daño en la longitud de la cola, en el caso de la intensidad se observan diferencias con las dosis de los extractos acuosos y sólo con el punto P1 de los extractos orgánicos que es justamente donde se pudo detectar el benzo(a) antraceno. Actualmente la mayoría de estudios mencionan que la exposición a diferentes concentraciones de metales en el aire ambiente puede ser un factor de incremento en la incidencia de cáncer (Pope III et al., 2002). En virtud de ello se recomienda estudios futuros donde se tome en consideración una caracterización completa, donde se vinculen los metales, hidrocarburos y especies iónicas, además mayor número de muestra. Estos hechos coinciden con la investigación de Gutiérrez et al., (2006).

El ensayo cometa presenta mayor ventaja en la detección de genotóxicos, debido a la capacidad de resolver si un agente produce daños en el DNA a bajas dosis, manejo sencillo, bajo costo y reproducible (Afanasieva, 2018). El daño genotóxico causado por los extractos acuosos en la línea celular CHO-K1, medido por la migración del DNA de las células (largo de cola del cometa) podría estar asociado a la presencia de los metales como el Fe y Zn. Otras investigaciones han reportado resultados similares en cuanto a la aplicación de tratamientos acuosos en la línea celular del epitelio alveolar A 549 (Gutiérrez et al., 2006 Astudillo et al., 2015). Es posible que existan variables que podrían estar afectando los resultados como los mecanismos de acción de los componentes y las interacciones entre ellos (Astudillo et al., 2015). Siendo por lo tanto la caracterización de la composición un elemento crucial en la evaluación sobre los efectos en la salud (Gutiérrez et al., 2006). Estudios previos manifiestan que las mezclas de químicos genotóxicos pueden sufrir una variedad de interacciones, que se expresan como aditivas, sinérgicas y antagónicas (Silva et al., 2011; Ortiz et al., 2012; Quintero et al., 2009). En este estudio se encontró también la presencia de benzo (a) antraceno reconocido según la EPA el en grupo 2A como probablemente carcinogénicos para humanos; además se observó la asociación de un parámetro (longitud de cola) del daño genotóxico y el tratamiento con extractos orgánicos, reconociendo que existe una afectación a la salud de la población (Quijano et al., 2014).

Conclusiones

El $PM_{2.5}$ es referido como un contaminante criterio, por la OMS, el cual ocasiona severos problemas de salud en la población expuesta, debido a la asociación de fracciones químicas orgánicas e inorgánicas. Dos áreas de estudio superaron las concentraciones de $PM_{2.5}$ establecidas por la OMS. Los efectos genotóxicos ocasionados sobre la línea celular de hámster chino CHO-K1 por la aplicación de los tratamientos acuosos fueron observados a una concentración de 3,26 m^3/mL en dos áreas de estudio. Para el caso de los extractos orgánicos, estos extractos generan un mayor daño citotóxico por lo que los análisis genotóxicos se realizaron a una concentración de 1,63 m^3/mL. El efecto genotóxico resultó positivo únicamente en el % de DNA en el P1 que pudiera estar relacionado con su composición orgánica. Futuras investigaciones deben considerar el análisis de las fracciones insolubles y evaluar otros tipos de contaminantes que pudieran estar presentes en la fracciones del material particulado. Finalmente el estudio resalta la importancia de generar investigación relacionada con los impactos de este tipo de contaminante, y aportar con información para la elaboración de un marco legal nacional donde se tomen en consideración límites permisibles de los elementos vinculados a este contaminante.

Agradecimientos

El presente trabajo se ha desarrollado en el contexto del Proyecto: "Genotoxicidad del material particulado ($PM_{2.5}$) suspendido en el aire de la zona urbana de Cuenca" Ganador del XIV Concurso de Proyectos de la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca DIUC, financiado por el mismo. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad de Cuenca, Dirección de Investigación (DIUC), Centro de Estudios Ambientales (CEA) y Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador (PROY_CCSAL_1334) por el respaldo institucional prestado en esta investigación, la cual pretende generar conciencia sobre los problemas de contaminación ambiental en nuestro país y establecer pautas para un cambio sostenible.

Por la contribución técnica al desarrollo de éste trabajo agradecemos a Andrea Álvarez, Katherine Arrobo, Ana Herrera, Cristina Cueva y Diana Brazales.

Bibliografía

1. Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. Biophysical chemistry. 2018; 238 1-7
2. Astete J, Gastañaga M, Pérez D. Niveles de metales pesados en el ambiente y su exposición en la población luego de cinco años de exploración minera en las Bambas de Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2010; 31(4) 695-701.
3. Astudillo A, Ramírez M, García N, González G, Gutiérrez I, Bailón N. Caracterización química del material particulado PM 10 de la zona urbana de Cuenca-Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549. Revista de Toxicología. 2015; 32 (2), 121-126.
4. Atkinson R, Arey J. Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. Environmental Health Perspectives.1994; 102 (4), 117-126.
5. Abou O, Joyeux M, Nerrière E, PierresStrub M, Navier D. Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: an assessment within a personal exposure study. Chemosphere, 2007; 66 (7), 1375-1381.
6. Bełcik M, Trusz A, Zaczyńska E, Czarny A, Piekarska K. Genotoxic and cytotoxic properties of PM2. 5 collected over the year in Wrocław (Poland). Science of The Total Environment, 2018; 637 (638), 480-497.
7. Dockery D, Pope C. Arden. Acute respiratory effects of particulate air pollution. Annual review of public health. 1994; 15 (1), 107-132.
8. Environmental Protectión Agency. Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: United States: 1984.
9. Ewen C, Anagnostopoulou M, Ward N. Monitoring of heavy metal levels in roadside dusts of Thessaloniki, Greece in relation to motor vehicle traffic density and flow. Environmental Monitoring and Assessment. 2009; 157 (1-4), 483-498.
10. Fernández A, Ternero M, Barragán F, Jiménez J. An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation. Chemosphere-Global Change Science. 2000; 2 (2), 123-136.
11. Gutiérrez M, Roubicek D, Cebrián M, De Vizcaya A, Sordo M, Ostrosky P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. Environmental and molecular mutagenesis. 2006; 47 (3), 199-211.
12. Hu R, Liu G, Zhang H, Xue H, Wang X, Wang R. Particle-Associated Polycyclic
13. Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Atmosphere of Hefei, China: Levels,
14. Characterizations and Health Risks. Archives of environmental contamination and

    toxicology. 2018; 74 (3), 442-451.
15. Instituto Nacional de Seguridad y Bienestar en el Trabajo (INSSBT), O.A., M. P.[sede web]. España. (2018). Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España.[acceso 07 de febrero de 2020]. Disponible en https://www.insst.es/
16. Jones K, Senft J. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. Journal of .Histochemistry & Cytochemistry. 1985; 33 (1), 77-79.
17. Lacasaña M, Aguilar C, Romieu I. Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres megaciudades de América Latina. Salud pública de México. 1999; 41 (3), 203-215.
18. Legal Information Institute. [Sede web]. New York. Cornell Law School. 2006 [actualizado 17 de octubre 2006, acceso 07 de febrero de 2020]. Disponible en https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/appendix-O_to_part_50.
19. Lexis Finder [sede web]. Ecuador. Registro Oficial - Edición Especial No. 387 2015; [actualizado el 04 de noviembre de 2015, acceso 07 de febrero de 2020] Disponible en http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/Acuerdo-097.pdf.
20. Morales T, Arias J. Contaminación Vehicular en la Conurbación Pereira-Dosquebradas. Revista Luna Azul. 2013; 37, 101-129.
21. Olive L, Banath J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nature Protocols. Health and Medicine 2006; 1 (1), 23.
22. Opazo D. Distribución espacial de la contaminación por material particulado y su relación con las temperaturas del aire y los vientos en Santiago para el año 2009. [Tesis en Internet]. Universidad de Chile. Chile: 2011 [acceso 3 de febrero de 2020]. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2011/aq-opazo_d/pdfAmont/aq-opazo_d.pdf.
23. Ortiz I, Peláez C, Orozco L, Zuleta M. Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. Biomédica. 2012; 32 (3), 437-448.
24. Quijano A, Meléndez I, Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (haps) en el aire de Cúcuta-Colombia: Efecto gen tóxico. Revista EIA. 2014; 11 (21), 79-87.

25. Organización Mundial de la salud y equipo de salud ambiental. (2006). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre: actualización mundial 2005. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. https://apps.who.int/iris/handle/10665/69478.

26. Pope III C, Burnett R, Thurston G, Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. Jam. 2002; 287 (9), 1132-1141.

27. Porredon C, Ramos D, Serret J, González J, Borrás M, De Lapuente J. Basis for the toxicological evaluation of engineered nanomaterials. Revista de Toxicología. 2014; 31 (1), 9-22.

28. Quijano A, Quijano M, Henao A. Caracterización fisicoquímica del material particulado fracción respirable PM2.5 en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. Bistua: revista de la facultad de Ciencias Básicas. 2010; 8 (1), 1-20.

29. Quintero M, Valencia A, Ortiz I. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. Medicina UPB. 2009; 28. (1), 33-41.

30. Quijano A, Meléndez I. Identificación de hidrocarburos aromáticos Poli cíclicos (HaPs) en el aire de Cúcuta-Colombia: Efecto Gentóxico. Revista EIA; 2014; 11(21), 79-87.

31. Silva M, Rojas E, Valverde M. Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. Oxidative medicine and cellular longevity. 2011; 2011 (2), 935160.

32. Sahagún, M. Efecto genotóxico de la partículas Atmosféricas Urbanas. [Tesis en Internet]. Tesis Doctoral. Tesis de Pregrado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIIEMAD):2009 [acceso 3 de febrero del 2020]. Disponible en: https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7530/EFECTOGENO.pdf?sequence=1

33. Shah A, Langrish J, Nair H, McAllister D; Hunter A, Donaldson P. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. The Lancet. 2013; 382 (9897), 1039-1048.

34. Sienra M, Préndez M, Romero R. Metodología para la extracción, fraccionamiento y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en material particulado urbano. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 2002; 47(4), 311-324.

35. The Perkin-Elmer Corporation. Atomic Absorption Spectroscopy Analytical Methods. Unites States of America. The Perkin-Elmer Corporation. 1996.

36. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. Journal of Environmental Science and Health, Part C. 2008; 26. (4), 339-362.

37. Vargas M, Romero G, Palencia A, Rivero E, Pinero S. Equivalentes tóxicos de hidrocarburos aromáticos políciclicos en particulado atmosférico en Valencia, Venezuela. Acta toxicológica argentina. 2013; 21 (2), 69-77.

38. Vasconcellos P, Balasubramanian R, Bruns R, Sanchez O, Andrade M, Flues M. Water-soluble ions and trace metals in airborne particles over urban areas of the state of São Paulo, Brazil: influences of local sources and long range transport. Water, air, and soil pollution. 2007; 186. (1-4), 63-73.