

Caracterización química del material particulado PM₁₀ de la zona urbana de Cuenca- Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549

Astudillo Alemán AL^{1*}, Ramírez Orellana MI², García Alvear NB¹, González Arévalo GJ², Gutiérrez Valle IA², Bailón Moscoso NC²

¹Centro de Estudios Ambientales, Universidad de Cuenca (CEA), Cuenca-Ecuador.

²Departamento de Ciencias de la Salud, Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja, Loja-Ecuador.

Resumen: La exposición a partículas ambientales es un factor de riesgo que ocasiona daños en la salud humana, como trastornos respiratorios, cardiovasculares y cáncer. La toxicidad y el efecto inflamatorio de estas partículas están relacionados con su tamaño y características químicas. El objetivo de este estudio fue determinar las características químicas de la fracción hidrosoluble de Material Particulado PM₁₀, recolectado en tres sitios de monitoreo de la ciudad de Cuenca-Ecuador, y evaluar su actividad genotóxica e inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular epitelial alveolar humana A-549. Las muestras fueron recolectadas empleando un equipo de bajo volumen. Las concentraciones de material particulado determinadas por análisis gravimétrico superaron en los tres puntos de estudio los 50 µg/m³, límite estipulado en la Legislación Ecuatoriana. En la caracterización de la solución acuosa se determinó la presencia de aniones (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) y metales pesados (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Mn), mediante técnicas de cromatografía iónica y espectroscopía de absorción atómica respectivamente; SO₄²⁻ y Fe presentaron las mayores concentraciones. Las células A-549 fueron expuestas a diferentes concentraciones (0,82; 1,25 y 1,63 m³/mL) de la fracción hidrosoluble de PM₁₀, con la finalidad de observar el posible efecto genotóxico mediante el ensayo del cometa y la inducción de especies reactivas de oxígeno mediante fluorimetría. Finalmente se determinó que los extractos acuosolubles de PM₁₀ inducen daño celular bajo (tipo I), e incrementan la producción de ROS en células A-549, lo que pudiera constituir un riesgo en la salud de la población expuesta.

Palabras claves: genotoxicidad, PM₁₀, ensayo del cometa, ROS, Cuenca-Ecuador.

Abstract: Chemical characterization and study of the genotoxicity and induction of oxidative stress of particulate material PM₁₀ from the urban area of Cuenca -Ecuador. Exposure to environmental particles is a risk factor that causes damage to human health, such as respiratory and cardiovascular diseases and cancer. The toxicity and inflammatory effects of these particles is related to their size and chemical characteristics. The aim of this study was to determine the chemical characteristics of the aqueous fraction of Particulate Matter PM₁₀, collected in three monitoring sites Cuenca-Ecuador, and to evaluate their genotoxic activity and induction of reactive oxygen species (ROS) in human alveolar epithelial cell line A-549. Samples were collected using a low volume equipment. Particulate matter concentrations determined by gravimetric analysis in the three study points exceeded the 50 µg / m³ limit stated in the Ecuadorian legislation. In the characterization of the aqueous solution the presence of anions (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) and heavy metals (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Mn) was determined by ion chromatography techniques and atomic absorption spectroscopy, respectively; SO₄²⁻ and Fe showed the highest concentrations. The A-549 cells were exposed to different

concentrations (0.82, 1.25 and 1.63 m³ / mL) fraction of water-soluble PM₁₀, in order to observe the possible genotoxic effect by the comet assay and the amount inducing reactive oxygen species by fluorimetry. It was finally determined that the aqueous -soluble extracts of PM₁₀ induce cell damage under (type I), and increase the production of ROS in cells A-549, which could pose a risk to the health of the exposed population of the city of Cuenca

Keywords: genotoxicity, PM₁₀, comet Assay, ROS, Cuenca-Ecuador.

Introducción

La contaminación ambiental se ha considerado un tema de preocupación social, ya que numerosos estudios han demostrado que la exposición a material particulado atmosférico (MP) tiene fuertes asociaciones con impactos significativos en la salud humana, y pueden inducir enfermedades cardiovasculares [1], respiratorias [2], y trastornos neurodegenerativos. El MP contiene compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) [3] y sus derivados, metales pesados, óxidos de azufre y de nitrógeno [4]. Se postula que los efectos adversos de las partículas atmosféricas provienen de la inducción de estrés oxidativo en la células, que inicia con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), capaces de inducir cambios en ciclo redox celular y por tanto desencadenar una serie de eventos en cascada como la inflamación, apoptosis y daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [5]. Actualmente, por convención internacional se encuentran reguladas y consideradas como contaminantes críticos, las partículas suspendidas PM₁₀ (≤ 10 µm) y PM_{2.5} (≤ 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 cáncer [6]. En el Ecuador, en el año 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) atribuyó 807 defunciones a causa de la contaminación del aire. Según *Ambient (outdoor) air pollution in cities database 2014*, [7]. Cuenca es la cuarta ciudad del Ecuador con mayor índice de material particulado suspendido en el aire urbano. Esto es debido al creciente desarrollo de la industria local y de su parque automotor, del cual se estima una proyección de crecimiento de 10.000 vehículos por año. En la presente investigación se caracterizó químicamente la fracción acuosoluble del material particulado PM₁₀, recolectado en tres puntos estratégicos de la ciudad de Cuenca, y se evaluó sobre la línea celular epitelial alveolar humana A-549, el efecto genotóxico mediante el ensayo del cometa, el cual es un método rápido, económico y sensible [8] y se cuantificó los ROS, a través de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA), una de las técnicas ampliamente utilizada para medir directamente el estado redox de una célula [9]

Material y métodos

Reactivos y materiales

Fluorosein diacetato (FDA), Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFDA) Dimetilsulfóxido (DMSO), Triton 100X y HBSS (Solución salina equilibrada de Hank's) fueron adquiridos a Sigma Chemical

*e-mail: anilua33@hotmail.com

Co. Ltd. Agarosa de normal punto de fusión (NMA), Acido etilenediaminetetraacetico (Na-EDTA), RPMI medio, antibiótico y antimicótico 100X, L- glutamina, ultra pura, tris, suero fetal bovino y tripsina fueron adquiridos a GIBCO TM Invitrogen Corporation (USA). Hidróxido de Sodio, Cloruro de Sodio, metanol y bicarbonato de sodio fueron proporcionados por Merck KGaA (Germany). Agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y bromuro de etidio 10mg/mL provienen de Promega Corporation (USA). Frascos plásticos para cultivo celular y microtubos fueron adquiridos a Axygen and Nunc. Los filtros de ester celulosa fueron proporcionados por Merck millipore.

Selección de los sitios de monitoreo

La selección de los puntos de monitoreo se hizo en base a las conclusiones de un estudio previo, desarrollado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca en el año 2006, donde se demuestra los altos niveles de material particulado PM₁₀ presentes en la ciudad, y se estableció las zonas de mayor generación [10]. Se seleccionaron tres puntos que se consideraron representativos cuyas coordenadas geográficas son: el P1 (2°53'39.31"S, 79°0'4.62"O), se encuentra localizada en un área cuyo uso de suelo está designado a la gestión y administración, comercio, servicios generales y vivienda. Este punto se ubicada en el Centro Histórico de la ciudad, el mismo que se caracteriza por presentar altas emisiones de vehículos y poca vegetación. El punto P2 (2°54'02.91"S, 79° 0'52.30"O), representa una zona principal de ingreso al Centro Histórico, es considerada una zona de alto flujo vehicular. Se caracteriza por ser un área de gestión y administración, comercio, servicios generales y vivienda. P3 (2°55'10.04"S, 79°03'8.07"O) cuyo uso de suelo esta designado a la vivienda.

Recolección de las muestras

Se empleó un equipo de muestreo de bajo volumen (Low Vol de F y J modelo LV-2), con un flujo constante de 100L/min, para filtrar 6m³ de aire por hora. Para la recolección se emplearon filtros de membrana de éster celulosa con diámetro de poro de 0,8 micras. El equipo de monitoreo fue instalado a una altura de 3 metros sobre el nivel del suelo. Se realizaron dos fases de monitoreo por cada punto de estudio, recolectando en cada fase treinta filtros, los cuales fueron colocados diariamente, durante un tiempo de exposición de seis horas, durante sesenta días en cada punto, de lunes a viernes en consideración a que la actividad humana en la ciudad y el incremento del movimiento vehicular se inician aproximadamente a las 06:00 horas y dura aproximadamente hasta las 20:00 horas.

La concentración de las partículas (µg/m³) fue determinada por análisis gravimétrico, previa estabilización de los filtros (40% - 45% de humedad relativa y temperatura de entre 15°C y 30°C) pesando antes y después de la recolección [11].

Corrección de la concentración

Se emplearon datos de temperatura y condiciones ambientales de la estación meteorológica del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca para llevar a cabo la corrección de la concentración, como lo señala la norma ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria [12].

Caracterización del PM₁₀

Mediante muestreos aleatorios, se seleccionó diez muestras de PM₁₀ de cada fase del monitoreo. De las muestras seleccionadas, cinco se emplearon para la determinación de metales pesados (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd, Mn) y cinco para el análisis de aniones (Cl⁻, NO₃⁻ y SO₄²⁻). El método analítico empleado para determinar la presencia de metales en los filtros fue el NIOSH 7082 (por espectroscopía de absorción atómica), que consiste en el ataque ácido del filtro hasta disolución total del mismo y completa solubilización de los metales, aforo a un volumen conocido, homogeneización y lectura en el equipo de absorción atómica [13]. Para la determinación de aniones se empleó el método adaptado de referencia EPA 330.1[14], que

emplea un volumen determinado de muestra acuosa, usualmente 5ml son filtrados por un micro filtro de celulosa de 0,45µm. Un mililitro de este filtrado es analizado con cromatografía líquida de alta eficiencia con una columna en fase reversa. Para cualificar y cuantificar los aniones se elaboraron curvas de calibración de diferentes rangos. Los aniones se analizaron mediante cromatografía líquida iónica, primero los aniones fueron separados en la columna, y posteriormente analizados con el detector de conductividad. Para el caso de los filtros de material particulado se usó una cantidad determinada de muestra, la misma que se obtuvo de varios lavados con de agua desionizada, esta solución sigue el procedimiento normal de análisis con el equipo y técnica antes mencionada.

Extracción de la fracción acuosa de las partículas

El material particulado contenido en los filtros se extrajo con agua ultra pura, por ultrasonificación durante 15min a temperatura ambiente, empleando un ultrasonido marca Cole-Parmer 8894. Por cada fase de monitoreo se obtuvieron 40 mL de solución o extracto acuoso, el mismo que corresponde al lavado de veinte muestras. Posteriormente el extracto acuoso fue centrifugado a 2500 g durante 30 min para sedimentar la materia insoluble. Las soluciones frescas preparadas fueron almacenadas a 4°C para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad y ROS.

Modelo celular y dosis

Para los ensayos biológicos se utilizó la línea celular humana de pulmón A-549, que fue cultivada en medio base de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L- glutamina (2 mM) y 1% antibiótico-antimicótico (100 Unidades/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de amphotericina B). El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂, con un tiempo de duplicación de 24 h. Las células fueron expuestas a tres concentraciones distintas (0,82, 1,25 y 1,63 m³/mL) de MP. Como control positivo, se usó peróxido de hidrógeno 1 µM para la producción de ROS y etilmetanosulfonato (EMS) 2 µM para ensayo del cometa. Además se trabajó como control negativo, las células con el agua destilada donde se disolvieron las partículas a una concentración de 1.63 m³/mL.

Ensayo de citotoxicidad por FDA/BrEt (Viabilidad celular)

Para realizar el ensayo de doble tinción FDA/BrEt [8] se sembraron las células en placas de 6 multipocillos, con un total de 2 x10⁵ células/pocillo, se incubó durante 24 horas, transcurrido este periodo se adicionaron los tratamientos. Luego de 24 horas de exposición se cultivaron por 24 horas más, y se procedió a realizar el ensayo de viabilidad según protocolo descrito por Jones y Senft [15], con ligeras modificaciones. A la suspensión celular se adicionó una solución de diacetato de fluoresceína (FDA; 5mg/mL) – bromuro de etidio (EtBr; 0,2mg/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 Especies Reactivas de Oxígeno por Fluorometría

Para la evaluación de la producción de estrés oxidativo se utilizó diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador de especies reactivas de oxígeno [9] Para la realización de los ensayos se sembró 1x10⁴ células/pocillo en multipca de 96 pocillos, en medio de cultivo RPMI suplementado, se incubó durante 24 horas, transcurrido este tiempo, las células fueron incubadas con 200 µL de DCFDA 40 µM en solución salina de Hank's (HBSS) y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se expuso las células a las concentraciones de material particulado (PM₁₀) y sus controles. Se incubó la placa por 2 horas a 37°C. La fluorescencia DCFDA se midió después de la exposición en un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation) a una λ_{ex}: 485nm y λ_{em}: 528 nm. El estrés oxidativo se cuantificó en función a la intensidad de fluorescencia relativa proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno.

Determinación de daño genotóxico mediante ensayo del cometa in vitro en células A-549

El protocolo para el ensayo cometa se fundamentó en el descrito por Tice, la versión alcalina [8], adaptado a las condiciones del laboratorio. Se realizaron tres ensayos independientes cada uno por duplicado incluido los controles. Para la cuantificación del daño genotóxico se evaluó la migración del ADN contabilizando visualmente 50 cometas por placa, en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo 40x. Con estos resultados se procedió a establecer categorías de daño celular en base a lo establecido por Carballo [16], en la cual se consideran de 4 a 5 categorías de acuerdo con el largo de cola del cometa: Categoría I: bajo (<20µm); Categoría II: medio (20-40µm); Categoría III: alto (40-80µm) y Categoría IV: células totalmente dañadas (>80µm).

Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes cada uno por duplicado (ensayo cometa y viabilidad) o triplicado (ROS por fluorometría) para cada concentración. El análisis estadístico para los ensayos de viabilidad y determinación de ROS se realizó mediante el análisis estadístico de varianza (ANOVA), seguido del test Dunnett. En el caso del ensayo genotóxico se aplicó el estadígrafo de Kruskal-Wallis, el test de rangos de Mann Whitney y Dunnett, usando los programas estadísticos SPSS y GraphPad Prism 5.

Las concentraciones de material particulado PM₁₀ registradas en los tres sitios de estudio sobrepasan los 50 µg/m³, valor establecido como límite en la Normativa Nacional Ecuatoriana [12]. Cabe indicar que este límite se toma únicamente como referencia ya que el monitoreo se realizó por períodos inferiores a 365 días tal como lo indica la normativa. Las mayores concentraciones de PM₁₀ se registran en el punto P3, seguido del punto P2 y finalmente el punto P1 (Figura 1A).

Caracterización del material particulado

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de los cationes y aniones determinados en las muestras de PM₁₀ recolectadas en los sitios de monitoreo, durante la primera y segunda etapa respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 1 el elemento en mayor concentración en los tres puntos de estudio en ambas etapas de monitoreo es el Fe, con una variación de 1888,88 ng/m³ en el punto P1 y 3180,55 ng/m³ en el punto P3, en la primera etapa, en la segunda etapa, con una concentración mínima de 3981,11 ng/m³ en el punto P1 y una concentración máxima de 4777,77 ng/m³ en el punto P2. Nuestros resultados muestran que las concentraciones registradas para los metales Mn, Zn, Cu y Ni en las dos etapas oscilan entre 26,83 y 274,05 ng/m³. Sólo en el P1, de la primera etapa fue posible establecer la concentración de Ni; los elementos Cr y Cd no fueron detectados por el equipo de absorción atómica en tres puntos de monitoreo en las

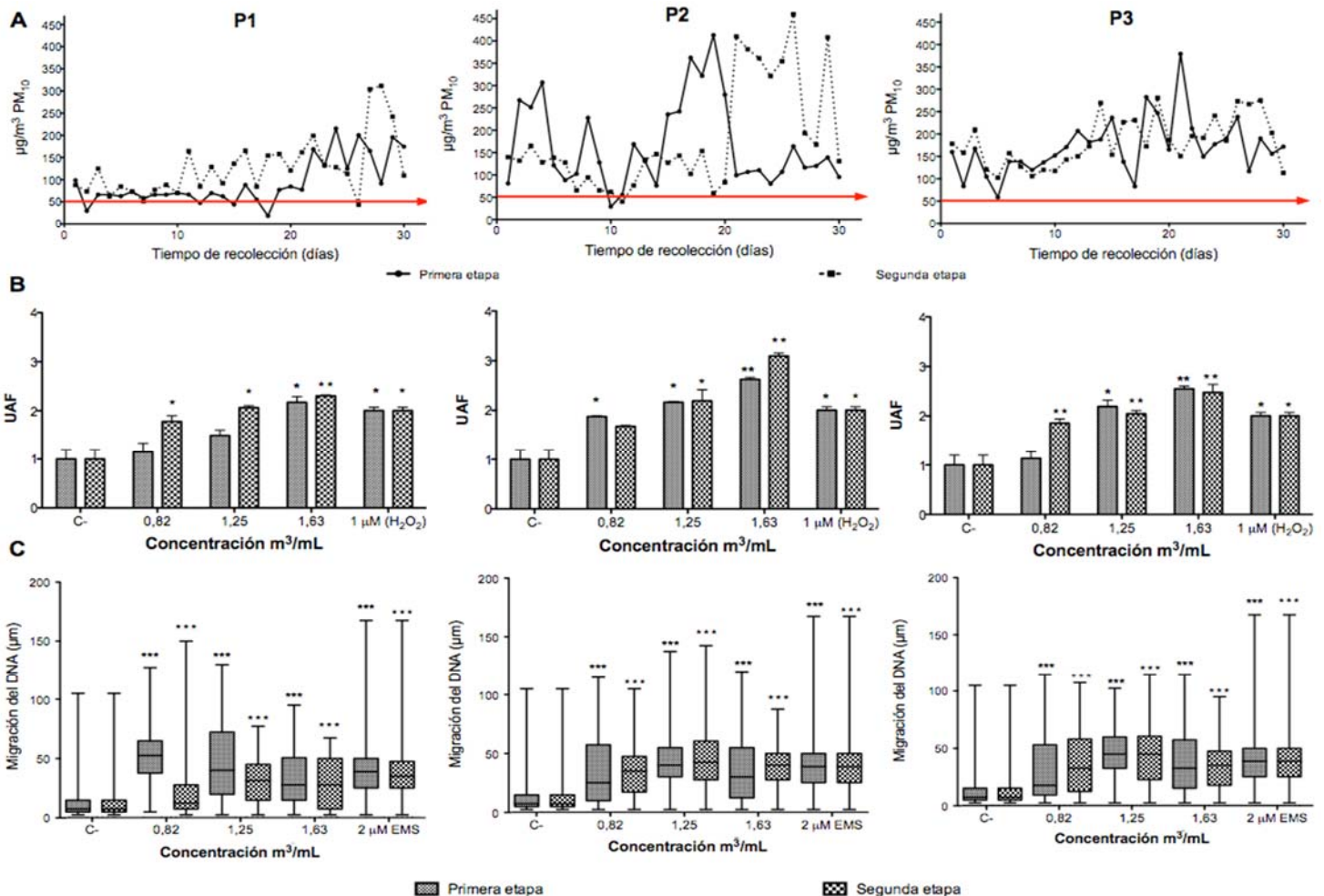


Figura 1: Concentración de PM₁₀ y efecto inductor de ROS y genotóxico. **A** Representa la concentración de PM₁₀ recolectado en los tres puntos de monitoreo de la Ciudad de Cuenca-Ecuador. La línea en 50 µg/m³, representa el límite permitido por la Normativa Nacional Ecuatoriana. **B** Determinación de inducción de ROS en la línea celular A549, cada barra representa la media de tres ensayos independientes cada uno por triplicado ± el error estándar. Test ANOVA y post test Kruskal- Wallis (*p<0,01; **p< 0,005, ★ p<0,01; ★★ p<0,005). **C** Efecto genotóxico del PM₁₀ sobre la línea celular A-549, medido del ensayo del cometa. Test Kruskal - Wallis y post test Dunnett. Cada dato representa la media de tres experimentos independientes por duplicado ± error estándar (**p<0,0001; ★★p<0,0001)

Resultados

dos etapas, probablemente debido a que el límite de detección de estos

elementos de acuerdo al método es superior a los que pudieron haber existido en las muestras analizadas de material particulado PM10.

En cuanto a los aniones, en la primera etapa, los aniones SO4²⁻ se presentan en mayor concentración en los tres puntos de estudio, registrándose un máximo de 781,95 ng/m³ en el punto P3 y un mínimo en el punto P1 con una concentración de 28,66 ng/m³. Los aniones nitrato registran valores de concentración superiores a los Cl⁻, con un concentración máxima en el punto P3 de 710,77 ng/m³ y una concentración mínima de 19,94 ng/m³ en el punto P1. Durante la segunda etapa en P1 se registra las mayores concentraciones de NO³⁻ y SO4²⁻, mientras que las mayores concentraciones de aniones cloruros se registran en el punto P3.

Tabla 1. Concentraciones de metales pesados y aniones presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera y Segunda Etapa)

Etapas	Muestras	Concentración de metales pesados (ng/m ³)						Aniones (ng/m ³)		
		Fe	Mn	Cu	Ni	Cr	Cd	Cl ⁻	NO ³⁻	SO4 ²⁻
Primera etapa	P1	1888,9	36,1	175,9	26,83	N.C*	N.C.	2,88	19,94	28,66
	P2	2801,8	57,4	22,22	N.C.	N.C.	N.C.	81,60	672,5	780,0
	P3	3180,6	60,2	10,16	N.C.	N.C.	N.C.	229,77	710,8	781,95
Segunda etapa	P1	3981,1	75,9	22,22	N.C.	N.C.	N.C.	154,54	944,8	1323,3
	P2	4777,8	119	25,88	N.C.	N.C.	N.C.	77,36	405,8	1030,6
	P3	4722,7	88,9	12,94	N.C.	N.C.	N.C.	265,48	786,1	1008,8

*N.C. = No cuantificado

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de las células A549, tratadas con diferentes dosis de la fracción acuosa soluble de PM10.

Dosis	% de viabilidad ± Desviación Estándar					
	P1(I etapa)	P1(II etapa)	P2(I etapa)	P2(II etapa)	P3(I etapa)	P3(II etapa)
EMS 2µM	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10
C (filtro blanco)	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67
0,82m ³ /mL	96,32±4,20	95,62±4,09	93,78±4,4	94,61±3,4	96,82±2,1	92,83±4,2
1,25m ³ /mL	95,09±4,20	93,55±6,1	94,87±3,1	94,23±5,2	91,52±5,1	94,30±2,9
1,63m ³ /mL	89,55±10,36	92,56±4,9	93,25±4,2	94,69±4,0	93,10±5,1	92,08±9,06

Determinación de ROS inducido por el PM10

En la Figura 1B se muestran los resultados obtenidos después de 2 horas de exposición con las diferentes dosis de PM10 correspondiente a las etapas 1 y 2 sobre la línea celular A549.

Se puede observar que la cantidad de especies reactivas de oxígeno medidas en unidades arbitrarias de fluorescencia, incrementan significativamente conforme aumenta la concentración con respecto a su control negativo, así mismo se observa mayor respuesta en la producción de ROS en la segunda fase en comparación con los datos obtenidos en la primera fase, al parecer esto es independiente de la naturaleza química de las mismas pero dependiente de la concentración total de metales.

Porcentaje de viabilidad celular

Mantener un alto porcentaje de viabilidad es importante para los estudios de genotoxicidad, ya que un índice inferior al 70%, produce que los valores encontrados por el ensayo del cometa se incrementen por un efecto de las células muertas y no por la genotoxicidad propia de los compuestos prueba. En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de viabilidad celular de las dosis probadas (0,82, 1,25 y 1,63 m³/mL) y en sus respectivos controles. La viabilidad celular es superior al 90% en todos los casos.

La medición del largo del cometa, indica que en los tres puntos de monitoreo existe un incremento de daño al DNA, tanto en la primera

como en la segunda etapa, aunque no se observa un efecto dosis dependiente (Figura 1C). Al analizar estos datos de acuerdo a la escala cualitativa de daño, en los tres puntos de monitoreo se observa un daño de tipo I (Tabla 3).

Tabla 3. Categorización del Daño al DNA en células epiteliales alveolares A549, expuestas a diferentes dosis de material particulado PM10 de la ciudad de Cuenca.

Puntos de monitoreo	Tratamiento	Media ±DS	Tipo de daño			
			I	II	III	IV
Punto P1 (Primera Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19	2
	0,82m ³ /mL	51±20	19***	62	148	21
	1,25m ³ /mL	48±31	65***	66	73	46
	1,63m ³ /mL	33±21	105***	54	87	4
Punto P1 (Segunda Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19	2
	0,82m ³ /mL	29±30	164***	19	42	25
	1,25m ³ /mL	31±19	97***	77	76	0
	1,63m ³ /mL	30±20	90***	51	59	0
Punto P2 (Primera Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19**	2
	0,82m ³ /mL	47±35	83***	40	78	49
	1,25m ³ /mL	34±17	66***	104	77***	3
	1,63m ³ /mL	48±33	76	41	86	47
Punto P2 (Segunda Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19	2
	0,82m ³ /mL	43±29	84***	59	71	36
	1,25m ³ /mL	59±28	28***	37	137	48
	1,63m ³ /mL	39±26	88***	37	111	14

Categoría I: bajo; II: medio; III: alto y IV: células totalmente dañadas (ANOVA ** p<0,001; ***p<0,0001).

Discusión

En los puntos de monitoreo P1, P2 y P3 en donde se analizaron las concentraciones de PM10, no es posible realizar comparaciones con la Normativa Ecuatoriana, ya que la misma establece un período anual de monitoreo, sin embargo para tener un valor de referencia si se comparó con la concentración máxima permisible de 50 µg/m³ que establece la Legislación Ambiental como promedio anual, las concentraciones promedio de PM10 en los sitios de monitoreo superan el patrón establecido en la normativa nacional [17]. Las variaciones de las concentraciones de metales pesados en las muestras de material particulado PM10, estarían condicionadas al uso de suelo donde se realizó el monitoreo y la elevada densidad del tráfico. Actualmente no existe en la legislación ecuatoriana límites de las concentraciones máxicas de metales pesados en aire ambiente para la protección de la salud humana por inhalación de estas partículas, la OMS dispone para Cd (5 ng/m³) y Mn (150 ng/m³), y la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades de los Estados Unidos (ASTDR, por sus siglas en inglés), para Cr la concentración debe oscilar entre 0-30 ng/m³, para el Cu el límite estipulado es de 1-200 ng/m³, para el Ni el valor fluctúa entre 7-12 ng/m³, para el Zn el valor guía oscila entre 100-1700ng/m³, y para el Fe no se reportan valores y en nuestro estudio es el componente mayoritario. Comparando los resultados obtenidos con estas normas, los metales Mn, Cu, Zn estarían dentro de los parámetros establecidos. El Ni, en el punto P1 excede los niveles de la ASTDR durante la primera etapa de monitoreo, no fue posible cuantificar Ni en otros puntos de monitoreo al igual que Cd y Cr en los tres puntos, probablemente por limitante de detección del método, sería recomendable estudios posteriores que permita establecer con mayor precisión su concentración. Aunque la mayoría de metales cumplan con las normas permitidas, en muchas ocasiones

el efecto de las mezclas de metales incrementan los riesgos en la salud debido a una posible sinergia en su toxicidad, incluyendo la genotoxicidad y procesos carcinogénicos [18]. Las concentraciones más elevadas de aniones, en las muestras de material particulado PM₁₀ recolectadas en la ciudad de Cuenca, corresponden al ion sulfato, seguido de nitratos y finalmente de iones cloruro. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados en Quito, la ciudad capital de Ecuador [19], en áreas con alto tráfico vehicular, representando los iones un total del 25 % de los componentes presentes en el material particulado de esta ciudad. Los metales hallados en las muestras de PM₁₀ del aire de la ciudad de Cuenca como el Ni, Cu y Fe, los mismos que pueden promover la formación de lesiones oxidativas [20], inducir citotoxicidad y potencial pro inflamatorio en las vías respiratorias; estos efectos se han asociado con estrés oxidativo, debido al potencial oxidante de componentes solubles, como los metales de transición asociados a las partículas atmosféricas [20,21], por lo que estos metales podrían estar implicados en la producción de ROS observada y que es independiente de la composición química observada, ya que probablemente actúan de manera similar. El Fe es señalado como un irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal al ser inhalado y casos de exposición prolongada a una mezcla de polvo de Fe y otros metales, la función pulmonar se ha visto comprometida [21, 22]. Mientras que el Zn se encuentra incluido en el grupo D, no clasificable respecto a su actividad cancerígena, por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US – EPA por sus siglas en inglés), ya que tanto la evidencia obtenida en personas como en animales se considera inadecuada [23]. En cuanto al Mn, se manifiesta que su absorción a través de la piel puede considerarse despreciable, sin embargo la intoxicación crónica por manganeso puede tener manifestaciones nerviosas o pulmonares [21].

La citotoxicidad observada es menor al 10 %, en todos los tratamientos, lo que indica que la exposición al material particulado estaría relacionada con procesos crónicos en los que no se ve comprometida la viabilidad pero que pueden desencadenar en enfermedades a largo plazo, incluido cáncer, el cual está relacionado con lo observado en el ensayo del cometa donde se observa un daño de tipo I. Las muestras acuosolubles de PM₁₀ recolectadas en el punto P1, P2 y P3 durante las dos etapas de estudio, inducen daño genotóxico en las células epiteliales alveolares A549, medido por la migración del DNA de las células (largo de cola del cometa). En el punto 2 y el punto 3 se evidencian un incremento en la migración del ADN en la segunda fase, y es donde existe una mayor inducción de ROS. A pesar de que en el punto P3 se determinaron las mayores concentraciones de PM₁₀, no es el de mayor daño celular, ya que el efecto observado dependería más de los mecanismos de acción de los componentes y la interacción entre ellos que de la concentración. Siendo por lo tanto, la caracterización de la composición un elemento crucial en la evaluación sobre los efectos en la salud [20]. Existen diferencias entre los efectos genotóxicos y las características químicas del material particulado de diferentes localidades, evaluados tanto en ensayos celulares como en cultivos celulares, sugiriendo que la composición química del material particulado heterogéneo se debe muy probablemente a las fuentes locales y de allí que no se observe un efecto genotóxico dosis dependiente [6], pero además sería importante también identificar los compuestos aromáticos procedentes de la combustión vehicular.

Conclusiones

Las concentraciones de PM₁₀ de la ciudad de Cuenca sobrepasan a las permitidas por la legislación ecuatoriana, siendo en la zona Sureste (P3) la de mayor contaminación. El aire ambiente de la ciudad de Cuenca, tiene como parte de su composición metales pesados (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni), y aniones (Cl⁻, NO₃⁻; SO₄²⁻). En los puntos de monitoreo el Fe y SO₄²⁻, son los más abundantes. Los metales pesados encontrados, podrían estar relacionados tanto en el incremento de la producción de ROS como en el daño genotóxico, evidenciado en las células epiteliales alveolares A-549 a 24 horas de exposición un daño genotóxico de tipo I, por lo que es necesario

otros estudios de evaluación de riesgo de la población de la zona que estaría expuesta a largos tiempos de exposición al PM.

Agradecimiento

El presente estudio se ha desarrollado en el contexto del Convenio Específico de Cooperación del Proyecto: Estudio de genotoxicidad del material particulado PM₁₀ de la zona urbana del Cantón Cuenca, financiado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca y la Universidad Técnica Particular de Loja, proyecto número PROY_FIN_CCSAL_0004.

Bibliografía

- Shah AS, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, Newby DE, Mills NL (2013) Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 382: 1039–1048.
- Gutierrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Puerto M, Sanchez-Granados E, Grillo A, Camean AM (2009) Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Rev. Toxicol* 26: 87–92.
- Callén MS, Iturmendi A, López JM, Mastral AM (2014) Source apportionment of the carcinogenic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) associated to airborne PM10 by a PMF model. *Environ Sci Pollut Res* 21: 2064–2076.
- Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002) Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *287*: 1132–1141.
- Li N, Xia T, Nel AE (2008) The role of oxidative stress in ambiente particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* 44:1689-1699.
- Sahagún MA (2010) Efecto genotóxico de las partículas urbanas. Tesis Doctoral. Centro Interdisciplinario de Investigaciones y estudios sobre medio ambiente y desarrollo CIIEMAD Instituto Politécnico Nacional, México.
- World Health Organization (2014). Ambient Air Pollution Database, 2014. Disponible en www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/cities/en/ (revisado Septiembre 2014)
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J C, Sasaki Y F (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–21.
- Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43: 995–1022.
- Jachero L, Moscoso D (2009) Evaluación del riesgo de exposición a sustancias tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca. Contaminación del Aire. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, Cuenca. pp. 20.
- Balcarce E (2009) Manual de procedimientos para determinación de material particulado. Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/80bf098d5a137083e04001011e015e8d.pdf> (revisado Septiembre 2014)
- Ministerio del Ambiente República del Ecuador Registro oficial No 464 (2011) Disponible en: [http://www.eficacitas.com/eficacitas_es/assets/AM%20050%20Norma%20calidad%20aire%20ambiente%20\(2\).pdf](http://www.eficacitas.com/eficacitas_es/assets/AM%20050%20Norma%20calidad%20aire%20ambiente%20(2).pdf) (revisado Septiembre 2014).
- L'vov BV (1961) The analytical use of atomic absorption spectra.

14. Hautman DP, Munch DJ (1997) Method 300.1 Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. 300.1-1-300.1-36.
15. Jones KH, Senft JA. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 33:77–79.
16. Carballo M A, Cortada C M, Gadano A B, (2005) Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria* 14:95–108.
17. Vallejo MA (2011) Normas de calidad de aire ambiente, libro VI. Normas Tec. para la Prev. y Control la Contam. Ambient. para Sect. Infraestruct. Quito- Ecuador, p 9
18. Martín SA, Emilio R, Mahara V (2011) Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. *Oxid Med Cell Longev* 2011: 935160.
19. Dias-Suárez V, Páez-Pérez C (2006) Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras.
20. Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P (2006) Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 47:199–211.
21. Nordberg G (2001) Metales: propiedades químicas y toxicidad. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf> (revisado Septiembre 2014)
22. Grau MD (2003) Toxicología Ambiental: Evaluación del riesgo para la salud humana. McGraw-Hill interamericana España. Madrid.198-235.
23. Agency United States Environmental Protection (2000) Toxicity data by category for chemicals listed under epcra section 313. Disponible en: http://www2.epa.gov/sites/production/files/documents/hazard_categories.pdf (revisado Septiembre 2014)