

**ACTIVIDAD GENOTÓXICA EN CÉLULAS EXPUESTAS A MATERIAL
PARTICULADO PM₁₀ DE TRES SITIOS DEL VALLE DE ABURRÁ**

Lady Carolina Mendoza Zapata

Trabajo de pregrado para optar al título de Bióloga

Asesora

Luz Yaneth Orozco Jiménez, MSc.

Coasesora

Lina María Zapata

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MEDELLÍN

2013

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
Resumen	6
1. Introducción	7
2. Planteamiento del problema	9
3. Marco Teórico	12
4. Objetivos	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
5. Metodología	20
5.1 Área de estudio y sitios de muestreo	20
5.2 Muestreo del Material Particulado PM ₁₀	21
5.3 Extracción orgánica del Material Particulado	22
5.4 Emulsificación de los extractos orgánicos	23
5.5 Obtención de linfocitos humanos	23
5.6 Determinación de concentraciones subtóxicas	24
5.7 Evaluación genotóxica	24
5.8 Estadística	26
6. Resultados	27
6.1 Dosis subtóxicas y Viabilidad Postratamiento	27
6.2 Características del Daño	29
6.3 Genotoxicidad de las dosis equivalentes al PM ₁₀ en cada Sitio	30
6.4 Relación Genotóxica del PM ₁₀ entre los sitios y las dosis	33
6.5 Relación Genotóxica del PM ₁₀ entre los sitios y las épocas del año	33
6.6 Relación Genotóxica del PM ₁₀ entre épocas climáticas y dosis	34
7. Discusión	36
8. Conclusiones	40

9. Agradecimientos	41
10. Bibliografía	42

Lista de Tablas

Tabla 1. Concentración de PM₁₀ en las épocas de estudio

Tabla 2. Genotoxicidad del PM₁₀ en linfocitos humanos

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo “caja negra” y biomarcadores

Figura 2. Esquema de la aplicación del ensayo cometa para la evaluación del daño en el ADN en distintos modelos, desde bacteria hasta humano

Figura 3. Estaciones de Monitoreo PM₁₀ y otros contaminantes aéreos, REDAIRE

Figura 4. Esquema de extracción orgánica del PM₁₀

Figura 5. Aislamiento de linfocitos y ensayo cometa

Figura 6. Viabilidad celular postratamiento

Figura 7. Magnitud de daño y porcentaje de células dañadas en cada sitio y época

Figura 8. Mediana de la longitud de cola en cada sitio

Figura 9. Genotoxicidad vs dosis en los tres sitios de muestreo

Figura 10. Genotoxicidad vs época en los tres sitios de muestreo

Figura 11. Genotoxicidad vs dosis en las tres épocas climáticas

Lista de Anexos

Anexo 1. Esquema del Diseño experimental

Anexo 2. Prueba de Rangos múltiples para cada sitio con respecto a la dosis (ANOVA simple)

Anexo 3. Prueba de rangos múltiples combinando o relacionado diferentes factores (ANOVA multivariada)

Resumen

Las condiciones ambientales, la industrialización, la calidad de los motores y del combustible que poseen los vehículos del Valle de Aburrá y el poco control que se lleva a cabo hacen de esta urbe una de las más contaminadas de Latinoamérica según la mesa de trabajo para el medio ambiente de Medellín (2008). El uso de biomarcadores genotóxicos es esencial para determinar el posible riesgo que representa para la salud la exposición a material particulado. El objetivo de este estudio es determinar el efecto genotóxico y la influencia de la época climática del material respirable PM₁₀ en linfocitos humanos por medio del ensayo cometa alcalino. Se evaluaron tres sitios del Valle de Aburrá Barbosa, Corantioquia y Facultad de Minas con diferentes niveles de PM₁₀ 25, 44 y 91 µg/m³ respectivamente, en tres épocas climáticas (lluvia, transición y seca) entre Julio de 2011 y Abril de 2012. Se encontraron diferencias significativas (p< 0.001) en la actividad genotóxica del PM₁₀ de cada uno de los sitios con respecto al control negativo, siendo 6 veces mayor el daño en el sitio con niveles altos de polución. Respecto a las épocas climáticas se observó que la época de transición influye fuertemente (p< 0.001) en la actividad genotóxica del PM₁₀ en los tres sitios evaluados. La magnitud del daño en el DNA es de 3 a 6 veces mayor que el control y el porcentaje de células dañadas es muy variable entre los sitios, siendo mayor en Facultad de minas. Concluimos que el Material Particulado respirable de los sitios evaluados del Valle de Aburrá presenta actividad genotóxica y que la época climática tiene incidencia en esta actividad, además de que la respuesta biológica evaluada con el ensayo cometa es apropiada como biomarcador de genotoxicidad para complementar el monitoreo químico y el análisis de calidad del aire.

Palabras Clave: genotoxicidad, material particulado, biomarcador, contaminación.

1. INTRODUCCIÓN

El material particulado aerotransportado está compuesto de partículas sólidas y líquidas, suspendidas y dispersas en el aire. Algunas partículas son emitidas directamente al aire del ambiente, mientras que otras son formadas en la atmósfera por transformaciones de las emisiones gaseosas como los óxidos de azufre, de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles (Pilinis *et al.*, 1987). Para fines de regulación, el material particulado se designa comúnmente como $PM_{2.5}$ o PM_{10} lo que refiere a partículas con diámetro aerodinámico menor de 2,5 μm y 10 μm , respectivamente. Son de gran interés porque constituyen el material particulado respirable y han sido asociadas a una variedad de enfermedades humanas tanto somáticas como hereditarias, además de tener un impacto importante a nivel de Ecosistema. Gran cantidad de estudios epidemiológicos muestran incremento de mortalidad y morbilidad (admisiones hospitalarias, síntomas respiratorios, disminución de la función pulmonar, etc.) en ciudades con altos niveles de Partículas (Solarte *et al.*, 1999).

El PM_{10} resulta principalmente de la combustión incompleta de diferentes tipo de combustibles, como la gasolina, el diesel y otros aceites, asumiendo también como fuente importante a las industrias y con un menor aporte las fuentes naturales como esporas, polen, suelos, partículas de hojas, incendios forestales, entre otros (Díaz & Páez, 2006)

Dadas las condiciones socioeconómicas y climáticas del Valle de Aburrá se ha reportado la ciudad de Medellín como una urbe con alta polución aérea, esta problemática se ve enmarcada por la gran cantidad de autos que se tienen en la ciudad, el incremento del parque automotor (motos y carros) duplicado en los últimos 5 años y la permanencia de automotores viejos, por la baja calidad del combustible utilizado, la poca vegetación en las vías principales, el insuficiente

control de emisiones permitidas al transporte público y a las industrias (principalmente los sectores: textil, cerámico, vítreo y ladrillero), (Toro et al., 2010). Por todo lo anterior, encontramos que en los últimos años se le ha dado relevancia a lo que concierne a la contaminación atmosférica y se ha logrado llevar a cabo un monitoreo químico de los niveles de poluentes en gran parte del Valle, además se han realizado estudios epidemiológicos que correlacionan ciertas enfermedades con los niveles de contaminación que se encuentran en la urbe. A pesar de estos esfuerzos, se desconoce aún la composición del Material Particulado del Valle y el posible efecto temprano previo al desencadenamiento de las enfermedades mencionadas, es decir, no se ha profundizado en el efecto biológico tras la exposición, que puede darse a nivel celular, cromosómico e inclusive de ADN y que posteriormente se verá expresado en la enfermedad. Es importante conocer estas respuestas tempranas a nivel biológico ya que representan parámetros a tener en cuenta en las regulaciones sobre la calidad del aire al que estamos expuestos ambientalmente los habitantes de esta región. Estas respuestas biológicas son conocidas como biomarcadores, los se estudian con el uso de pruebas muchas de las cuales son implementadas por diferentes agencias internacionales de regulación para caracterizar el riesgo existente para la salud humana y ambiental. Una de las baterías recomendadas por las agencias de regulación ambiental como la USEPA, la OCDE entre otras para la evaluación genotóxica es conocido como el ensayo cometa alcalino, el cual evidencia rupturas en la cadena de ADN después de la exposición a un xenobiótico. En este contexto, planteamos como propósito de estudio dilucidar el posible efecto genotóxico del Material Orgánico de las partículas del Valle de Aburrá en tres épocas del año utilizando el ensayo cometa alcalino como complemento de los parámetros y monitoreos actuales de la calidad del aire, siendo este un estudio pionero en la ciudad en cuanto a la genotoxicidad del PM₁₀ y pretendiendo que represente el primer paso para comenzar a implementar un amplio rango de respuestas biológicas en diferentes modelos de estudio (líneas celulares,

bacterias, animales, plantas, etc) para robustecer el conocimiento de la problemática ambiental y decidir sobre las medidas a implementar.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia hace parte de los países llamados “en vía de desarrollo”, dichos países cuentan con una contaminación aérea alta (Lozano, 2004) debido a que en las ciudades de estos países las calles están atestadas con autobuses, camiones y una aglomeración de automóviles viejos, los residentes urbanos respiran contaminantes que provienen de estos vehículos, así como también de las pequeñas empresas, industrias y plantas de energía eléctrica (Alem *et al.*, 2005). Conforme a la Mesa de Trabajo para el Medio Ambiente (2008), particularmente Medellín es una de las urbes más contaminadas de Latinoamérica, por encima de ciudades que comúnmente son percibidas como muy contaminadas como Santiago, México o Sao Paulo. Según un informe sobre la calidad del aire en el Valle de Aburra, Medellín presentó nivel de partículas PM_{10} contaminantes por millón de 93, mientras le seguía Santiago con casi 73, Bogotá con 66 y México con 64. De acuerdo a investigaciones recientes por cada $10 \mu g/m^3$ de PM_{10} se aumenta la mortalidad general en un 4%, un 8% la mortalidad por enfermedades respiratorias (EPOC) y un 14% la mortalidad por cáncer de pulmón (REDAIRE, 2005). Un comportamiento similar se observó en un estudio realizado entre la universidad de Antioquia, Universidad de Medellín y Universidad CES en el cual se demuestra que la contaminación del aire en Medellín ocasiona: reducción de la función respiratoria entre un 3% y 12% frente a una región con menores niveles de contaminación (Oriente), aumento en el número de personas con cáncer de pulmón, 11.8 casos por 100 mil habitantes en 1980 con respecto a 20.6 en el 2005; aumento de enfermedades respiratorias en un 49.3% en aquellos niños que viven en zonas con altos niveles de PM_{10} , $PM_{2.5}$, hollín y plomo en comparación con aquellos niños expuestos a concentraciones normales. Los investigadores concluyeron que los altos niveles de estos contaminantes explican de forma conjunta el 30.6% de las enfermedades respiratorias (Mesa de Trabajo para el Medio Ambiente en Medellín, 2008).

Está plenamente documentado en el Valle de Aburrá, los niveles de contaminación por material particulado, óxidos de azufre, carbono y nitrógeno, desde parámetros fisicoquímicos en tiempo y espacio pero no desde parámetros biológicos y mucho menos genotóxicos. Las condiciones ambientales del Valle de Aburrá, su humedad relativa, la trayectoria de los vientos hacen que los contaminantes de aire permanezcan localizados en zonas en las cuales la exposición se hace mayor, además la calidad de los motores y del combustible que poseen los vehículos que se movilizan en la ciudad no es la más aceptable y el control que se lleva a cabo con respecto a esto es realmente poco. No es suficiente con la sola identificación de sustancias que se hayan reportado como nocivas o que puedan tener un riesgo genético para la población humana, se deben complementar los programas de monitoreo químico con estudios tendientes a determinar el efecto biológico especialmente genotóxico usando biomarcadores potenciales para el análisis de calidad ambiental ya que ellos son medida de la salud y el fitness. Para el Valle del Aburrá aún es desconocido el biomarcador de genotoxicidad como un sistema de alerta temprano de una mezcla ambiental como el aire en la cual se presentan interacciones propias del sitio y tipo de contaminantes presentes.

Otro punto importante a tener en cuenta es que aunque en Medellín se hace seguimiento de algunos componentes químicos del aire, del material particulado y además algunas universidades se han enfocado en realizar estudios fundamentados en las enfermedades que surgen, aumentan o se empiezan a fijar en nuestra población, no se ha realizado un análisis de riesgo que comprometa al aire como mezcla compleja ambiental. Conocemos el posible efecto que ciertos compuestos tienen a nivel biológico por si solos, pero desconocemos la actividad de los mismos cuando interactúan entre sí, ya que se pueden presentar sinergismos, antagonismos, entre otros.

Por lo anterior, es fundamental empezar por este tipo de evaluaciones en la ciudad para dilucidar el efecto que podría tener la polución de nuestro medio ambiente bajo las condiciones particulares y no solamente basarnos en parámetros establecidos en Estados Unidos y otros países de Europa donde se poseen características climáticas, geográficas y socioeconómicas totalmente diferentes; dado que bajo dichos escenarios diferenciales sus conclusiones pueden no ser válidas en el contexto de ciudades latinoamericanas.

El enfoque de este estudio frente a esta problemática se basó fundamentalmente en poder dar cuenta del posible efecto temprano que pudiera generar la polución aérea y el cual posteriormente servirá como indicador de un riesgo genotóxico antes que se desencadenen efectos tardíos e irreversibles expresados en enfermedades. Es necesario establecer marcadores biológicos *in vitro* como primeros estudios que esclarezcan la actividad genotóxica que tiene nuestro aire además de los ya establecidos marcadores químicos a los cuales se les hace seguimiento desde la red de vigilancia del aire (REDAIRE). Consideramos que es de gran importancia establecer el efecto que estos contaminantes tienen en la cadena del ADN, ya que este tipo de estudios no se encuentran reportados para nuestra ciudad aunque se esté llevando a cabo un monitoreo de los niveles de contaminantes ya mencionados.

En el país apenas se está creando la necesidad de emprender la tarea de investigar y entender como es el comportamiento de los contaminantes en los diferentes compartimentos ambientales, cuales son los efectos biológicos que pueden causar, como es la dinámica que tienen según las condiciones climáticas con el fin de generar datos sistémicos que den la posibilidad de intervenciones preventivas tanto para la salud humana como del ecosistema. Esta investigación es pionera en nuestra ciudad ya que pretende entender el mecanismo de acción de una mezcla compleja como es el componente orgánico del PM₁₀ desde un biomarcador de respuesta biológica, la genotoxicidad *in vitro*.

3. MARCO TEÓRICO

El aire puro es una mezcla gaseosa compuesta aproximadamente de un 78% de nitrógeno, un 21% de oxígeno y un 1% de otros gases. Se llama contaminación atmosférica a la adición de cualquier sustancia que altere las propiedades físicas o químicas del aire. Los contaminantes atmosféricos más comunes son gases (monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre e hidrocarburos) y material particulado (Daisey, 1988). Estos contaminantes se incorporan a la atmósfera principalmente por dos vías: Una proviene de las fuentes emisoras de origen natural como erupciones volcánicas, descargas eléctricas, incendios de bosques, entre otros y la otra vía es de origen antrópico, entre las que encontramos la actividad agrícola, silvícola, de construcción, procesos industriales, de combustión, automotores, etc (Celis, 2009).

El material particulado respirable comprende partículas de diámetro entre 2,5 y 10 μm , referidas comúnmente como $\text{PM}_{2,5}$ o PM_{10} ; estas partículas se depositan en la tráquea, bronquios y bronquiolos y las $\text{PM}_{2,5}$ son capaces de llegar inclusive a los alveolos pulmonares, ambos tipos de partículas están asociados con efectos negativos para la salud humana y del ecosistema en general (Díaz y Páez 2006; MPCA 2001). A este material particulado se adhieren otras especies contaminantes como compuestos orgánicos mutacarcinógenos tales como los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), benceno, tolueno y compuestos inorgánicos con carácter tóxico como sulfatos, nitratos, amonio y metales pesados (Zuluaga *et al.*, 2009). La principal fuente responsable de la emisión de estos compuestos es la combustión incompleta de carbón y petróleo, especialmente la generada por combustión de gasolina y diesel, por lo cual el transporte terrestre representa entre un 30-90% del total de producción de estos contaminantes en países desarrollados y hasta un 98% en los países en vías de desarrollo como Colombia (Warner & Wark 2004). La diferencia en estos valores se debe a la

distinta calidad de combustibles y motores que usan los vehículos y la permanencia de estas sustancias en el ambiente que depende del tipo de condiciones climáticas como la pluviosidad, vientos, presión atmosférica, humedad relativa, etc., lo que hace imperativo la generación de datos diferenciales y propios de cada región para regular las emisiones (MPCA 2001)

El problema de la contaminación aérea y su regulación representan un proceso complejo de abordar por lo que hay un interés creciente de entes gubernamentales, académicos y privados por generar datos, hacer diagnósticos y monitoreos frecuentes con el fin de disminuir su impacto. Se han configurado diferentes organizaciones a nivel mundial preocupadas por determinar el riesgo que representa la contaminación ambiental tanto para la salud humana como para el ecosistema, entre ellas está la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), la Comisión Internacional para la Protección contra Mutágenos y Carcinógenos Ambientales (ICPEMC) y otras agencias que han enfocado su interés en evaluar el impacto que constituyen los compuestos puros o las mezclas ambientales a nivel genotóxico y carcinogénico debido a las implicaciones que tiene para la salud humana y ambiental, para ello han armonizado baterías de pruebas cortas de genotoxicidad y mutagenicidad para la regulación de sustancias y mezclas ambientales. Para establecer una sustancia, compuesto o mezcla como riesgosa para la salud se debe hacer un análisis que comprende 4 pasos propuestos por la US-EPA, estos son: Identificación del peligro de una sustancia o matriz, análisis de dosis–respuesta, análisis de exposición humana y por último la caracterización del riesgo, este último comprende la descripción de la naturaleza y probabilidad del riesgo genotóxico para humanos (Dearfield *et al*, 2002). La importancia que se da al riesgo mutagénico, genotóxico y últimamente a las sustancias con efectos epigenéticos, es su relación con cáncer u otros procesos degenerativos crónicos semejantes a vejez, enfermedades inmunes, coronarias y respiratorias. Estos efectos se pueden expresar a nivel de genes individuales, grupos de genes o cromosomas, por lo que se deben evaluar diferencias

metabólicas, la capacidad de reparación y otros procesos que son afectados por la mutagenicidad química.

La universalidad del ADN proporciona el uso racional de varios sistemas no humanos para predecir la mutagenicidad intrínseca generada por químicos (idem). Adicionalmente se soporta el uso de sistemas de evaluación no humanos como convenientes para la observación de los efectos genéticos que causan los químicos en una especie o en otros sistemas como bacterias, líneas celulares, insectos, roedores, ya que los químicos causan efectos similares. Los ensayos de genotoxicidad, mutagenicidad o epigenéticos se direccionan en hacer análisis acerca del efecto génico del agente o mezcla *in vitro* lo que soporta los posteriores análisis *in vivo*. La US-EPA enfatiza en datos de genotoxicidad como una parte de la evidencia de peso para el análisis de riesgo de cáncer, en particular establece un procedimiento sobre el modo o mecanismo de acción de los compuestos como foco del análisis de riesgo. La agencia define como modo de acción una secuencia de eventos y procesos claves empezando con la interacción del agente o la mezcla que pueden redundar en cambios operacionales y anatómicos y resultar en la formación de cáncer. Uno de los eventos y procesos claves que están siendo considerados es si el agente o mezcla es genotóxico, mutagénico o induce cambios epigenéticos que contribuyen a la inducción de cáncer. Además establecer si el modo de acción de una sustancia o mezcla genotóxica fundamenta y permite acoplar estrictas medidas de control para su exposición (Dearfield & Moore, 2005).

El devenir de la industrialización y los nuevos avances tecnológicos han incrementado la exposición a potenciales agentes tóxicos que agreden mediante múltiples mecanismos el patrimonio genético. Implican riesgo para la salud y por ello deberían ser debidamente caracterizados en cuanto a su potencial genotóxico (Tancell *et al.*, 1995). Generalmente la exposición a un poluyente o contaminante se estima determinando la concentración del agente en el ambiente, sin embargo,

la exposición externa es una mera estimación de la exposición interna y esta a su vez una mera estimación de la dosis biológicamente efectiva (Mudry & Carballo, 2006). En cuanto a la contaminación del aire existe un efecto a dos niveles: uno en cuanto al ecosistema, que puede verse alterado en la presencia de estos contaminantes y el otro es a nivel humano, el cual se ha intentado esclarecer pero que aun sigue siendo incierto.

Dentro de la caracterización de los potenciales riesgos, la toxicología evalúa el análisis directo del impacto producido en los seres vivos a nivel de genoma. Si este resulta blanco de daño, podría traer aparejado como consecuencia, el desencadenamiento de distinto tipo de enfermedades tanto somáticas como hereditarias de variado espectro, e incluso, llevar a la aparición de nuevas patologías productos de sinergismos aun hoy poco conocidos o previsibles. La exposición a sustancias toxicas podría dar origen a alteraciones tempranas previas al desarrollo de una enfermedad, las que servirían de señales o marcadores (figura 1). Estos biomarcadores se relacionan con la actividad de los seres vivos al permitir determinar eventos asociados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa. El grado de exposición es el mayor determinante de riesgo por lo cual es necesario tener información precisa sobre este parámetro (Mudry & Carballo, 2006).

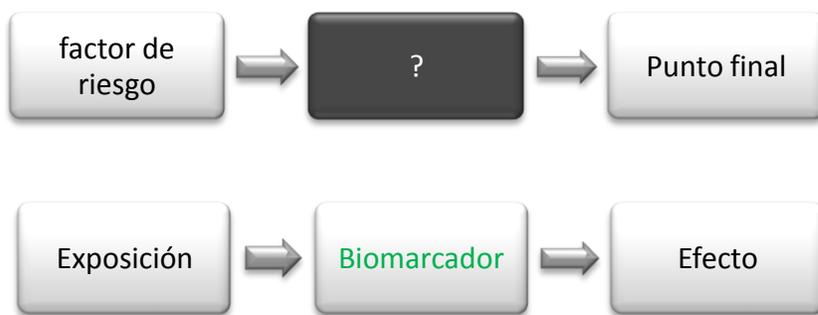


Figura 1. Modelo “caja negra” y biomarcadores (tomado de Mudry y Carballo, 2006)

Los biomarcadores de genotoxicidad son apropiados para el análisis de riesgo ambiental, numerosos estudios relacionan el daño en el ADN con subsecuentes cambios a nivel molecular, celular y de tejidos en organismos expuestos (Ohe *et al.*, 2004). Por lo tanto, la identificación química de sustancias que puedan tener un riesgo genético para el humano y del ecosistema no es suficiente (Thybaud *et al.*, 2007). En los análisis de calidad ambiental los biomarcadores son usados como medida de salud y fitness, así un biomarcador puede ser usado en caso de diagnóstico como primera medición en un paso a paso para señalar la presencia o los efectos causados por contaminantes, referido frecuentemente como “sistema de alerta temprano” (Den, 1998). Los sistemas de bioensayos cortos pueden ser relevantes para un primer diagnóstico del potencial efecto de químicos ambientales para la salud humana y ecológica. La integridad del ADN es un aspecto fundamental para la salud y el buen funcionamiento de nuestro organismo y los quiebres o rupturas en él son potenciales lesiones premutagénicas y marcadores sensibles de daño genotóxico evidenciados con el ensayo cometa (Park & Choi, 2007).

El ensayo cometa permite profundizar en los aspectos relacionados con la detección del daño en el ADN, revela rupturas de cadena simple (SSB) y doble (DSB) en células individualizadas, evaluando así la heterogeneidad de la respuesta en poblaciones celulares. Existen dos variaciones del ensayo, la neutra y la alcalina ($\text{pH} > 13$), siendo la alcalina la versión más utilizada en la comunidad científica dado que detecta sitios lábiles al álcali (ALS) y SSB asociados a la reparación incompleta por escisión, dicha detección de SSB la hace mucho más sensible para detectar agentes genotóxicos en comparación con la neutra que detecta los DSB. Actualmente es uno de los métodos más populares para la evaluación del daño en el ADN, con unos 5000 artículos publicados en más de 150 revistas diferentes (Zuñiga, 2009). Es usado en un amplio rango de modelos biológicos, usado en biomonitoreo ambiental y humano (ver Figura 2).

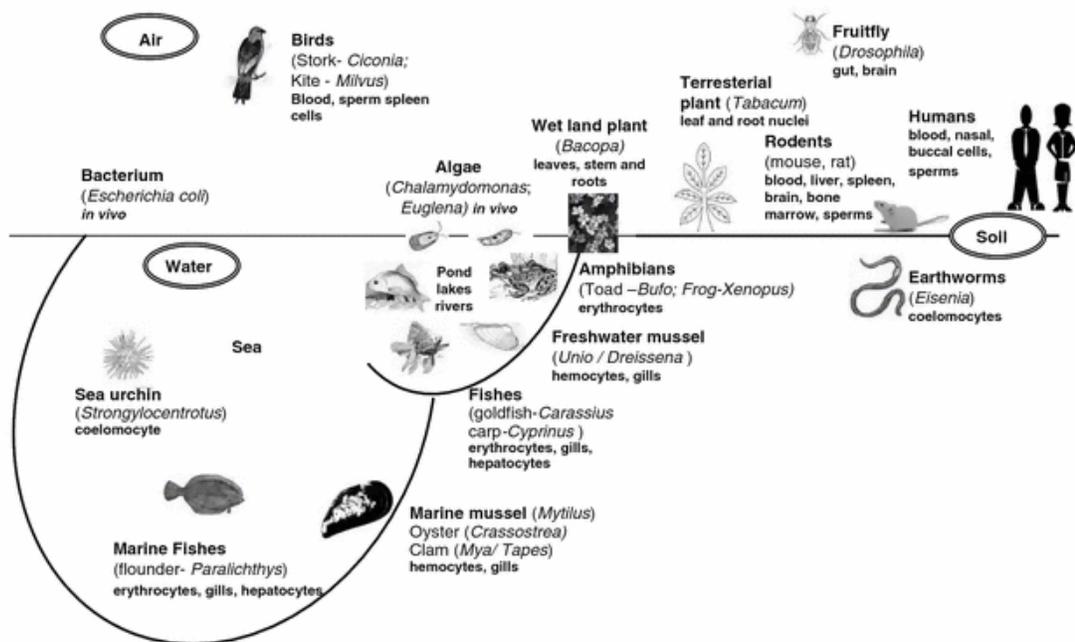


Fig.2. Esquema de la aplicación del ensayo cometa para la evaluación del daño en el ADN en distintos modelos, desde bacteria hasta humanos (Tomado de: Dhawan *et al.*, 2009)

A nivel epidemiológico, se ha observado en países de Europa y Estados Unidos que existe un incremento de enfermedades respiratorias y cardiovasculares y esto se ha relacionado con la contaminación aérea de las ciudades (Park & Choi, 2007), sin embargo, en nuestro medio no se ha determinado que posibles alteraciones tempranas se están dando a nivel genómico que puedan relacionarse con dichas enfermedades. Los compuestos orgánicos que se adhieren al material particulado respirable pueden causar daño oxidativo del ADN y conducir a efectos reproductivos y cardiovasculares. Biomarcadores de exposición, dosis y susceptibilidad se han medido en poblaciones expuestas a la contaminación aérea principalmente impactada por las emisiones de la combustión de la gasolina y el diesel mostrando una correlación significativa de la exposición a corto y largo plazo con medidas de daño genético. A largo plazo, los estudios epidemiológicos han informado de un aumento del riesgo de todas las causas de mortalidad y

morbilidad cardiopulmonar y la mortalidad por cáncer de pulmón, además de efectos adversos a nivel reproductivo como el bajo peso al nacer (Four *et al.*, 2004). En estados Unidos la US EPA tiene gran cantidad de estudios de las posibles enfermedades relacionadas con la contaminación aérea y reportan además del cáncer de pulmón, el cáncer de vejiga y del tejido linfático como los más comunes asociados con la exposición al Material orgánico en partículas generadas por el diesel y la gasolina (US EPA, 2002).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar espacio-temporalmente la actividad genotóxica del Material Particulado PM_{10} en células humanas de tres sitios del Valle de Aburrá entre 2011 y 2012.

4.2. Específicos

Hallar el potencial genotóxico del material particulado de tres sitios del Valle de Aburrá en linfocitos humanos a través del ensayo cometa.

Establecer si existe incidencia de la época climática en la actividad genotóxica del PM_{10} .

Valorar la respuesta biológica evidenciada en el ensayo cometa como un biomarcador para aplicarlo como complemento en el monitoreo de la calidad del aire en el Valle de Aburrá.

5. METODOLOGÍA

5.1. Área de estudio y sitios de muestreo

El valle de aburrá, se encuentra ubicado en la cordillera central en el departamento de Antioquia, de Sur a Norte posee 30 Km de longitud desde Caldas hasta Bello y hacia el Noroeste de Bello a Barbosa tiene una longitud de 35 Km. Su Altitud media es de 1538 msnm, las temperaturas varían entre los 13°C – 35°C. Los vientos alisios son característicos de este valle y sus recorridos son generalmente de Norte a Sur, sin embargo, son modificados constantemente por la topografía; La precipitación media es de 2200 mm anual, presentándose lluvias en promedio de unos 1400 mm en Barbosa y de unos 3000 mm al sur del valle (Hermelin, 2007).

De acuerdo con el monitoreo químico que lleva a cabo la Red Nacional de Vigilancia de la Calidad del Aire (REDAIRE) en el Valle del aburrá, se eligieron tres sitios de muestreo con diferentes niveles de contaminación tomando como base los resultados obtenidos en los últimos 4 años; Los niveles de contaminación y los sitios respectivos o representantes de estos son: alta contaminación, Medellín Universidad Nacional Facultad de Minas (MED-UNFM); mediana contaminación, Medellín Corantioquia (MED-CORA) y baja contaminación, Barbosa- Hospital San Vicente de Paul (BAR-HSVP), Figura 3.

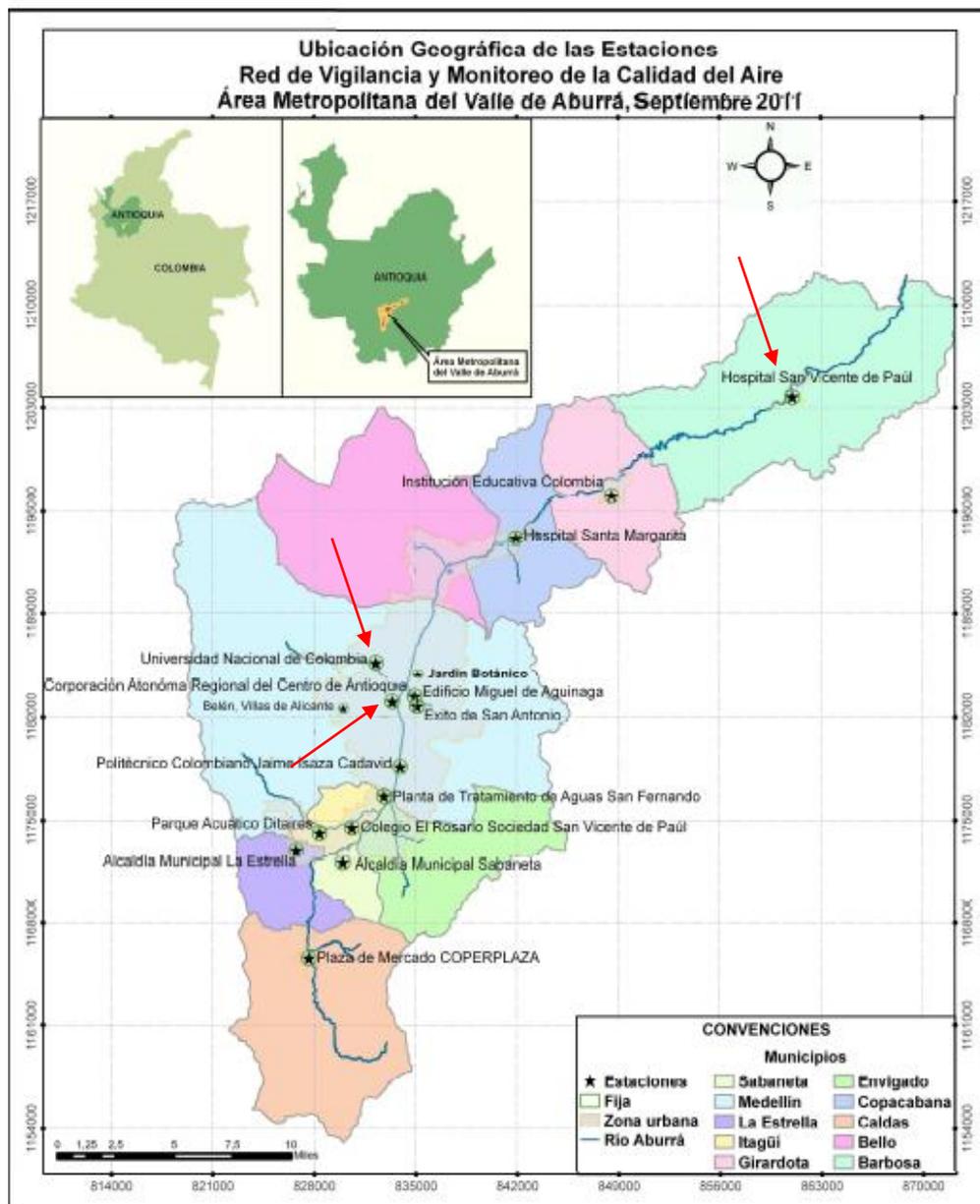


Fig. 3. Estaciones de monitoreo PM10 y otros contaminantes aéreos, REDAIRE. Las flechas indican los tres sitios de estudio.

5.2. Muestreo de Material Particulado PM10

El monitoreo de este tipo de material particulado se realiza mediante el uso de un equipo volumétrico (flujo constante) denominado Muestreador de alto volumen PM10, el cual se basa en el principio de impactación inercial para clasificar las

partículas según el tamaño deseado, las partículas con diámetro $\leq 10\mu\text{m}$ son depositadas en filtros de cuarzo expuestos durante un periodo de muestreo de 24 H. El muestreo se realizó en tres temporadas: seca, húmeda y de transición dadas entre Julio de 2011- Abril de 2012. Los Filtros fueron obtenidos gracias a la colaboración de Redaire, teniendo para cada sitio de muestreo dos filtros de temporada seca, dos de temporada húmeda y uno de época de transición como también un filtro blanco (16 filtros totales). Ver anexo 1 para más claridad del diseño experimental.

Los reportes de la concentración de partículas de 10 micras colectadas en el filtro de cuarzo se encuentran en la tabla 1, donde se puede apreciar valores que determinan a Barbosa, Corantioquia y facultad de Minas como sitios de baja, mediana y alta polución por el PM_{10} respectivamente.

Tabla1. Concentración de PM_{10} en cada época de estudio

ESTACION	ÉPOCA DE MUESTREO	CONCENTRACIÓN PM_{10} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
BARBOSA Hospital San Vicente de Paul	Seca	24
	Lluvia	23
	Transición	27
CORANTIOQUIA	Seca	43
	Lluvia	47
	Transición	42
FACULTAD DE MINAS (UNAL)	Seca	89
	Lluvia	113
	Transición	72

*Norma actual para Colombia de emisiones diarias $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$

5.3. Extracción orgánica del Material Particulado

Una vez obtenidos los filtros PM_{10} de cada una de las estaciones se procede hacer la extracción orgánica a partir de las partículas contenidas en ellos. Se

fragmentando en varias partes cada uno de los filtros, se llevaron por separado a recipientes de vidrio y se cubrieron con Diclorometano (DCM) como solvente orgánico en una proporción 2:1 (2ml de DCM por cada gramo de PM₁₀). Después de esto se llevan al ultrasonicador por un tiempo de una hora con el fin de desprender la mayoría de los compuestos o sustancias orgánicas que se encontraban adheridos a las partículas contenidas en el filtro, finalmente el solvente rotaevaporó para obtener la fracción orgánica requerida (Sato *et al.*,1995).

5.4. Emulsificación de los extractos orgánicos

Cada uno de los extractos fue diluido en un volumen entre 1-2 mL de PBS para realizar una pequeña emulsificación por medio de una llave de tres vías acoplada a un sistema de dos jeringas y un filtro de 0.22 µm. Se tomo el “diluido” en una de las jeringas, se llevo a las llave de tres vías manteniendo cerrada la vía del filtro, de este modo solo podría pasar el extracto a través de las dos jeringas permitiendo que la presión generada y el número de veces de paso emulsificaran cada uno de los extractos, luego se filtró la emulsión quedando estéril y disponible para tratar los linfocitos (fig. 4).

5.5. Obtención de linfocitos Humanos

Para la evaluación del efecto del material orgánico extraíble en el ADN se utilizaron linfocitos humanos. Estos fueron obtenidos de un individuo voluntario sano y con hábitos que no implicaron sesgo en la investigación como el consumo de tabaco, alcohol, entre otros. Del individuo se tomó aproximadamente 10 mL de sangre en un vacutainer con heparina; se realizó la separación de linfocitos siguiendo el método de separación por gradiente con Ficoll Hystopaque (Noble & Cuttis, 1967) en el cual se obtiene una interfase que representa los linfocitos los cuales son atrapados cuidadosamente con una pipeta pasteur. Después de varios lavados se hizo conteo del total de células y de su viabilidad usando el colorante vital azul de tripano en cámara de Neubauer. Con el azul de tripano se determina

la integridad de la membrana celular, es decir las células viables no incorporan el colorante y se observan refringentes en comparación con las células muertas que se observan azules por la incorporación del colorante. La viabilidad antes del tratar las células con el extracto orgánico del Material Particulado debe ser superior al 95%.

5.6. Determinación de concentraciones subtóxicas

Se determinaron dosis subtóxicas con citotoxicidad máxima de $25 \pm 5\%$ con el fin de evitar falsos positivos, ya que los efectos genotóxicos están asociados a citotoxicidad nula a moderada (Platel, 2010).

5.7. Evaluación Genotóxica

Se trataron 100.000 células con tres dosis de extracto orgánico de PM_{10} por una hora. Pasado este tiempo se procede a realizar el ensayo cometa alcalino (Singh *et al.*, 1988) con una modificación implementada en los últimos años, en gelbond (McNamee *et al.*, 2000). Un volumen de 20UI de células tratadas se mezclaron con 80 UL agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, de esta mezcla 10 UI se sembraron la lámina del gelbond que contiene agarosa de punto de fusión normal, posteriormente a la solidificación de las muestras se llevaron a una solución lisis fresca (NaCl 2.5 M, Na_2EDTA 100 mM, Tris 10 mM, sarcosinato de sodio 1%, Triton X-100 y DMSO 10%) durante 24 H, pasado este tiempo se dejan en buffer de electroforesis fresca (Na_2EDTA 1 mM y NaOH 300 mM a pH13.5) por 20 minutos para permitir la desnaturalización del ADN, se corrió la electroforesis a 25mV y 300mA (BIORAD Power Pac 3000) por 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Posteriormente las láminas Gelbond se lavaron con solución neutralizante (Tris-HCl 0.4M a pH 7.5). Consecutivamente se realizó la tinción con Bromuro de Etidio 2UI/ml y se realizó la lectura en un microscopio de fluorescencia marca Boeco con filtro verde y magnificación de 20X. Se hicieron 2 experimentos cada uno por duplicado, en cada experimento se analizaron 100 células al azar por dosis para un total de 200 células por tratamiento. Como hay dos filtros por temporada, el total

de células analizadas por dosis fue de 400 células. Las imágenes se analizaron con se analizaron con el software Casp, el cual mide varios parámetros importantes para la interpretación de la respuesta biológica, en este estudio se tuvo en cuenta la longitud de cola del cometa (micrómetros), asumiendo que entre más larga la cola del cometa se dieron mas rupturas en el ADN ocasionadas por el agente contaminante. Como control negativo se tuvieron las células sin ser tratadas y como positivo se usó peróxido de hidrogeno 100mM (ver figura 5).

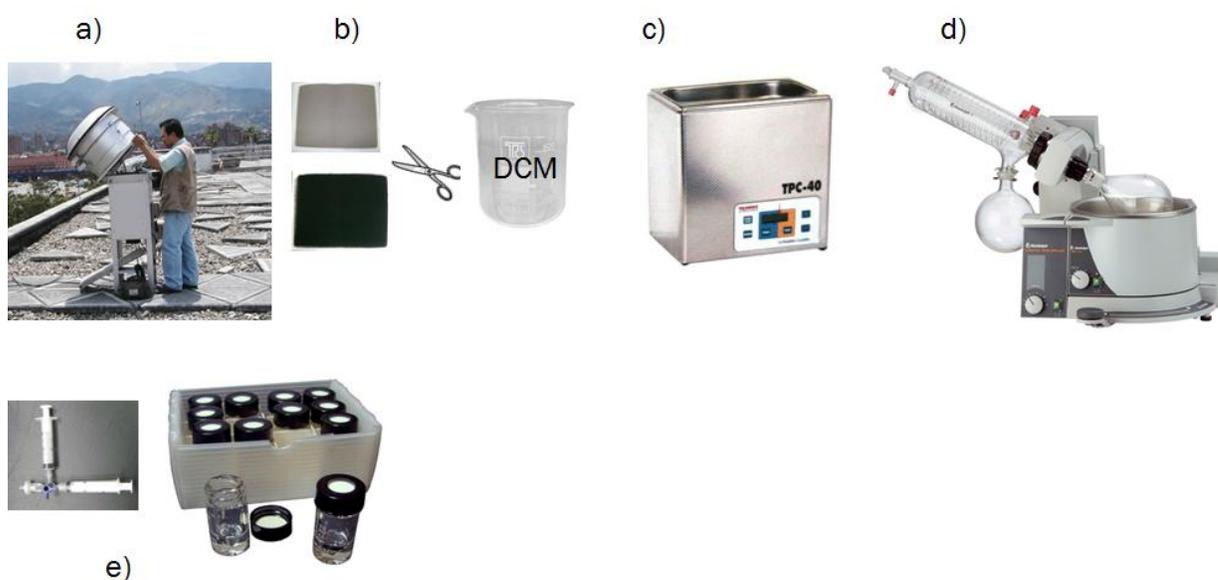


Fig. 4. Esquema de extracción orgánica del PM₁₀. a) Muestreador de alto volumen y colección de la muestra en el filtro de cuarzo. b) Recorte de filtros y adición del solvente orgánico, diclorometano. c) ultrasonido de las muestras por una hora. d) Rotaevaporación para eliminar el solvente orgánico. e) Emulsificación con llave de tres vías y obtención final del extracto orgánico para el tratamiento.

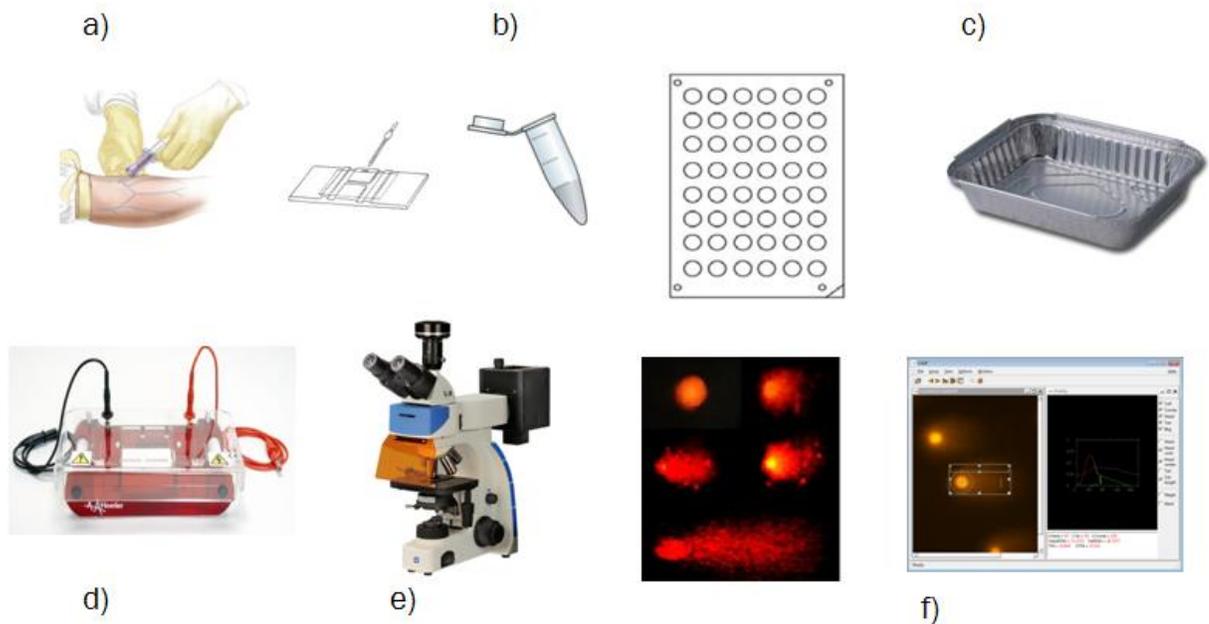


Fig. 5. Aislamiento de linfocitos y ensayo cometa. a) Extracción de linfocitos y conteo/viabilidad de células pretratamiento. b) Tratamiento y siembra en gelbond. c) Lisis celular (24h). d) Electroforesis alcalina e) Lectura en microscopio de fluorescencia, tinción con BrEt. f) Análisis con el software Casp.

5.1. Estadística

Los datos se presentan como la media más o menos la DS de la longitud de cola. Se hizo el análisis del comportamiento de los datos obteniéndose una distribución no paramétrica, por lo cual se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para establecer diferencias entre los sitios con respecto a las dosis utilizadas. Además se realizó prueba de rangos múltiples para establecer que factores (sitios, dosis y época del año) presentan diferencias. Los análisis se hicieron con el programa StatGraphic Centurión XVI.

6. RESULTADOS

El material orgánico extraído presentó características aceitosas por lo cual no se pudo determinar el peso del material orgánico extraíble (MOE) para hacer la relación de cuanto se recuperó a partir del Material Particulado. Por lo anterior, las dosis probadas se expresaron como μg equivalentes de MP10. Las dosis subtóxicas evaluadas fueron de 25, 50 y 100 μg equivalentes PM₁₀. La viabilidad celular después de una hora de tratamiento fue superior del 70% para todos los tratamientos, por lo que la actividad genotóxica se puede atribuir a la acción del MP y no a procesos de citotoxicidad (Tabla 2, Figura 6).

En este estudio se logró determinar que existe actividad genotóxica del Material Orgánico Extraíble del PM₁₀ en los tres sitios evaluados comparado con el control negativo, independientemente de si los niveles de PM10 monitoreados en cada sitio fueron bajos, medianos o altos. La época climática con mayor genotoxicidad fue la época de transición en donde el daño o las rupturas en el ADN se incrementan significativamente ($p < 0.001$) aún teniendo datos homogéneos dentro de cada sitio para las tres épocas, por otra parte el factor de inducción (FI) de daño fue de 3 a 6 veces mayor que el control negativo y el porcentaje de células dañadas, con pocas excepciones, fue alto en todos los sitios (Tabla 2). No se logro establecer una relación clara entre la actividad genotóxica o el daño en el ADN y las dosis con las que fueron tratadas las células. Para tener más claridad del contexto genotóxico observar Tabla 2.

Tabla 1. Genotoxicidad de MP10 en linfocitos humanos

SITIO	EPOCA	DOSIS ($\mu\text{g equiv MP}_{10}$)	$\bar{X} \pm \text{DS}^a$	IDP ^b	% CD ^c	FI ^d	% V ^e
Barbosa	Lluvia	25	20.4 \pm 13.5	60	50	3	87.9
		50	22.0 \pm 15.6	68	51	3	91.9
		100	25.3 \pm 16.0	83	65	4	66.7
	Transición	25	34.9 \pm 17.5	113	78	5	91.4
		50	35.6 \pm 19.2	114	74	5	87.5
		100	39.8 \pm 19.8	131	79	6	72.7
	Seca	25	15.6 \pm 11.5	46	39	2	90.9
		50	32.3 \pm 22.7	100	62	5	81.7
		100	29.0 \pm 17.0	92	67	3	72.4
Corantioquia	Lluvia	25	28.0 \pm 16.9	92	68	4	95
		50	29.2 \pm 19.5	96	63	5	94
		100	34.9 \pm 20.0	111	72	5	80
	Transición	25	26.0 \pm 15.5	84	68	4	88
		50	37.7 \pm 23.6	118	69	6	83
		100	35.1 \pm 15.5	120	85	6	85
	Seca	25	26.1 \pm 15.2	84	66	4	98.3
		50	30.3 \pm 18.1	98	68	5	91.2
		100	22.1 \pm 16.8	69	50	3	89.8
Fac. Minas	Lluvia	25	30.0 \pm 15.0	97	73	5	75
		50	39.0 \pm 19.2	122	80	6	71.4
		100	36.0 \pm 21.5	117	73	6	59.1
	Transición	25	53.0 \pm 22.0	180	93	9	95
		50	38.0 \pm 17.0	129	84	6	95.7
		100	37.0 \pm 22.0	122	74	6	95
	Seca	25	23.0 \pm 16.0	75	57	4	100
		50	41.0 \pm 20.0	133	81	6	94
		100	40.0 \pm 23.0	133	74	6	94
Filtro blanco		100	10.0 \pm 5.0	21	15	1	93.2
C- (PBS)			8.4 \pm 6.0	15	15	1	97.1
C+ (H ₂ O ₂)		XmM	54.3 \pm 39.0	167	77	7	77.5

a. Media de la longitud de cola del DNA de dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. b. Índice de Daño Ponderado. c. Porcentaje de Células Dañadas (se consideró daño a partir de 16 micras). d. Factor de Inducción. e. Porcentaje de Viabilidad después de 1 hora de exposición a MP10.

6.1. Dosis subtóxicas y Viabilidad Postratamiento

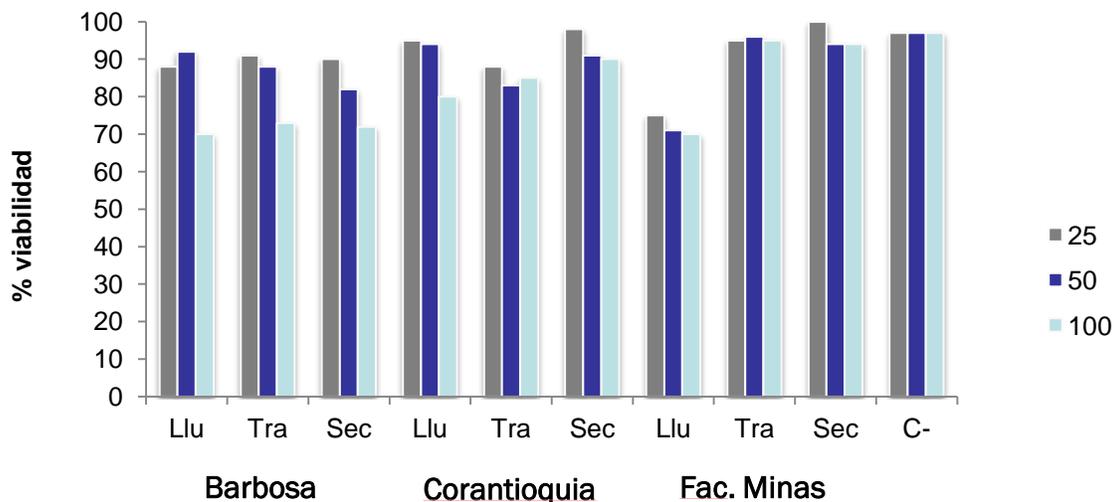


Fig. 6. Viabilidad celular postratamiento (>70%)

6.2. Características del Daño

Se determinó el daño genético teniendo como criterio la media del control negativo más una desviación estándar más uno ($X \pm DS + 1$). A partir de esto se midieron varios parámetros que dan cuenta de la magnitud del daño y de la cantidad de él en las poblaciones celulares, así obtuvimos que el Factor de Inducción (FI) fue de 3 a 6 veces mayor en los tratamientos en comparación con el control negativo, el índice de daño ponderado (IDP) que puede relacionarse con la magnitud del daño fue significativamente ($p < 0.001$) alto para los tres sitios en las tres épocas evaluadas (2-10 veces más que el C⁻), siendo mucho mayor el daño genético en la época de transición para los tres sitios (grafico B, Figura 7). Por otra parte el porcentaje de células con daño fue variable entre sitios y entre temporadas pero en general se notó que él > % de células con daño fueron las tratadas con MOE de Facultad de Minas en las tres épocas. Además en Barbosa se evidenció un cambio tanto en IDP como en % de Células dañadas en la época de Transición.

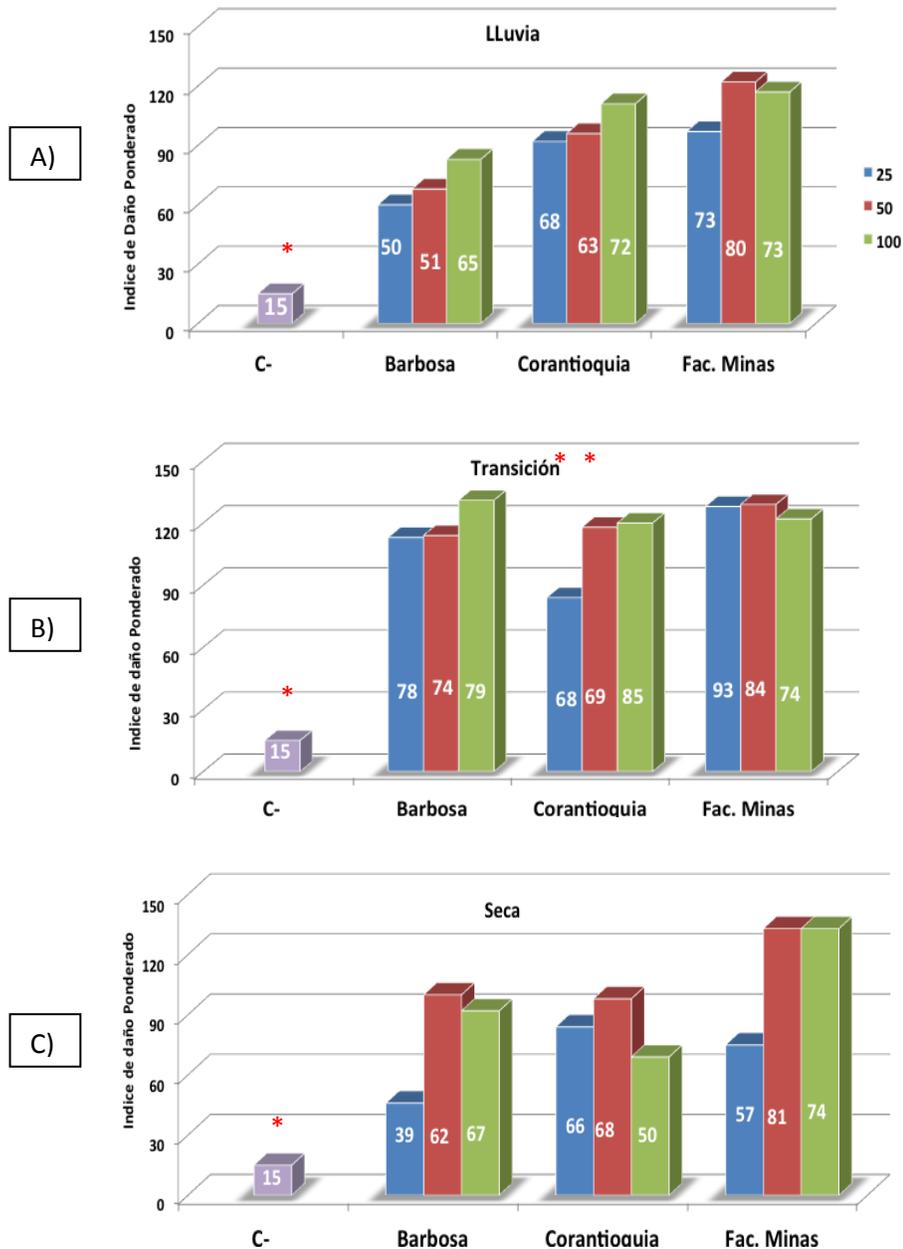


Fig.7 Índice de daño Ponderado para cada sitio en las tres épocas climáticas (A-B-C). * Denota la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el control y los tratamientos y ** con el mismo valor p las diferencias entre transición y las otras dos épocas.

6.3. Genotoxicidad de las dosis equivalentes al PM_{10} en cada Sitio de Muestreo

Al comparar dentro de cada sitio (Intrasitio) se obtuvo con un valor $p < 0.001$ que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de las dosis y el control negativo en cada uno de los sitios, teniendo así que el daño o la genotoxicidad del control negativo representa un daño basal del ADN mientras que las dosis subtóxicas si poseen una actividad genotóxica importante causada por el material orgánico del particulado, es decir, las tres dosis resultaron genotóxicas en los tres sitios, independientemente de los niveles de PM_{10} que representan Barbosa, Corantioquia y Facultad de Minas (figura 8). Por otra parte se obtuvo que las dosis 50 y 100 μg equivalentes de PM_{10} , no presentan diferencias entre ellas con respecto al daño generado en ninguno de los tres sitios, mientras que la dosis 25 μg equivalente PM_{10} difiere significativamente del daño que ocasionan las otras dos dosis evaluadas (ver anexo 2, prueba de rangos múltiples).

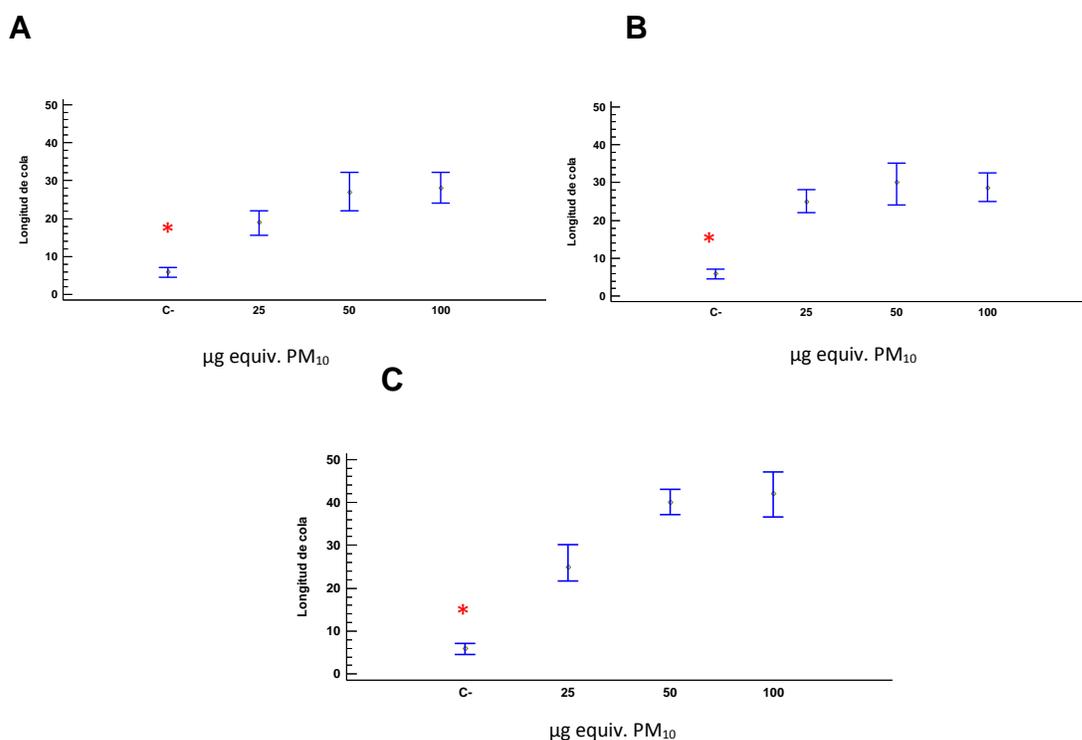


Fig. 8. Medianas de la longitud de cola en cada uno de los sitios. A) Barbosa B) Corantioquia C) Facultad de Minas

6.4. Relación Genotóxica del PM₁₀ entre los sitios y las dosis

La actividad genotóxica intersitios mostro que no existen diferencias marcadas entre Barbosa y Corantioquia, sin embargo, Facultad de Minas si presentó una actividad genotóxica mayor en comparación con los otros dos sitios ($p < 0.001$) para las tres dosis (fig. 9). Se corrobora que la dosis baja (25 μg equivalente de PM₁₀) posee una actividad genotóxica menor que las otras dos dosis, a pesar de esto, asumimos que no existe un efecto de dosis claro ya que no se evidencian diferencias marcadas entre las dosis 50-100 μg equivalentes de PM₁₀ (Para visualizar grupos homogéneos, anexo 3).

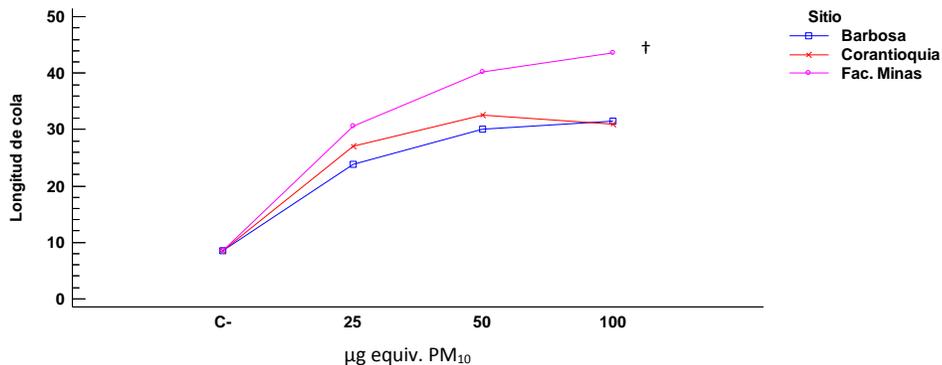


Fig. 9. Genotoxicidad vs dosis en los tres sitios de muestreo. † Diferencias significativas con respecto a los otros dos sitios ($p < 0.001$)

6.5. Relación Genotóxica del PM₁₀ entre los sitios y las épocas del año

Para las tres épocas del año Facultad de minas es significativamente diferente de los otros dos sitios evaluados, presentando genotoxicidad en aproximadamente 1.3 veces más. La época de transición representa para los tres sitios un incremento en la actividad genotóxica, mientras que entre los valores de daño en las épocas de lluvia y seca no se lograron establecer diferencias significativas dentro de cada sitio (intrasitio), a nivel intersitios si se logra dilucidar un efecto genotóxico diferencial (Anexo 3). En otras palabras, la época de transición tiene

un efecto importante en el incremento de la genotoxicidad, independientemente de los niveles de PM₁₀ homogéneos en las tres épocas en cada sitio (ver tabla 1), mientras que las diferencias entre las épocas de lluvia y seca sólo se ven al comparar entre sitios, dados los niveles diferenciales de material particulado muestreado en cada uno de ellos, mas no dentro de ellos (Fig. 10).

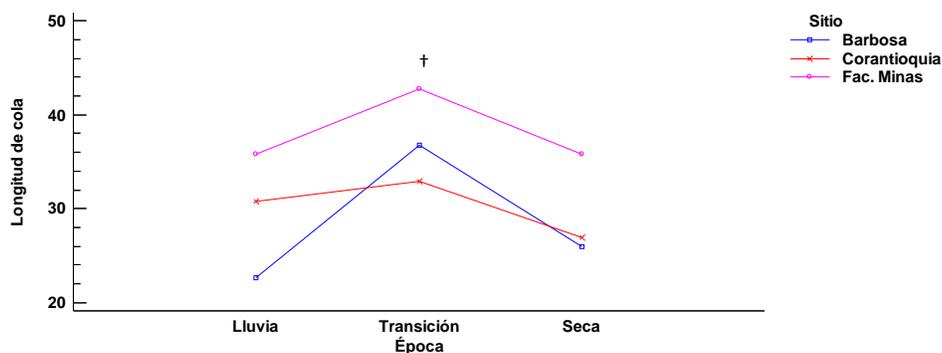


Fig. 10. Genotoxicidad vs época climática en los tres sitios de muestreo.

† Diferencias significativas con respecto a los otros dos sitios ($p < 0.001$).

6.6. Relación Genotóxica del PM₁₀ entre épocas climáticas y dosis

Se observó que no existe una correlación directa entre las dosis y las épocas climáticas con respecto a la longitud de cola o nivel de daño, se evidencia nuevamente que en la época de transición la genotoxicidad es mayor en comparación con las otras dos épocas, además de que el daño no incrementa necesariamente a medida que la dosis equivalente de PM₁₀ sea mayor, sino que su comportamiento es diferencial en cada una de las épocas (fig. 11).

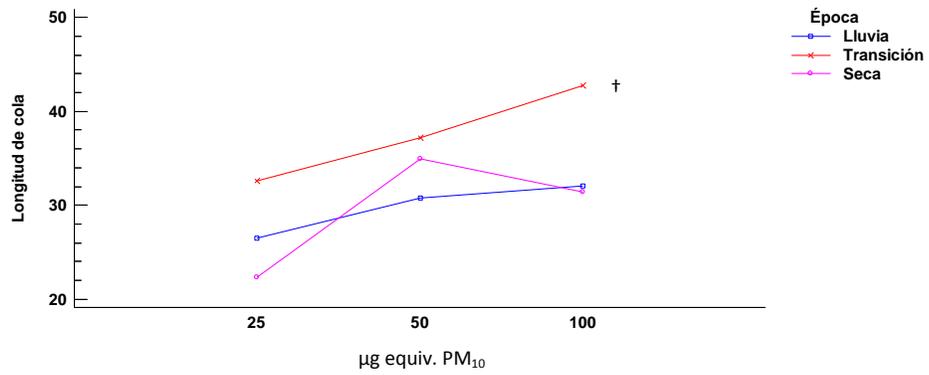


Fig. 11. Genotoxicidad vs dosis en las tres épocas climáticas. † Diferencias significativas con respecto a las otras dos épocas ($p < 0.001$).

7. DISCUSIÓN

El propósito principal de este estudio fue determinar la actividad genotóxica del PM_{10} en tres épocas del año y en diferentes sitios del Valle de Aburrá para tener una primera visión del posible riesgo que la contaminación atmosférica puede representar para la salud humana y del ecosistema. El uso de marcadores biológicos para dar cuenta de la calidad del aire aun no es implementado en el Valle de Aburrá y en este estudio se hizo uso de un biomarcador de genotoxicidad para complementar los monitoreos que se llevan a cabo en la actualidad.

Se logro determinar que si hay un efecto genotóxico del Material Particulado y que este puede ser diferencial dependiendo de la época climática y de lugares específicos con diferentes niveles y naturaleza de contaminantes (Tabla 2).

El Material Orgánico Extraíble (MOE) que se obtuvo presento características aceitosas, principalmente aquellos extractos obtenidos a partir de las muestras de PM_{10} tomadas en Facultad de Minas, esto posiblemente se deba a la procedencia del material particulado en dicha estación ya que el muestreador de alto volumen se encuentra a una distancia con respecto al piso de 3 m, lo que significa que está tomando PM_{10} principalmente proveniente del parque automotor, además dicha estación se encuentra sobre una de las carreras con mayor tráfico vehicular de la ciudad de Medellín (Crra 80) siendo ésta vía de entrada y salida de buses, camiones de carga y autos livianos, al occidente antioqueño y a la Costa Atlántica Colombiana (AREA METROPOLITANA, 2012). De las muestras tomadas en Corantioquia y en Barbosa, 15 y 6 m sobre el nivel del piso, respectivamente, podemos decir que están más asociadas a partículas de fuentes menos específicas, dada la altura de la toma de aire las fuentes de las que provienen dichas partículas pueden ser más diversas, las asociaciones en los dos casos pueden ser diferentes ya que facultad de minas muestrea partículas a las que la mayoría de la población humana estamos expuestos ambientalmente y por ello se puede relacionar mas con los efectos que pueda acarrear en la salud de la población, mientras que los otros dos sitios pueden dar cuenta de la exposición ambiental a un nivel más amplio de ecosistema (aves, plantas, etc.).

El tipo de combustible que se maneja en el Valle de Aburrá, su combustión incompleta y la cantidad de sulfuros aportan a este carácter del MOE. En otros estudios de genotoxicidad del aire en países como Argentina, Ecuador y Bélgica, no se reportan las características particulares del MOE a partir del PM₁₀; en todos ellos se hace separación y caracterización de las diferentes fracciones del extracto (Polares, no polares e HPA), lo cual le da relevancia a los resultados obtenidos en este estudio ya que el efecto genotóxico no se ha reportado en términos de mezcla compleja orgánica y la respuesta en el ADN puede ser diferente cuando éste es expuesto a la mezcla o a cada componentes por separado (Yvonne *et al.*, 2008). En mezcla se pueden dar interacciones entre dichos compuestos ocasionándose relaciones de sinergismos, antagonismos, entre otras. Así, el conocer la acción genotóxica tanto de la mezcla como de cada uno de los compuestos por separados nos da un contexto más amplio de lo que ocurre a nivel genómico, por lo que se pretende posteriormente hacer la respectiva caracterización de los compuestos orgánicos adheridos a las partículas contaminantes de esta región.

Los tres sitios de estudio fueron escogidos por sus diferentes niveles de contaminación por PM₁₀ (baja, mediana y alta), se podría pensar que Barbosa (bajos niveles de PM₁₀) presentaría una genotoxicidad baja o nula, sin embargo, se encontró que existe actividad genotóxica del MOE en los tres sitios y que dicho daño genético mínimamente triplica al daño basal o control, lo que quiere decir que el daño en el ADN es realmente significativo independientemente de los niveles del monitoreo ambiental actual; esto puede deberse a que los compuestos orgánicos que se adhieren a las partículas de 10µm pueden tener una actividad importante a nivel genómico, muchos de ellos catalogados por entes de regulación internacional como mutagénicos, genotóxicos y/o carcinógenos, como algunos Hidrocarburos policíclicos aromáticos (Yvonne *et al.*, 2008). En este punto vale la pena resaltar que no son suficientes los monitoreos químicos por si solos y que es de gran importancia hacer uso de los biomarcadores como complemento de la evaluación de la calidad del aire, ya que esto puede relacionarse con los efectos en la salud humana ambientalmente expuesta.

Las dosis 25 - 50 y 100 μg equivalentes de PM_{10} están asociadas a procesos de genotoxicidad dada su relación con las altas viabilidades postratamiento como lo plantea Platel (2010), sumado al daño en el ADN evidenciado con el ensayo cometa alcalino. Las dosis 50 y 100 μg equivalentes de PM_{10} presentaron un nivel de daño similar, siendo muy alto en ambas, esto puede deberse a que las células se saturan con la dosis mayor y no se permita el ingreso de todos los componentes orgánicos presentes en dicha dosis. Mientras que la dosis 25 μg equivalentes de PM_{10} , aún siendo genotóxica en todos los sitios y épocas climáticas representa diferencias con respecto a las otras dos dosis dado que el nivel de daño y el % de células con rupturas es menor, que es lo que se esperaría, dada la baja cantidad de MOE (figura 7).

En cuanto a las épocas climáticas evaluadas se obtuvo una mayor respuesta de daño en la época de transición, en la cual se estaba terminando el periodo de lluvias y comenzaría el periodo seco; las condiciones climáticas como la humedad relativa, incidencia solar, vientos entre otros pueden ser particulares durante esta época permitiendo así que la permanencia y la adherencia de otros contaminantes a las partículas sea mayor. Siendo arriesgada la interpretación, se cree que posiblemente el aumento de la humedad relativa cuando la incidencia solar es fuerte no permite ascender lo suficiente a las partículas en las columnas de aire y como en poco tiempo también se dan lluvias, estas ayudan a que el PM_{10} se precipite haciéndolo más permanente en el ambiente y aunque los niveles de PM_{10} dentro de cada sitio son homogéneos en las tres épocas esto podría estar influenciando más en la capacidad de adherencia de la partícula a los compuestos orgánicos. Aunque en los tres sitios el daño se incremento significativamente para esta época, en Barbosa particularmente el incremento de la actividad genotóxica fue más abrupto por lo que se podría pensar que se dio un evento específico. Para estos análisis resaltamos la importancia de hacer mediciones de todos estos parámetro climáticos al momento de muestreo para esclarecer la influencia de dichos factores ambientales en la genotoxicidad del Material particulado.

Esta investigación propone el ensayo cometa como un buen método para complementar los análisis de la calidad del aire del Valle de Aburrá, consideramos que la respuesta biológica evidenciada es importante a tener en cuenta para generar normatividades propias, además de implementar otros ensayos biológicos o biomarcadores que den cuenta además de la actividad mutagénica, epigenética, epidemiológica, etc.

8. CONCLUSIONES

El PM₁₀ tiene efecto genotóxico en los tres sitios independientemente de los niveles reportados en cada uno de ellos.

La época climática tiene incidencia sobre la genotoxicidad del Material Particulado siendo mayor en el periodo de transición.

El tipo de MOE es diferente en cada uno de los sitios, siendo más genotóxico el de Facultad de Minas.

Es necesario implementar biomonitoreos además del seguimiento químico ya que los sitios de moderado y bajos niveles de PM₁₀ que están dentro del rango aceptado por la norma actual tienen efecto genotóxico.

Se logro evidenciar un efecto temprano como respuesta a la exposición de PM₁₀ lo cual puede estar representa un riesgo para la salud de la población y del ecosistema.

El ensayo cometa es un buen biomarcador de genotoxicidad para ser implementado como complemento al monitoreo actual de la calidad del aire.

Es necesario implementar otro tipo de evaluaciones biológicas para robustecer el conocimiento a cerca de la actividad del Material Particulado.

Es necesario empezar a proponer y fortalecer los ya existentes programas de descontaminación en el Valle de Aburrá.

AGRADECIMIENTOS

“Por la noche, paseando en el atrio, bajo nubes sucias y bajas, vi por entre el ramaje de la ceiba a la Luna y sentí ahí mismo que la ceiba no existe sin la tierra y el aire, el calor y la humedad; que todos nos condicionamos...” F.G.

Al fin, la página que creemos más fácil de escribir pero que normalmente no puede llegar a magnificar la importancia de cada persona mencionada y hasta de algunas que se escapan al escrito, para poder cumplir con este trabajo con el que culminó mi pregrado. En primer lugar agradezco a mi familia por el apoyo, el cariño y la comprensión todos estos años de vida, a mi Asesora Luz Yaneth por convertirse en la lámpara que alumbró el “último” escalafón de esta etapa académica y por ser más que una profesora en mi vida, a la coasesora Lina Zapata y demás compañeras del laboratorio, Johana, Luisa, Sandra y Maribel por el acompañamiento y los momentos de dispersión, Andrea Manrique e Isabel Ortiz por su colaboración.

Sinceros agradecimientos a mis amigos, por ser la otra cara familiar, por su permanencia, por representar mi distracción y el escape en momentos difíciles, Pablo, Diego, Danieles, Mary, Oscar, Alejo, Natalia, Jorge y Andrés.

Al grupo REDAIRE por brindarnos la información y las muestras necesarias para emprender este proyecto, al grupo GAIA por el patrocinio, a Diana Agudelo por sus asesorías estadísticas, al instituto de biología y a la Universidad de Antioquia por la formación que me han brindado como persona y como futura profesional y por último a Christian Bustamante por su colaboración, por cuestionar todo lo que hice durante esta etapa y por su voz de aliento en gran parte de este proceso.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alem Natalie, Luján Marcos, Bascope Dennis. 2005. Impacto de la Contaminación del Aire en Enfermedades Respiratorias Atendidas en el Centro Pediátrico Albina Patiño. Universidad Católica Boliviana. *Acta Nova*. 3 (1): 56-78

Celis José. 2009. Aspectos generales de la contaminación atmosférica por material particulado. *Universidad de concepción, campus chillan*.

Daisey, L. M. 1988. Organic Compound in Urban Aerosols. *Anales de la Academia de Ciencias de New York*, 338: 50-69.

Dearfield KL, Cimino M, Mc Carroll NE, Mauer I, Valcovic LR. 2002. Genotoxicity assessment: a poposed classification strategy. *Mutation Research*. 521: 121 -135

Dearfield KL, & Moore MM. 2005. Use of genetic toxicology information for risk assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 46: 236 – 245

Den Besten P. 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in Environmental monitoring. *Marine Environmental Research*. 46 (5): 253 – 256

Dhawan, A., M. Bajpayee, D. Parmar. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, 25:5-32

Díaz Suárez Valeria & Páez Pérez Carlos. 2006. Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras ACTA NOVA. 3 (2): 308-322

Four V.A. Du, Larebeke N. Van, C.R. Janssen. 2004. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Genetic Toxicology and environmental Mutagenesis* 558:155-167

Hermelin Michel. 2007. Valle de Aburrá ¿Quo Vadis?. *Gestión y Ambiente*, 10 (2): 1-10

Hernández Luis, Rosalina González, Pérez Julia. 2010. Contaminación ambiental en Colombia. *MIRA, partido político*. 1: 15-30

Lozano, Nancy. 2004. Air Pollution in Bogotá, Colombia: A Concentration-Response Approach. *Redalyc: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 54: 133-177

McNamee, J.P., J.R. McLean, C.L. Ferrarotto, P.V. Bellier. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research*, 466:63-69

Mesa de Trabajo para el Medio Ambiente en Medellín. 2008. Proyecto Medellín Cómo Vamos. Página Web disponible en: www.medellincomovamos.org

MPCA (Minnesota pollution control agency. 2001. Criteria air pollution: Particulate matter (TPS and PM₁₀) in Minnesota. <http://www.pca.state.mn.us/air/emissions/pm10.html> .

Mudry, MD, Carballo, MA. 2006. Genética toxicológica. *Editorial de los cuatro vientos, Argentina*.

National Research Council. 1986. Environmental tobacco smoke: measuring exposures and assessing health effects. *National academy press*. 1: 133

Noble P. B and Cuttis J. H. 1967. Separation of blood leukocytes by ficoll gradient. *Can. Vet. Journal*. 8: 110-111

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research* 567: 109 – 149

Park Sy, Choi J. 2007. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environmental International* 33: 817 – 822

Pilinis, C., Seinfeld, JH. 1987. Continued development of a general equilibrium model for inorganic multicomponent atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment*. 21: 2453-2466.

Platel A, Gervais V, Sajot N, Nesslany F, Marzin D, Claude N. 2010. Study of gene expression profiles in TK6 human cells exposed to DNA-oxidizing agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 689(1-2):21-49.

REDAIRE, boletín N° 17, 2005.

Sato, m.i.z.; Valent, g.u.; Coimbra, c.a.; Coelho, m.c.; Sanchez Sanchez, p.; Alonso, c.d.; Martins, m.t. 1995. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutation Research*. 335 (3): 317-330

Singh, NP, M McCoy, R Tice, and E Edward.1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*.175: 184-19

Solarte, I., Caicedo, M., Restrepo, S. 1999. Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria en niños menores de 14 años en Santa fe de Bogotá. *Universidad Javeriana*.

Suzuki H, Zieger E. 2007. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research* 627: 41 – 58

Tancell, P. J.; Rhead, M. M.; Pemberton, R. P. Y Braven, J. 1995. Survival of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons During Diesel Combustion, *Environmental Science Technoogy*. 29: 2871-2876

Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, Jacobson K, Kirkland D, Mac Gregor JT, Marzin D, Ohyama W, Schuler M, Suzuki

H, Zieger E. 2007. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research* 627: 41 – 58

Toro G., M.V., Molina V., E., Serna P., J. 2010. Evaluación de los niveles de contaminación atmosférica en las zonas urbanas del Valle de Aburrá. Área metropolitana y Universidad Pontificia Bolivariana.

U.S. EPA, Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002 (EPA/600/8-90/057F).

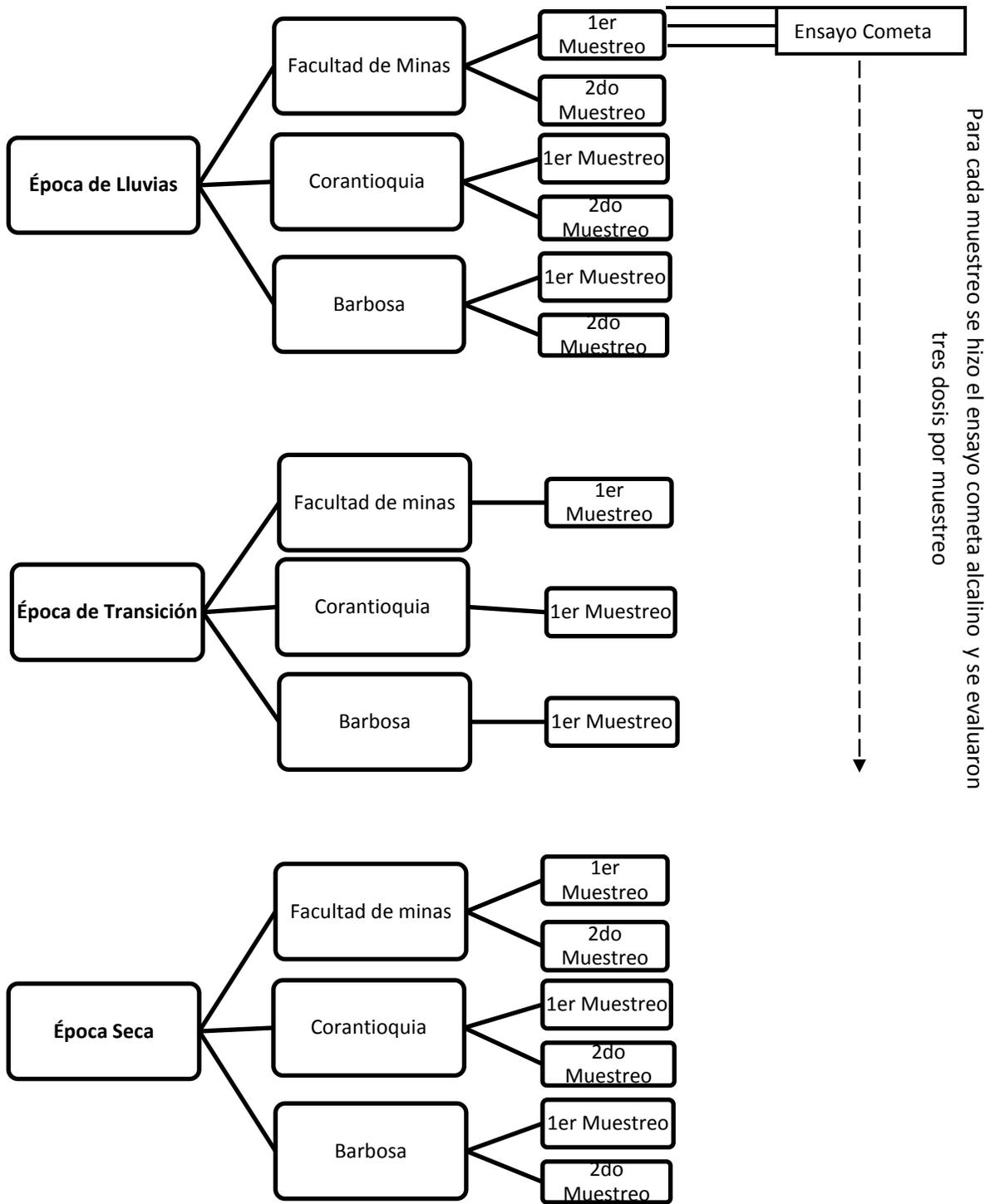
Warner F. Cecil, Wark Kenneth. 2004. Contaminación del aire: origen y control. *Limusa*. 9: 32.

Yvonne C. M. Staal¹, Daphnee S. Pushparajah², Marcel H. M. van Herwijnen, Ralph W. H. Gottschalk, Lou M. Maas, Costas Ioannides², Frederik J. van Schooten and Joost H. M. van Delft*. 2008. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures: Effects on gene expression and DNA adduct formation in precision-cut rat liver slices. *Mutagenesis* 23: 491-499.

Zuluaga Q. Mónica, Valencia R. Ana maria, Ortiz T. Isabel. 2009. Efecto mutagénico y genotóxico de contaminantes atmosféricos. *Redalyc: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Medicina UPB*. 28(1): 32-41

Zuñiga V, Liliana. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. *Editorial Univesidad autónoma de Barcelona*.

ANEXO 1. Esquema del diseño experimental



ANEXO 2. Prueba de Rangos múltiples para cada sitio con respecto a la dosis (ANOVA simple)

Barbosa

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de cola por Dosis

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Dosis(μg equiv PM_{10})</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C-	8,58	X
25	23,8667	X
50	30,0567	X
100	31,4467	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
C- 25	*	-15,2867	3,15328
C- 50	*	-21,4767	3,15328
C-100	*	-22,8667	3,15328
25 – 50	*	-6,19	3,15328
25- 100	*	-7,58	3,15328
50-100		-1,39	3,15328

* indica una diferencia significativa.

Corantioquia

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de cola por Dosis

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Dosis (μg equiv PM_{10})</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
---	--------------	--------------------------

C ⁻	8,58	X
25	27,03	X
50	30,9933	X
100	32,6167	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
C ⁻ - 25	*	-18,45	3,17077
C ⁻ -50	*	-24,0367	3,17077
C ⁻ -100	*	-22,4133	3,17077
25 – 50	*	-5,58667	3,17077
25- 100	*	-3,96333	3,17077
50-100		1,62333	3,17077

* indica una diferencia significativa.

Facultad de Minas

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de cola por Dosis

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Dosis (µg equiv PM₁₀)</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C ⁻	8,58	X
25	30,53	X
50	40,24	X
100	43,6767	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
------------------	-------------	-------------------	--------------------

C ⁻ - 25	*	-21,95	3,5101
C ⁻ -50	*	-31,66	3,5101
C ⁻ -100	*	-35,0967	3,5101
25 – 50	*	-9,71	3,5101
25- 100	*	-13,1467	3,5101
50-100		-3,43667	3,5101

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 3. Prueba de rangos múltiples combinando o relacionado diferentes factores (ANOVA multivariada)

Sitios vs Dosis

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de Cola por Sitio

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de cola por Sitio

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Sitio</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Barbosa	23,4875	0,59206	X
Corantioquia	24,805	0,59206	X
Fac. Minas	30,7567	0,59206	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Bar - Cora		-1,3175	1,64108
Bar- Minas	*	-7,26917	1,64108
Cora - Minas	*	-5,95167	1,64108

* indica una diferencia significativa.

Sitios vs Épocas

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de cola por Sitio

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Sitio</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma</i>	<i>Grupos</i>
--------------	-----------------	--------------	---------------

		LS	Homogéneos
Barbosa	28,4567	0,77730 2	X
Corantioq uia	30,2133	0,77730 2	X
Fac. Minas	38,1489	0,77730 2	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Bar - Cora		-1,75667	2,15454
Bar- Minas	*	-9,69222	2,15454
Cora - Minas	*	-7,93556	2,15454

* indica una diferencia significativa.

Época vs Dosis

Pruebas de Múltiple Rangos para Longitud de cola por Época

Método: 95,0 porcentaje LSD

Época	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Seca	29,57	0,780841	X
Lluvia	29,7433	0,780841	X
Transic ión	37,5056	0,780841	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Seca - Transic	*	-7,76222	2,16435

Seca - Lluvia		0,173333	2,16435
Transic- Lluvia	*	7,93556	2,16435

* indica una diferencia significativa.