

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón

Effects of air pollution in human lung cells

Gabriela Miguel-Pérez,^{1,2} Griselda Maya,³ Ana Rosa Flores-Márquez,³ Omar Amador-Muñoz,³ Rafael Villalobos-Pietrini,³ Pilar Eguía-Aguilar,² Mario Pérezpeña-Díazconti,² Francisco Arenas-Huerta^{1,2}

RESUMEN

Introducción. Las PM_{2.5} son componentes de la atmósfera de la Ciudad de México. Contienen, entre otros compuestos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que tienen efectos tóxicos conocidos. Debido a las diferencias en la composición de las PM_{2.5} en las diferentes zonas de la Ciudad de México, y la falta de información sobre sus efectos, el objetivo del estudio fue evaluar la cito y genotoxicidad de la fracción orgánica soluble que contienen los hidrocarburos aromáticos policíclicos, de las PM_{2.5} provenientes de las estaciones de monitoreo Noreste (NE), Centro (C) y Suroeste (SO) de la Ciudad de México, en cultivo de células NL-20 humanas durante 24 horas.

Métodos. Se extrajo la fracción orgánica soluble de los filtros con las PM_{2.5} de las diferentes estaciones de monitoreo. Se cultivaron las células bronquiales humanas y, posteriormente, se realizaron los ensayos de exposición a la fracción orgánica soluble para evaluar el efecto en la viabilidad y en la inducción de genotoxicidad.

Resultados. Los resultados mostraron que 0.1 µg/µl de fracción orgánica soluble de la estación Centro fue la más citotóxica, reduciendo a 52.4% y 54.2% la viabilidad celular, en las temporadas tanto de sequía como de lluvia, respectivamente. Esta fracción orgánica soluble indujo anomalías celulares, como multinucleación y atipia nuclear. Los porcentajes contrastaron con los obtenidos de la estación NE que fueron 91.2% y 85% a la misma concentración, respectivamente ($p < 0.05$). La concentración de 0.1 µg/µl, tanto de la estación NE como de la del C, fue genotóxica.

Conclusiones. La fracción orgánica soluble de la zona Centro fue la más citotóxica, ya que es la zona con mayor concentración de automóviles que son la fuente principal de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Palabras clave: contaminación, aire, hidrocarburos aromáticos, pulmón, células bronquiales.

ABSTRACT

Background. PM_{2.5} are components of the atmosphere of Mexico City and contain polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), which induce toxic effects. Due to different compositions of the PM_{2.5} in all zones of Mexico City and the lack of information about their effects, the main purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity due to soluble organic fractions (SOFs), which contains PAH isolated from the PM_{2.5} collected from several monitoring stations in Mexico City (northeast, downtown, and southwest) in a cell culture of human line NL-20 during a 24-h period.

Methods. We extracted the soluble organic fraction of PM_{2.5} filters from the different monitoring stations. Human bronchial cells were cultured and subsequently assays were performed on the exposure of SOFs to evaluate the effect on the viability and induction of genotoxicity.

Results. Results show that 0.1 µg/µl of SOF from the downtown station was more cytotoxic, reducing cell viability to 52.4% and 54.2% in both dry and rainy periods, respectively. Also, cellular anomalies were induced such as multinucleation and nuclear atypia. These percentages of cytotoxicity contrasted against those obtained from SOFs from the northeast area that were 91.2% and 85% at the same concentration during both dry and rainy periods, respectively ($p < 0.05$). Only at 0.1 µg/µl SOF were the results genotoxic from the northeast and downtown ($p < 0.05$).

Conclusions. SOFs from the downtown zone were the most cytotoxic due to the high concentration of automobiles as the main sources of PAH.

Key words: pollution, air, polycyclic aromatic hydrocarbons, lung, bronchial cells.

¹ Facultad de Ciencia y Tecnología,
Universidad Simón Bolívar

² Departamento de Patología,
Hospital Infantil de México Federico Gómez

³ Laboratorio de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas,
Centro de Ciencias de la Atmósfera-Universidad Nacional Autónoma de México

México, D.F., México

Fecha de recepción: 05-02-13

Fecha de aceptación: 05-03-13

INTRODUCCIÓN

La vida en las grandes ciudades demanda el uso de un gran número de vehículos automotores, así como la quema de grandes cantidades de combustibles fósiles, como gasolina y diesel.¹ Se sabe que el parque vehicular que circula en la Ciudad de México (CM) es de aproximadamente 3 millones de automóviles. Se suman además las casi 33,000 industrias localizadas en la zona noreste (NE) y noroeste (NO) de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), que incluye territorialmente al Distrito Federal (DF), así como un gran número de municipios del Estado de México (al norte del DF) e incluso algunos del Estado de Hidalgo.² Por lo tanto, la atmósfera contiene una mezcla compleja de contaminantes, entre los cuales están gases, humos, vapores, partículas orgánicas, inorgánicas y aeropartículas de origen biológico.³ Por diferentes razones, la materia particulada menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) ha despertado la atención de su estudio, porque representan una mezcla compleja que puede contener compuestos tanto de origen natural como del producto de las actividades antropogénicas. Pueden contener compuestos orgánicos tanto cíclicos como no cíclicos, dentro de los cuales están algunos con potencial carcinógeno.⁴ La CM tiene en funcionamiento, desde 2004, estaciones de monitoreo para medir las concentraciones de las $\text{PM}_{2.5}$. Actualmente existen redes tanto automáticas como manuales que realizan la medición de éstas en la atmósfera de la ZMVM.⁵ Los estudios clínicos y epidemiológicos demuestran que existe mayor riesgo de desarrollar enfermedades pulmonares⁶ y cardíacas,^{7,8} debido a la exposición de las $\text{PM}_{2.5}$. Los primeros estudios descriptivos de los efectos tóxicos en células bronquiales humanas se realizaron analizando diferentes fracciones extraíbles de filtros reteniendo PM_{10} de la atmósfera de la ZMVM. Estos demostraron el efecto genotóxico⁹, citotóxico y proinflamatorio.¹⁰⁻¹² Sin embargo, no se conoce el potencial tóxico de las $\text{PM}_{2.5}$ en células bronquiales humanas. Una forma de analizar este efecto es evaluar la fracciones extraíbles de los filtros que retienen estas partículas. En el Laboratorio de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas del Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA)-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se realizó el análisis de la composición química y la distribución espacial y temporal de los principales componentes de las $\text{PM}_{2.5}$ en la atmósfera de la CM. Este es el primer esfuerzo integral en describir los

principales compuestos contenidos de estas partículas. Los resultados revelaron que los compuestos orgánicos se distribuyen de acuerdo con las características industriales y de las actividades de cada zona. Por ejemplo, las $\text{PM}_{2.5}$ del NO y sureste (SE) se asocian con fuentes primarias; en cambio, en las zonas NE, centro (C) y suroeste (SO) el origen de las $\text{PM}_{2.5}$ está asociado a fuentes secundarias, es decir, a combustión incompleta de combustibles. La zona NE se caracteriza por compuestos provenientes de la combustión incompleta de la quema de diesel de la zona industrial. En cambio, la zona C se caracteriza por la concentración vehicular y la combustión incompleta de la gasolina, que es la fuente principal de las $\text{PM}_{2.5}$. La zona SO, debido a la dirección de los vientos, se caracteriza por los compuestos que son desplazados de las zonas NE y C, modificados, además, por la acción de la luz solar, generando compuestos oxidados. También contiene compuestos provenientes de fuentes biogénicas, principalmente de árboles y otras especies vegetales.⁴

El presente trabajo se realizó con el objetivo de conocer el efecto de la fracción orgánica soluble (FOS) extraída de los filtros con las $\text{PM}_{2.5}$ de las estaciones de San Agustín (NE), Merced (C) y Coyoacán (SO) en células NL-20 humanas.

MÉTODOS

Extracción de la fracción orgánica soluble (FOS) de los filtros con las $\text{PM}_{2.5}$ de las diferentes estaciones de monitoreo

La extracción se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas del CCA-UNAM. Se localizaron los filtros correspondientes a los meses de abril (temporada sequía/cálido, S/C) y agosto (temporada lluvia/cálido, LL/C) del 2006 de las tres estaciones de muestreo de la CM que serán identificadas como NE, C y SO, y que correspondieron a San Agustín, Merced y Coyoacán, respectivamente.

Todo el material fue previamente lavado con acetona para evitar contaminaciones.

Posteriormente, los filtros se colocaron en un matraz de 100 ml y se le agregaron 50 ml de diclorometano (DCM). El matraz se colocó en un ultrasonificador a 60°C, con el refrigerante a -5.4°C durante 30 minutos. Después de este lapso, el DCM de esta primera extracción se pasó a un matraz nuevo y se realizó una segunda extracción con

las mismas condiciones. Se dejó enfriar para continuar con la reducción, que consistió en colocar el matraz con los 100 ml finales de producto de extracción en un rotavapor a 30°C, con una presión de 5 pulgadas de Hg y 120 rpm. De esta reducción se obtuvo un concentrado que se filtró con acrodiscos (MILLEX-NH, de nylon de 33 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro), en matraces aforados de 1ml, realizando varios enjuagues con DCM. Cuando la muestra rebasó 1ml, el exceso se evaporó con una corriente muy suave de nitrógeno líquido hasta el aforo a 1ml. Finalmente, los extractos se pasaron a viales etiquetados y fueron almacenados a -4°C.

La determinación de la FOS se realizó por diferencia de peso. Se pesaron los viales vacíos en la balanza analítica y, posteriormente, se tomaron 200 µl del extracto antes mencionado, de cada mes y estación por separado. Se colocaron en los viales pesados para reducirlos con una corriente suave de nitrógeno líquido y finalmente fueron pesados nuevamente (Cuadro 1).

Cultivo de células bronquiales humanas

Se utilizó la línea celular bronquial humana NL-20 (ATCC). Las células se crecieron en medio de cultivo F12 enriquecido con 4% de suero fetal bovino, 2.0 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 5 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de factor de crecimiento epidérmico, 1 µg/ml de transferrina, 500 ng/ml de hidrocortisona, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina-G. Las células se crecieron a confluencia y se despegaron con tripsina 0.05% y verseno 0.01% en solución salina al 0.9%. Posteriormente se realizaron los microensayos de exposición a la FOS para evaluar el efecto en la viabilidad y en la inducción de genotoxicidad mediante el ensayo cometa.

Cuadro 1. Determinación de la masa de la FOS para cada estación de muestreo

Estación	FOS obtenida (mg)
NE, San Agustín, Abril	0.89
NE, San Agustín, Agosto	1.31
CENTRO, Merced, Abril	0.60
CENTRO, Merced, Agosto	0.40
SO, Coyoacán, Abril	0.92
SO, Coyoacán, Agosto	0.85

FOS: fracción orgánica soluble; NE: noreste; SO: suroeste.

Ensayo de viabilidad celular por cristal violeta

Se sembraron 8000 células por cada pozo en una placa de 96 pozos. Se dejaron adherir durante 24 horas. Al día siguiente, se expusieron a la FOS durante 24 horas mediante el siguiente esquema experimental: testigo, testigo con alcohol 96 (vehículo de la FOS) y las diferentes concentraciones de la FOS en dos esquemas:

- esquema A o logarítmico
- esquema B o CCA (Centro de Ciencias de la Atmósfera).

Todos se realizaron por triplicado

Las concentraciones del esquema A fueron 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 µg/µl de FOS que corresponden al ensayo típico de diluciones logarítmicas.

El esquema B consistió de 5, 8, 13, 17 y 20.5 µg/ml de FOS. Se tiene el antecedente de que en este esquema B se indujeron mutaciones puntuales en el sistema de *Salmonella*, en el operón de la histidina, debido a la FOS obtenida de las PM₁₀, por lo que se consideró evaluarlo en las células bronquiales. Por lo tanto, el esquema A representa altas concentraciones y el esquema B bajas concentraciones de exposición a la FOS.

Posteriormente, los pozos se lavaron dos veces con 100 µl de solución de NaCl al 0.9%, se retiró esta solución y se fijaron las células, agregando 100 µl de formol al 10%. Se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar, para agregar 100 µl de cristal violeta (CV) a cada pozo durante 10 minutos. Finalmente, se recolectó el excedente del colorante, se lavó la placa con agua corriente hasta retirar todos los residuos y se dejó secar para su posterior análisis.

Para determinar la viabilidad celular, se agregaron 100 µl de ácido acético al 33% a cada pozo, se recolectó el colorante y se colocó en una celda. Se llevó a 500 µl de volumen con ácido acético al 33% y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm. Se consideró 100% de viabilidad a la lectura obtenida del grupo testigo (sin exposición) y a partir de ésta se calcularon los porcentajes de viabilidad en cada caso expuesto a la FOS. Finalmente, las células se volvieron a teñir con el procedimiento antes mencionado, para posteriormente obtener microfotografías y evaluar los cambios morfológicos correspondientes en un microscopio óptico invertido.

Evaluación de la genotoxicidad mediante el ensayo cometa

Primero se retiró el medio de cultivo a las células y se despegaron con 100 μ l de una solución de tripsina-verseño al 10% en NaCl al 0.9%. Se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Las células despegadas se recolectaron en microtubos de 0.6 ml (un tubo por pozo). Se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, se retiró la solución cuidadosamente sin tocar el botón celular, y se agregaron 150 μ l de medio completo.

Para los ensayos cometa se realizaron las preparaciones en portaobjetos precubiertos con agarosa de punto de fusión normal. Se mezcló la suspensión celular con agarosa de bajo punto de fusión, después se introdujeron en solución de lisis fría (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM pH 10, Triton X-100 1%, DMSO 10%, los últimos dos componentes son añadidos antes de usarse), al menos por 1 hora. Posteriormente, permanecieron en una cámara de electroforesis horizontal con amortiguador a pH 13 por 20 minutos para que se llevara a cabo la desnaturalización del ADN. Finalmente, se realizó la electroforesis a 25 voltios y 300 mA durante 20 min, para permitir la separación del ADN fragmentado. Después, se retiró el exceso de álcali con un amortiguador neutro (Tris 4M) y se fijaron con etanol al 100%. Se tiñeron con bromuro de etidio (2 μ g/ml) y se observaron al microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Empleando el programa Comet Assay IV, se analizaron 25 núcleos de 3 preparaciones por grupo. Este programa mide la longitud de la cabeza, intensidad de la cabeza, longitud de la cola, intensidad de la cola y momento de la cola de cada uno de los núcleos.

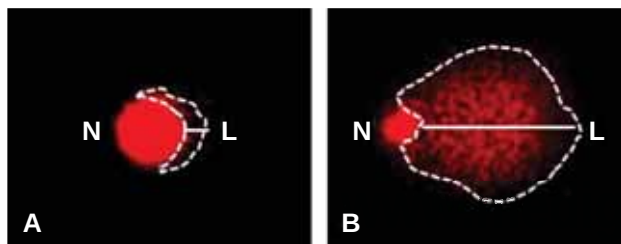


Figura 1. Inducción de cometas por efecto de la fracción orgánica soluble de los filtros de la ciudad de México. Utiliza el principio de la disminución del núcleo de la célula (N), a expensas del aumento en el largo (L) de la cola del cometa (zona punteada). A) Célula testigo. B) Célula con daño nuclear. Tinción con bromuro de etidio y microscopía de fluorescencia (200X).

De los parámetros anteriores se consideró el del momento de la cola, ya que toma en cuenta tanto la longitud como la intensidad de la cola del cometa, que es la cantidad de ADN fragmentado por el efecto genotóxico (Figura 1). Esta medición se denominó índice de genotoxicidad (IG).

Análisis estadístico

Las diferencias en los porcentajes de viabilidad, así como la inducción de la FOS se evaluaron mediante un ANOVA. Se consideraron significativas las diferencias cuando el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Viabilidad celular por efecto de la FOS

Se realizaron los ensayos concentración-respuesta en la viabilidad celular utilizando los esquemas A y B descritos anteriormente. Estos resultados mostraron un aumento en la viabilidad, que se interpreta como proliferación celular (por efecto de la FOS) en las estaciones NE y SO. Esto no se observó en las células expuestas a la FOS de la zona C. De primera instancia siempre fue menor al 100% y, a mayor concentración de la FOS, disminuyó la viabilidad celular, principalmente en la FOS obtenida de la temporada de sequía. De esto se puede decir que los componentes orgánicos de los filtros con PM_{2.5} de la zona C contienen compuestos tóxicos que inducen la disminución en la viabilidad de las células bronquiales, con una concentración letal media (CL₅₀) de 0.1 μ g/ μ l para el esquema A y de 17 μ g/ml para el esquema B (Cuadro 2). Se puede observar que en ambas temporadas los compuestos de la FOS de la estación NE prácticamente no fueron tóxicos: el menor porcentaje de viabilidad se observó a 17 μ g/ml y que correspondió al 85%. Sin embargo, todas estas diferencias con respecto al testigo fueron significativas ($p < 0.05$). Esto se puede corroborar también en la Figura 2 que ilustra mínimos cambios celulares en cuanto a morfología y respuesta de las células NL-20, y se observa un número celular similar entre el testigo (Figura 2A) y todos los expuestos a la FOS de la estación NE (Figuras 2 B-E). Una respuesta similar se observó con el efecto de la FOS de la estación del SO. Sin embargo, en la temporada de lluvias se registró un aumento discreto en la viabilidad para las dos concentraciones del esquema B, lo que significa proliferación celular. Las concentraciones de 0.1 μ g/ μ l y 17 μ g/ml resultaron ser más tóxicas, ya que indujeron

Cuadro 2. Efecto en la viabilidad de las células NL-20 por las diferentes FOS de las estaciones NE, CENTRO y SO de la Ciudad de México

Estación monitoreo	NE		CENTRO		SO	
Temporada	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
Esquema A						
0.0001 µg/µl	98.4 ± 0.002	98.7 ± 0.0	88.4 ± 0.001	97 ± 0.002	84.2 ± 0.001	107.7* ± 0.005
0.1 µg/µl	91.2 ± 0.001	74 ± 0.003	52.4* ± 0.002	54.2* ± 0.003	74.3* ± 0.004	78.1 ± 0.001
Esquema B						
5 µg/ml	98.7 ± 0.001	90 ± 0.001	85.9 ± 0.003	74.6 ± 0.004	107.7 ± 0.006	102.0 ± 0.007
17 µg/ml	84.9* ± 0.006	122.4* ± 0.007	51.3* ± 0.002	96.1 ± 0.001	50.9* ± 0.003	103.6* ± 0.002

Las cifras representan el porcentaje de viabilidad.

NE: noreste; SO: suroeste

* $p < 0.05$

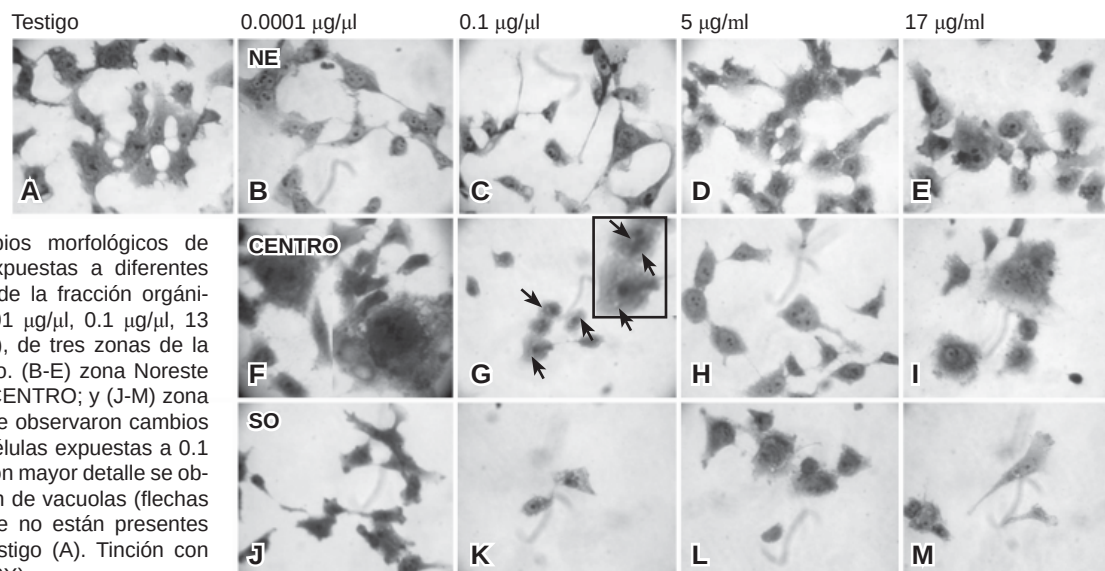


Figura 2. Cambios morfológicos de células NL-20 expuestas a diferentes concentraciones de la fracción orgánica soluble (0.0001 µg/µl, 0.1 µg/µl, 13 µg/ml y 17 µg/ml), de tres zonas de la Ciudad de México. (B-E) zona Noreste (NE); (F-I) zona CENTRO; y (J-M) zona Suroeste (SO). Se observaron cambios importantes en células expuestas a 0.1 µg/µl (flechas). Con mayor detalle se observa la inducción de vacuolas (flechas en recuadro), que no están presentes en las células testigo (A). Tinción con cristal violeta (200X).

viabilidades de 74.38 y 78.17%, respectivamente. Esto se puede corroborar al observar una disminución de células por campo (Figuras 2K y 2M, respectivamente). También en todas las concentraciones se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al testigo. La FOS de la estación C, como anteriormente se mencionó, fue la más tóxica pues se observaron CL_{50} a 0.1 µg/µl en ambas temporadas, y a 17 µg/ml sólo en la temporada de sequía. A estas concentraciones se observó la disminución de células por campo, y la presencia de algunas de ellas con signos de muerte, como vacuolización importante en el citoplasma (Figura 2G, y ampliación). Llama la atención del cambio observado en grupos celulares multinucleados y colonias con características atípicas en las células expuestas a

0.0001 µg/ml y 17 µg/ml (Figuras 2F y 2I). Lo que es patente en las FOS es que la temporada de lluvia produce una disminución de los compuestos tóxicos, pues es cuando los porcentajes de viabilidad se incrementan respecto a los observados en la temporada de sequía. De estos resultados se puede concluir que los compuestos contenidos en las FOS de las tres estaciones son diferentes entre sí, ya que las células bronquiales respondieron de manera diferencial. Los compuestos orgánicos de la FOS de la estación C son los más tóxicos quizá por su contenido (Cuadro 3), así como capaces de inducir cambios atípicos celulares. La temporada de lluvia produce una reducción de estos compuestos tóxicos, ya que la viabilidad se incrementa con respecto a lo observado en la temporada de sequía.

En relación con el potencial tóxico de las FOS extraídas de las PM_{2.5} revelaron este patrón de respuesta: CENTRO > SO > NE.

Genotoxicidad inducida por la FOS

Una vez caracterizado el potencial tóxico de las diferentes FOS de las tres estaciones, el siguiente paso fue evaluar su potencial genotóxico (Cuadro 4). Se realizaron los ensayos cometa para medir la genotoxicidad inducida a las mayores concentraciones probadas. Se puede observar que en la temporada de sequía se indujo el doble de IG a 0.1 µg/µl en las estaciones NE y CENTRO; y ligeramente mayor en la SO con respecto al testigo. Sólo en estas fueron significativas ($p < 0.05$). En cuanto a la temporada de lluvia, no se encontraron IG inducidos por estas FOS en las estaciones. En resumen, se puede decir que sólo las FOS de la temporada de sequía fueron genotóxicas en las células bronquiales, y que en la temporada de lluvia se reduce el potencial genotóxico de las FOS.

Concentraciones de compuestos orgánicos en las estaciones NE, CENTRO y SO

Finalmente, se decidió comparar los tipos de compuestos predominantes en cada una de las estaciones y en ambas temporadas. El Cuadro 4 muestra, de manera general, que las concentraciones de PM_{2.5}, Benzo- α , Benzo-*ghi*, HAP-pesados, 7-HAP-car y Nitro-HAP fueron siempre mayores en la temporada de sequía que en la de lluvia. Este hecho correlaciona con la disminución en la viabilidad en las células NL-20 solo a 0.0001 µg/µl y a 17 µg/ml. Los resultados revelan que no existe una tendencia a considerar que a las mayores concentraciones de cualquier esquema tenga la propiedad de ser más tóxico. Pero lo que sí es patente es que al menos para PM_{2.5}, Benzo-*ghi*, HAP-pesados y Nitro-HAP contenidos en las fracciones de la zona C siempre fueron mayores que las obtenidas de las estaciones NE y SO; y que correlaciona de manera general tanto con la menor viabilidad (Cuadro 2) como con las alteraciones celulares observadas justamente en las células expuestas a la FOS obtenida de esta estación (Figura 2).

Cuadro 3. Contenido de componentes en los filtros de las tres estaciones de monitoreo

	NE		CENTRO		SO	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
PM _{2.5} (µg/m ³)	25.56 ± 5.0	11.25 ± 5.50	27.0 ± 7.20	14.80 ± 7.0	22.61 ± 5.50	12.2 ± 5.27
Benzo- α (ng/m ³)	0.41 ± 0.18	0.28 ± 0.12	0.35 ± 0.44	0.32 ± 0.12	0.27 ± 0.14	0.19 ± 0.09
Benzo- <i>ghi</i> (ng/m ³)	1.21 ± 0.41	0.82 ± 0.27	1.70 ± 0.42	1.25 ± 0.36	1.04 ± 0.40	0.78 ± 0.27
HAP-pesados (ng/m ³)	5.12 ± 2.01	3.35 ± 1.3	5.64 ± 1.85	3.74 ± 1.30	3.5 ± 1.5	2.34 ± 0.95
7-HAP-car (ng/m ³)	2.7 ± 0.95	1.76 ± 0.74	2.70 ± 0.88	1.70 ± 0.56	1.70 ± 0.70	1.06 ± 0.40
Nitro-HAP (ng/m ³)	135.6 ± 66.0	132.0 ± 68.0	150.4 ± 65.0	132.3 ± 70.3	98.4 ± 46.3	95.7 ± 38.1
Alcanos C ₁₉₋₂₂ (ng/m ³)	7.76 ± 3.0	7.05 ± 3.0	3.62 ± 2.0	3.5 ± 1.80	2.10 ± 1.10	2.405 ± 0.88
Alcanos C ₂₃₋₂₆ (ng/m ³)	34.0 ± 13.8	30.1 ± 7.20	29.1 ± 11.36	23.3 ± 5.82	12.1 ± 4.44	13.5 ± 5.70
Alcanos C ₂₇₋₃₃ (ng/m ³)	30.1 ± 16.4	8.64 ± 3.11	31.55 ± 20.0	9.06 ± 3.36	26.0 ± 17.10	8.82 ± 2.73

NE: noreste; SO: suroeste; HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos

Cuadro 4. Genotoxicidad inducida en las células NL-20 por las diferentes FOS de las estaciones NE, CENTRO y SO de la Ciudad de México

Estación monitoreo	NE		CENTRO		SO	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
Temporada						
Testigo	0.7 ± 0.14	1.6 ± 0.12	1 ± 0.18	1 ± 0.16	1.4 ± 0.17	1.8 ± 0.26
Esquema A						
0.1 µg/µl	1.5 ± 0.18	1 ± 0.12	1.9* ± 0.15	1.2* ± 0.16	1.3* ± 0.13	1.8 ± 0.16
Esquema B						
17 µg/ml	0.85* ± 0.24	1.2 ± 0.12	0.87* ± 0.12	1* ± 0.17	1.8 ± 0.23	1.6* ± 0.18

Los valores se expresaron como índice de genotoxicidad (IG).

NE: noreste; SO: suroeste.

* $p < 0.05$

DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto biológico de la FOS extraída de filtros de tres estaciones de monitoreo: NE, C y SO de la CM, en cultivos de células bronquiales humanas. Los resultados mostraron, en primera instancia, que por la composición química de la FOS de las tres estaciones hay ciertas diferencias en cuanto al contenido de los compuestos orgánicos analizados, así como en la cantidad de $PM_{2.5}$ totales. Se observó una elevación en las concentraciones de la $PM_{2.5}$, así como en Benzo-*ghi*, HAP-pesados y Nitro-HAP en la FOS obtenida del filtro de la estación C. Esto correlacionó, además, con los porcentajes de menor viabilidad que se observaron principalmente en las células expuestas a la FOS de esta estación, y representaron concentraciones cercanas a la CL_{50} . Al cuestionarse acerca de cuáles serían los mecanismos de daño de los HAP sobre las células que inducen la toxicidad, se planteó que los HAP son compuestos hidrofóbicos y pueden entrar a las células, atravesando la membrana plasmática. Plant y colaboradores plantearon un sistema de tres medios que pueden explicar la entrada de los HAP.¹³ El primero es la existencia de un acarreador de los HAP, que pueden ser lipoproteínas o vesículas fosfolipídicas, incluso albúmina. Esto proviene de la observación de que al agregar suero aumenta el metabolismo de los HAP.¹⁴ De ahí, transportar los HAP al segundo medio (que es la membrana celular) puede ser rápido, como lo han reportado Penn y colaboradores.¹⁵ Sin embargo, el transporte al tercer medio, que es cualquiera de los compartimientos intracelulares —incluida la membrana nuclear— no se ha comprobado. Lo cierto es que los HAP no pueden difundir a través de un medio acuoso¹⁶ y siempre van a requerir un vehículo/acarreador lipídico. Un efecto que puede provocar un HAP al interaccionar con la membrana citoplasmática es la de romper su equilibrio al intercalarse en la bicapa lipídica. Si bien es difícil demostrar esto en la célula, existen algunos modelos como el de calorimetría diferencial de barrido de la bicapa lipídica.¹⁷ Esta técnica detecta el desorden de una estructura lipídica por la presencia de moléculas extrañas. Librando y colaboradores demostraron por esta técnica que los HAP fluoreno, fluoranteno y el indeno (1,2,3-cd) pireno dispersados en liposomas, inducen desorden de la bicapa.¹⁷ Los tres HAP son incapaces de migrar a través del medio acuoso, pero cuando se ponen en contacto liposomas cargados con los tres HAP e interaccionan con

liposomas vacíos, al menos el fluoreno es capaz de migrar de una membrana liposómica a otra que no lo contiene. No sabemos cuáles de los HAP contenidos en las FOS analizadas pueden estar provocando el desorden de la membrana y, en consecuencia, iniciar la lisis celular. Lo cierto es que el Benzo-*ghi* perileno y los Nitro-HAP son los que se encuentran a mayores concentraciones en los filtros de la estación C, respecto a los compuestos orgánicos de las otras dos estaciones. Es difícil en este momento postular que uno o ambos estén participando fuertemente en inducir la muerte e iniciarla a nivel de membrana en las células bronquiales. Sin embargo, es un antecedente importante para iniciar un estudio de desorganización de la membrana y comparar la capacidad de hacerlo en cualquiera de estos dos o la mezcla de ambos. Además, ésta es una respuesta rápida que se registró a las 24 horas de exposición. Otra forma es que los HAP pueden transferirse de manera directa de las partículas ultrafinas a la membrana plasmática.¹⁵ Finalmente, también pueden hacerlo mediante tráfico de vesículas. El análisis por microscopía de luz revela que las partículas producidas por combustión de diesel que contienen las mayores concentraciones de HAP, pueden entrar a la célula rodeadas de una membrana, en el interior de una vacuola.¹⁸

Los resultados del presente estudio con la técnica utilizada que midió viabilidad, cristal violeta, revelaron un efecto a nivel de membrana celular: células sin daño retienen el colorante, después de lavados fuertes. Existen otros efectos, como la activación de la vía de los aril-hidrocarburos (AhR), que utiliza una proteína de membrana que es el receptor AhR, y posteriormente activa una serie de señales entre las cuales están la activación/expresión de genes de la fase I de la activación de los compuestos xenobióticos, como los citocromos; la activación/expresión de los genes de la fase II de desintoxicación de estos compuestos como glutatión-sulfhidrilo-transferasa, enzimas glucuronizantes que modifican con el objeto de aumentar su hidrosolubilidad. Y, finalmente, otros genes blanco relacionados a procesos tan generales como apoptosis, necrosis y autofagia, que pueden participar en la respuesta biológica pero no fueron evaluados en el presente estudio.¹⁹

Se observó menor efecto tóxico debido a las FOS de las estaciones del NE y del SO. Un hecho similar también lo reportaron otros analizando las $PM_{2.5}$ de otras ciudades de Estados Unidos.²⁰ Por ejemplo, Chirino y colaboradores comprobaron que las PM_{10} producen daño y dismi-

nución en los sistemas de defensa antioxidante, pero no afecta la viabilidad de las células.²¹ La disminución del efecto tóxico de las FOS principalmente en la temporada de lluvia, es un hecho que se ha demostrado de manera *in vitro* en muestras tomadas en París,²² y el efecto es el “lavado” y disminución de la concentración de varias sustancias entre ellas, probablemente los compuestos orgánicos de la FOS. Sin embargo, a veces el efecto tóxico discreto de las PM_{2.5} o de las FOS está asociado a la generación de radicales libres o iones superóxido y peróxido, que quizá dañan de manera importante el núcleo y no la membrana celular.²³ Lo cierto es que las FOS de las temporadas de sequía reducen la viabilidad de manera evidente, en comparación con el efecto de la FOS de temporada de lluvias (Cuadro 2). Sin embargo, las muestras menos tóxicas que reducen de manera discreta la viabilidad, como las FOS de las estaciones NE y SO, no producen genotoxicidad importante. Las FOS pueden activar genes que participan en el inicio de respuestas inflamatorias, más que en la inducción de muerte celular.^{22,23} Lo que es patente es la respuesta debida a la FOS, más que a las fracciones hidrosolubles o PM_{2.5} lavadas previamente.²⁴

La genotoxicidad debida a la FOS se ha reportado en otros momentos, debido a las PM₁₀ de la CM^{11,24,5} y PM_{2.5}.²⁶ Para la inducción del efecto genotóxico se propone que los HAP contenidos en la FOS pueden inducir la formación de radicales superóxido, así como activación metabólica de los mismos, formando compuestos tóxicos que pueden interaccionar directamente con centros nucleofílicos, como las bases nitrogenadas del ADN, intercarse y formar aductos. O, indirectamente, mediante el daño al ADN vía la formación de los radicales superóxido. Sin embargo, todos estos estudios puntualizan el hecho de que el efecto genotóxico también depende de la composición de los HAP,²⁷ y en nuestro caso de los HAP contenidos en la FOS. Tal es el caso de la FOS de la estación CENTRO que contiene mayor concentración de PM_{2.5} totales, así como Benzo-*ghi*, HAP-pesados y Nitro-HAP. Sin embargo, estas FOS no inducen efecto genotóxico tan notable como el producido por FOS obtenida de la quema de leña, y del hollín (Villeda-Cuevas 2012, resultados no publicados).

Podemos concluir que las FOS de las estaciones NE, C y SO en la temporada de sequía presentaron efectos citotóxicos, de los cuales la FOS de la estación C fue más citotóxica y también fueron genotóxicos a la concentra-

ción de 0.1 µg/µL, tanto en la estación NE como en la del C. Éste es el primer estudio que evalúa el efecto tóxico de FOS obtenida de filtros PM_{2.5} de la CM en células de una línea bronquial humana en México.

Se evaluará el efecto de la exposición a las FOS en la inducción/activación de la vía AhR, así como la activación de otras vías como la de apoptosis, autofagia y microRNAs de respuesta a HAP ambientales y que regulan otros procesos como viabilidad celular y diferenciación entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez por el apoyo al presente trabajo, mediante el proyecto HIM/2011/008; y al Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y de Alta Especialidad (Gabriela Miguel-Pérez). También al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Sistema Nacional de Investigadores, SNI (Francisco Arenas-Huertero).

Autor de correspondencia:

Dr. Francisco Arenas-Huertero

Correo electrónico: farenashuertero@yahoo.com.mx

REFERENCIAS

1. Molina MJ, Molina LT. Megacities and atmospheric pollution. J Air Waste Manag Assoc 2004;54:644-680.
2. Lezama JL. Medio Ambiente, Sociedad y Gobierno: la Cuestión Institucional. México: El Colegio de México; 2006.
3. Salazar-Flores M, Rivera-Rodríguez RM, Vázquez-Manriquez ME, Arenas-Huertero F. Synergistic effect of air pollution and habitual smoking on the retention of inorganic fibers identified as ferruginous bodies in autopsy cases in Mexico City. Inhal Toxicol 2009;21:882-888.
4. Amador-Muñoz O, Villalobos-Pietrini R, Miranda J, Vera-Avila LE. Organic compounds of PM_{2.5} in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources. Sci Total Environ 2011;409:1453-1465.
5. Secretaría Medio Ambiente. Informe de la calidad del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México. Estado y tendencias 1990-2007. Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. Dirección General de Gestión de la Calidad del Aire. Dirección de Monitoreo Atmosférico. Ciudad de México; 2008. Disponible en: http://www.sma.df.gob.mx/sma/links/download/archivos/informe_anual_calidad_aire_2007.pdf

6. Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Fordham LA, Chung CJ, Valencia-Salazar G, Flores-Gómez S, et al. Lung radiology and pulmonary function of children chronically exposed to air pollution. *Environ Health Perspect* 2006;114:1432-1437.
7. Cárdenas M, Vallejo M, Romano-Riquer P, Ruiz-Velasco S, Ferreira-Vidal AD, Hermosillo AG. Personal exposure to PM2.5 air pollution and heart rate variability in subjects with positive or negative head-up tilt test. *Environ Res* 2008;108:1-6.
8. Vallejo M, Ruiz S, Hermosillo AG, Borja-Aburto VH, Cárdenas M. Ambient fine particles modify heart rate variability in young healthy adults. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006;16:125-130.
9. Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res* 2007;631:9-15.
10. Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, Rosas I, et al. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect* 2002;110:715-720.
11. García-Cuellar C, Alfaro-Moreno E, Martínez-Romero F, Ponce de León-Rosales S, Rosas I, Pérez-Cárdenas E, et al. DNA damage induced by PM10 from different zones of Mexico City. *Ann Occup Hyg* 2002;46(suppl 1):425-428.
12. Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Ponce de León-Rosales S, et al. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter *in vitro* are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 2003;111:1289-1293.
13. Plant AL, Knapp RD, Smith LC. Mechanism and rate of permeation of cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* 1987;262:2514-2519.
14. Nemoto N, Takayama S. Modulation of microsome-mediated benzo(a)pyrene-metabolism by serum. *Carcinogenesis* 1982;3:359-362.
15. Penn A, Murphy G, Barker S, Henk W, Penn L. Combustion-derived ultrafine particles transport organic toxicants to target respiratory cells. *Environ Health Perspect* 2005;113:956-963.
16. Castelli F, Librando V, Sarpietro MG. Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. *Environ Sci Technol* 2002;36:2712-2723.
17. Librando V, Sarpietro MG, Castelli F. Role of lipophilic medium in the absorption of polycyclic aromatic compounds by biomembranes. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;14:25-32.
18. Mazzarella G, Ferraraccio F, Prati MV, Annunziata S, Bianco A, Mezzogiorno A, et al. Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an *in vitro* study. *Respir Med* 2007;101:1155-1162.
19. Gasiewicz TA, Henry EC, Collins LL. Expression and activity of aryl hydrocarbon receptor in development and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008;18:279-321.
20. Watterson TL, Sorensen J, Martin R, Coulombe RA Jr. Effects of PM2.5 collected from Cache Valley Utah on genes associated with the inflammatory response in human lung cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1731-1744.
21. Chirino YI, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas AR, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruiz MC, Segura-García Y, et al. PM(10) impairs the antioxidant defense systems and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol Lett* 2010;193:209-216.
22. Rumelhard M, Ramgolam K, Auger F, Dazy AC, Blanchet S, Marano F, et al. Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells. *Toxicol Lett* 2007;168:155-164.
23. Baulig A, Blanchet S, Rumelhard M, Lacroix G, Marano F, Baeza-Squiban A. Fine urban atmospheric particulate matter modulates inflammatory gene and protein expression in human bronchial epithelial cells. *Front Biosci* 2007;12:771-782.
24. Calderón-Segura ME, Gomez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Butterworth FM, Amador-Muñoz O. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat Res* 2004;558:7-17.
25. Villalobos-Pietrini R, Hernández-Mena L, Amador-Muñoz O, Munive-Colín Z, Bravo-Cabrera JL, Gómez-Arroyo S, et al. Biodirected mutagenic chemical assay of PM(10) extractable organic matter in Southwest Mexico City. *Mutat Res* 2007;634:192-204.
26. Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:199-211.
27. Rodríguez-Romero MI, Gomez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Cortés-Eslava J, Calderón-Ezquerro MC, et al. Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol Mech Methods* 2012;22:170-183.