

**EVALUACIÓN GENOTOXICA DEL AIRE DE PAMPLONA-COLOMBIA POR
EL ENSAYO COMETA****GENOTOXIC AIR EVALUATION OF PAMPLONA-COLOMBIA BY THE
COMET TEST**

Esp. Quijano Vargas Monica Juliana*, **Phd. Quijano Parra Alfonso****,
Mg. Melendez Gelvez Ivan***

*Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología-
Química Grupo de Investigación en Química de la atmosfera. mojuquiva@gmail.com.

** Universidad de Pamplona. Profesor titular. Departamento de Química y Biología.
Facultad de Ciencias Básicas. Grupo de Investigación en Química;
alfonsoquijanoparra@gmail.com. Grupo de Investigación en Química. Laboratorio de
Control de Calidad.

***Universidad de Pamplona. Profesor asociado. Departamento de Química-Biología.
Facultad de Ciencias Básicas. imgelvez@unipamplona.edu.co. Grupo de Investigación en
Biología Molecular

Resumen: Objetivo. Determinar los Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP) extraídos con el sistema Diclorometano-etanol tolueno en muestras del aire de Pamplona (PM 2.5) y evaluar la genotoxicidad por el ensayo cometa.

Materiales y métodos. El PM 2.5 fue monitoreado con un equipo Partisol 2025 Plus usando filtros de cuarzo Pallflex, en el periodo de Enero-Julio de 2013. La materia orgánica proveniente de los filtros de PM2.5 fue extraída por ultrasonido utilizando como solvente el sistema diclorometano-etanol-tolueno. Los Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP) se determinaron por Cromatografía de Gases/FID. La actividad genotóxica de los extractos del PM2.5 fue determinada usando el ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica.

Resultados. Por primera vez en el aire de Pamplona, se relaciona la actividad genotóxica en el PM2.5 de Pamplona, Norte de Santander con la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policiclicos (HAP) como el Benzo(a)pireno clasificado como cancerígeno para los seres humanos, el Benzo(b) fluoranteno, Criseno, Benzo(k)fluoranteno, mezcla de Indeno(1,2,3-cd)pireno y Dibenzo(a,h) antraceno, clasificados como probables carcinógenos para humanos.

Conclusión. Existe un riesgo para la población expuesta, debido a que el PM del municipio de Pamplona muestra genotoxicidad, la cual probablemente se debe a los HAP Benzo (a) pireno, Benzo (b) fluoranteno, Benzo (k) fluoranteno, Criseno, así como a los metales (Cr, Ni, Pb) encontrados en la materia orgánica del PM2.5 de esta localidad, esta genotoxicidad está relacionada con las emisiones de los motores Diesel que circulan por la ciudad.

Palabras clave: Metales, Hidrocarburos Aromáticos Policiclicos, Benzo(a) pyrene, PM2.5, ensayo cometa, actividad genotóxica, emisiones vehiculares.

Abstract: Objective. Determine Poly cyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) extracted with dichloromethane-ethanol toluene system Pamplona air samples (PM 2.5) and evaluate the genotoxicity by the comet assay.

Materials and methods. The PM_{2.5} was monitored with a team Partisol Plus 2025 using quartz filters Pallflex, in the period from January to July 2013. The organic matter in PM_{2.5} filters was extracted by ultrasound as solvent dichloromethane-ethanol system -toluene. Poly cyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were determined by GC / FID. The genotoxic activity of extracts of PM_{2.5} was determined using the comet assay in peripheral blood lymphocytes.

Results. For the first time in the air in Pamplona, I genotoxic activity related PM_{2.5} in Pamplona, Norte de Santander in the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) such as benzo (a) pyrene classified as carcinogenic to humans, Benzo (b) fluoranthene, chrysene Benzo (k) fluoranthene mixture indene (1,2,3-cd) pyrene and Dibenzo (a, h) anthracene, classified as probable carcinogenic for humans.

Conclusion. There is a risk to the exposed population, because the PM of the municipality of Pamplona shows genotoxicity, which probably should PAHs Benzo (a) pyrene, Benzo (b) fluoranthene, benzo (k) fluoranthene, chrysene and metals (Cr, Ni, Pb) found in organic matter PM_{2.5} in this town, this genotoxicity is related to emissions from diesel engines running on the city.

Keywords: Metals, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Benzo (a) pyrene, PM_{2.5}, comet assay, genotoxic activity, vehicular emissions.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud considera que la contaminación atmosférica es una de las situaciones de exposición del medio ambiente que puede afectar la salud humana, dando lugar a infecciones respiratorias agudas, cáncer, enfermedades crónicas respiratorias y cardiovasculares. La contaminación del aire por material particulado (PM) se considera un serio problema ambiental debido a la presencia en la atmósfera de materiales peligrosos tales como metales traza tóxicos (Shah et al, 2006). Se ha demostrado que los metales asociados con el PM aumentan las lesiones cardiopulmonares en los seres humanos (Shaheen et al, 2005). Estudios epidemiológicos relacionados con los efectos en la salud de la contaminación atmosférica sugieren que esta puede ser la responsable del aumento de la tasa de cáncer de pulmón (Cohen y Pope, 1995; Goldberg et al, 2001). Los estudios epidemiológicos han informado las asociaciones entre los problemas de salud, especialmente enfermedades respiratorias y la exposición a partículas finas y ultrafinas (PM₁₀ y PM_{2.5}). El tamaño y la composición de estas partículas determinan su comportamiento en el sistema respiratorio y el tiempo de residencia en el medio ambiente (Pope III et al, 2002). Las partículas de la fracción respirable (PM₁₀ y PM_{2.5}) tienen la capacidad de penetrar y depositarse en las regiones

traqueo-bronquial y alveolar del tracto respiratorio (Vinitketkumnun et al, 2002). La inhalación de concentraciones altas de las partículas en suspensión con un diámetro menor de 2.5 µm (PM_{2.5}) están asociadas con efectos adversos para la salud, incluyendo el aumento de problemas respiratorios, cáncer y mortalidad (Zmirou et al, 2000). En cuanto a los efectos sobre la salud humana, el material particulado (PM) fracción respirable es el de mayor preocupación, ya que a largo plazo la exposición al PM se ha asociado con una mayor incidencia de enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer (Pope III et al, 2002; Brunekreef y Holgate, 2002). Varios contaminantes del aire en estado gaseoso, como los compuestos orgánicos y metales se adsorben sobre la superficie de estas partículas. En las áreas urbanas los metales pesados provienen de las emisiones vehiculares y actividades industriales (Zheng Na, 2010). Los metales han sido asociados con un incremento de riesgo de cáncer pancreático exocrino (Amaral, 2012). Los metales pesados manifiestan los efectos citotóxicos en las células de varios tejidos y la regulación estricta de los metales es esencial para la salud de los organismos (Matés et al, 2010). Varios estudios evaluaron la actividad mutagénica de material particulado atmosférico, concluyendo que los compuestos mutagénicos se encuentran casi exclusivamente en las partículas de menos de 2,0 a 3,3 µm de diámetro (Pagano et al, 1996; Claxton et al, 2001). Las partículas PM₁₀ y

PM2.5 muestran mutagenicidad directa e indirecta y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son considerados como las principales causas de acción indirecta de mutagenicidad, mientras que los hidrocarburos aromáticos nitropolicíclicos (NPAHs) como el 1,3-,1,6-,1,8-dinitropirenos (DNP) son considerados como las causas principales de la acción directa de la mutagenicidad (Wada et al, 2001). Uno de los NPAHs más importantes es la 3-nitrobenzanthrona (3-nitro-7H-benzo [de] anthracen-7-ona; 3-NBA) es un mutágeno extremadamente potente y un carcinógeno en humanos, detectado en los gases de escape de motores diésel y en partículas en el aire (Da Costa et al, 2009). La mutagenicidad de las partículas emitidas por los tubos de escape de motores diésel (DEP) ha sido ampliamente estudiada (Singh et al, 2004; Riger et al, 2011) y se ha demostrado su actividad mutagenica directa (Taga et al, 2005). Partículas del escape de motores diesel (DEP) causan una grave contaminación del aire urbano (Wada et al, 2001) y pertenecen a la clase de partículas del tamaño de las vías respiratorias. En ratones de laboratorio se sugiere que la exposición prenatal a emisiones de escape de motores diesel genera una reducción en la movilidad y una disminución significativa de los niveles de dopamina y además aumento en niveles de episodios de asma debido al estrés oxidativo generado en las células por el material particulado del aire, especialmente el encontrado en las partículas emitidas por motores Diésel (Li N et al, 2003). Los estudios de mutágenos en el aire proporcionan algunas evidencias sobre el origen de estos. Debido a que un número de los estudios se produjo en sitios urbanos, varios investigadores indican que las fuentes móviles (automóviles, camiones, etc) contribuyen significativamente al nivel de mutágenos en el aire (Riger et al, 2011; Fukino et al, 1982). En un estudio (Riger et al, 2011) hallaron que las concentraciones en el aire de metales como Pb, Zn, V y Cd se relacionan con la mutagenicidad de acción directa de la materia orgánica en el material particulado. Aparte de su carcinogenicidad, los HAP pueden ejercer sus efectos negativos sobre el organismo humano por la inducción de estrés oxidativo. Estos compuestos tienen la capacidad para entrar en ciclos redox, aumentar la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y por lo tanto, causar estrés oxidativo. El efecto del PM en los organismos depende de su composición química, un mayor contenido de HAP aumenta la genotoxicidad del PM, resultando en la formación preferencial de aductos HAP-ADN (Sevastyanova et al, 2008). La presencia de otros compuestos, incluyendo las o-

quinonas o metales de transición puede conducir a la formación de ROS y la posterior inducción de estrés oxidativo. El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre prooxidantes, incluyendo ROS y antioxidantes en el organismo que pueden afectar al ADN, los lípidos así como proteínas (Klaunig y Kamendulis, 2004) y se considera que está involucrado en procesos carcinogénicos (Milaeva, 2011).

En el aire de la región Nororiental de Colombia (Pamplona), no existe información en general sobre los niveles de genotoxicidad de la materia orgánica del material particulado fracción respirable PM2.5 extraído mediante el sistema Diclorometano-etanol-tolueno y su relación con los Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP). En el presente estudio las partículas en suspensión (PM2.5) y los compuestos volátiles se recogieron en un equipo Partisol 2025 Plus durante el periodo comprendido entre Enero- Julio 2016 cerca de una vía muy transitada en Pamplona-Norte de Santander por vehículos que funcionan con diesel y gasolina. Estas muestras se analizaron para la detección de Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP) en un cromatógrafo de gases HP 6890 Plus con detector FID y se realizaron bioensayos para determinar su actividad genotóxica; la actividad genotóxica asociada con el aire ambiente de Pamplona-Colombia, se evaluó utilizando el ensayo cometa.

2. METODOLOGÍA

EL monitoreo del PM2.5 se realizó con un equipo Partisol- Plus Model 2025-Air sampler. U.S.EPA. Reference designated PM2.5 Method RFPs 0498-118 in accordance with 40CFR Part 53 de la Ruprecht-Patashnick. Se realizó el monitoreo de la fracción respirable PM2.5 en Pamplona-Norte de Santander ubicada en la cordillera Oriental de Colombia, al sureste del Departamento Norte de Santander con coordenadas geográficas 72o 25 de longitud Oeste y 7o 20 de latitud Norte, a una altitud de 2300 msnm y una presión atmosférica de 583 mm de Hg; se instaló en la azotea de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona el equipo Partisol 2025 Plus. Las muestras ambientales obtenidas con el muestreador Partisol 2025 Plus en muestreos de 24 horas, con una frecuencia de tres días se realizaron durante el período comprendido entre Enero-Julio del 2016. Se escogió la Universidad de Pamplona en Pamplona-Colombia como sitio del muestreo de la fracción respirable PM2.5 por sus características particulares, ya que está ubicada en un sector

residencial y en una vía que presenta un alto flujo vehicular, particularmente de tráfico pesado que utiliza como combustible el Diesel ya que éste sector es paso obligado del transporte vehicular que une a Colombia con Venezuela. Otra particularidad que tiene Pamplona es que no tiene industrias contaminantes y la única fuente de contaminación atmosférica son los vehículos que circulan por esta ciudad. Por consiguiente el análisis fisicoquímico de los filtros nos dará una idea de la magnitud de la contaminación atmosférica producida únicamente por la combustión vehicular.

2.1 Extracción de la Materia Orgánica de los filtros de PM2.5

La materia orgánica de los filtros de PM 2.5 (HAP) se extrae por ultrasonido (Banjoo y Nelson,2005), en un baño ultrasónico (Branson 1510, modelo 1510R-MT); por primera vez se utiliza como solvente de extracción la mezcla diclorometano-etanol-tolueno (300 mL). Los filtros de PM2.5 se colocan en un vaso de precipitado con 20 mL del solvente por un periodo de 15 minutos a una temperatura de 23°C-24°C, se recoge este volumen y se agregan otros 20 mL, esta extracción se repite hasta completar los 300 mL. Un procedimiento común para el análisis de los HAP consiste en la extracción seguido por el análisis instrumental, como la cromatografía de gases o la cromatografía líquida (Ping y Panuwat,2006). Una vez obtenido el extracto orgánico global (300 mL) se lo concentra en un evaporador rotatorio de vacío, marca Heidolph modelo Laborota 400-1 a una temperatura de 30°C a 150 rpm; hasta aproximadamente 15 mL. Posteriormente el extracto se transfirió a tres viales cada uno de 5mL. El primero corresponde al extracto global, se utiliza para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP) por Cromatografía de Gases, el segundo para el fraccionamiento de la materia orgánica mediante columna de separación de Silicagel y el tercero para los ensayos genotóxicos. Las muestras de HAP se secaron con Na₂SO₄, con el fin de eliminar el agua residual y preparar la muestra para el análisis cromatográfico. Se guardaron en frasco ámbar, manteniéndolas refrigeradas a 4 °C.

2.2 Fraccionamiento del extracto global de la materia orgánica del PM 2.5

Se utiliza para el fraccionamiento del extracto global una columna de Silicagel (Yang Yang et al,2010). La Silica tuvo un tratamiento térmico de ocho días a 1700 C y durante dos días de 1100C. Se colocan en una columna 10 g de Silica, se agregan los 5 mL del extracto global al que se han

adicionado 10 mL de Hexano. Posteriormente a esta columna se agregan 200 mL de hexano obteniéndose la fracción 1; obtenida esta fracción se agregan 200 mL de una mezcla Diclorometano-Hexano obteniéndose la fracción 2, posteriormente a la columna se agregan 200 mL de Diclorometano obteniéndose la fracción 3.

2.3 Identificación de Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP)

Para identificar los Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAP) presentes en el PM2.5 del aire de Pamplona, extracto global y las tres fracciones, se utilizó un equipo de Cromatografía de Gases marca Agilent Technologies 6890N Network Plus Series II Hewlet-Packard Plus acoplado a un detector de ionización de llama-FID (Flame Ionization Detector) equipado con un puerto de inyección split/Splitless. Se utilizó la columna capilar de Restek Rxi-17 Sil MS, 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro, 0.25 µm de diámetro interno (silarylene similar a 50% phenyl/50% dimethyl polysiloxane). Para la identificación de los HAP se utilizó el patrón de 18 hidrocarburos de Restek (catalogo # 31841 EPA Method 8310 PAH Mixture). La identificación cualitativa de los HAP presentes en el extracto global se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: Temperatura del inyector 250 °C, detector FID a 320°C, Mezcla (mL/min): Aire 400 – H₂ 30 – N₂ 45. Se inyectó 1 µL, modo splitless a 320°C. Condiciones del horno: Temperatura inicial 65°C por 0.5 min y se incrementa de la siguiente manera: 15°C/min hasta 200°C, 4°C/min hasta 330°C durante 15min. Tiempo de análisis por muestra 53.33 min. Gas de arrastre Helio, flujo 20 mL/min.

2.4 DETECCIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

2.4.1 Ensayo cometa. El ensayo cometa es una técnica altamente sensible para evaluar el daño y la reparación del ADN en cualquier tipo de célula eucariota. Este, en su versión alcalina, permite detectar roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación dando lugar a la formación de la cola del cometa (Ayala,2004). En general el principio básico del ensayo, es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula al microscopio, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

2.4.2 Extracción de linfocitos

Se toman 5 mL de sangre total fresca de una persona sana y se mezcla suavemente con 5 mL de PBS. En otro tubo diferente se adicionan 3 mL de Histopaque y 9 mL de sangre, se centrifuga durante 30 min a 2.300 rpm y se recoge la capa intermedia que es donde están los linfocitos

2.4.3 Tratamiento

A 200 μ L de células, se adiciona 50 μ L del tratamiento o control (dosis: D1=12.5 μ g; D2= 25 μ g; D3= 50 μ g). Para el control positivo se utilizó H₂O₂ 25mM y para el control negativo PBS. Posteriormente se incuban estas dosis y controles durante 1 hora a 37°C. Se toma 75 μ L agarosa de punto de fusión normal (LMA) y se mezcla con 10 μ L de células tratadas. Seguidamente la mezcla anterior se adiciona a la lámina base e inmediatamente se coloca el cubre objeto y se lleva a incubación durante 6 minutos a 4°C. Después de cumplidos los 6 minutos a 4°C, se retira el cubre objeto y se adicionan otros 75 μ L de agarosa, se incuba durante 6 minutos a 4°C. Terminado este tiempo se quita el cubre objeto y se incuba durante 1 hora a 4°C en solución de trabajo de lisis. A continuación se lavan las placas con PBS y se colocan en una cámara de electroforesis durante 30 minutos sin conectar a la fuente. Posteriormente se conecta la cámara durante 30 minutos a 300 Amperios. Culminado el tiempo se procede a retirar de la cámara las placas; las cuales se lavan con solución neutralizante. Se dejan secar e inmediatamente se adiciona 30 μ L de bromuro de etidio y se cubre con un cubre objetos para la lectura de las células. Luego se observa en el microscopio de fluorescencia Olympus U-RFKT50 con el objetivo de 25X y se mide la migración del ADN de las células.

2.4.4. Análisis estadístico. Se determinó homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene. Si el comportamiento de los datos es paramétrico, se aplica Análisis de varianza (ANOVA). Si los datos son no paramétricos se utilizan las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon. Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y control, así como la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en el PM 2.5 de muestras del aire de Pamplona.

En la tabla 1 se muestran los tiempos de retención de los HAP presentes en la muestra patrón y determinados en la columna RXI 17 Sil MS de Restek

En la figura 1 se muestra el cromatograma de los HAP encontrados en la muestra global de la materia orgánica del PM 2.5 del aire de Pamplona extraídos mediante el sistema diclorometano-etanol-tolueno. Como se observa en este cromatograma los HAP presentes en el extracto global de la materia orgánica de las muestras de PM 2.5 del aire de Pamplona son: 1.-Naftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 5.-Acenafteno; 7.-Fenantreno; 8.-Antraceno 16.-Indeno (1, 2,3 c-d) pireno /17.-Dibenzo (a,h) antraceno

En la figura 2 se muestra el cromatograma de los HAP encontrados en la fracción 1 de la muestra global de la materia orgánica del aire de Pamplona. Como se observa en este cromatograma los HAP presentes en las muestras de la fracción 1 del extracto global de las muestras de PM 2.5 del aire de Pamplona son: 1.-Naftaleno; 2.-1-Metilnaftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 10.-Pireno

En la figura 3 se muestran los HAP encontrados en la fracción 2 de la muestra global de la materia orgánica del aire de Pamplona. Como se observa en este cromatograma los HAP presentes en la fracción 2 de las muestras de PM 2.5 del aire de Pamplona son:1.-Naftaleno; 2.-1 Metilnaftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 4.-Acenaftileno; 5.-Acenafteno; 9.-Fluoranteno; 15.-Benzo(a)pireno

En la figura 4 se muestran los HAP encontrados en la fracción 3 de la muestra global de la materia orgánica del aire de Pamplona. Como se observa en este cromatograma los HAP presentes en la fracción 3 de las muestras de PM 2.5 del aire de Pamplona son: 2.-1 Metilnaftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 4.-Acenaftileno, 5.-Acenafteno; 6.-Fluoreno 8.-Antraceno; 12.-Criseno; 13.-Benzo (b) fluoranteno; 14.- Benzo(k)fluoranteno 15.-Benzo(a)pireno

En la tabla N 2 se muestran los HAP encontrados en el aire de Pamplona, extraídos con el sistema: Diclorometano-Etanol-Tolueno, tanto en el extracto global como en cada una de las cuatro fracciones

Las partículas finas PM_{2.5} pueden penetrar las regiones más profundas de los pulmones como los

bronquiolos, los alvéolos y causan muchos efectos adversos para la salud, incluyendo enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón (Slezakova et al, 2011). Estos hallazgos son especialmente relevantes para la salud debido a que de acuerdo con investigaciones relacionadas con el material particulado, los HAP están predominantemente presentes en la fracción del PM2.5 (Castro et al, 2009; Slezakova et al, 2010). El estudio del fraccionamiento de la materia orgánica del PM2.5 es muy importante, ya que nos permite hallar algunos HAP que no se detectaron en el extracto global; en nuestra investigación en el aire de Pamplona-Colombia detectamos en las fracciones del PM2.5 al acenafileno, fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, la mezcla de benzo (b,k) fluorantenos considerados como posibles carcinógenos en humanos y el benzo(a)pireno; el fraccionamiento de la materia orgánica permitió detectar en el aire de Pamplona al benzo (a) pireno considerado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como carcinógeno en humanos (IARC, 1987; US EPA, 2012). Por lo tanto la presencia de Benzo (a) Pireno en el aire, puede aumentar los riesgos carcinogénicos para el ser humano tras la exposición al aire contaminado. Se ha demostrado que ciertos HAP como el naftaleno, fenantreno, pireno y fluoranteno, persisten en el medio rural y urbano y se han relacionado con enfermedades respiratorias crónicas como el asma, la bronquitis severa y cáncer de pulmón (Taguchi et al, 2007; Valavanidis; Fiotakis y Vlachogianni, 2008; Aubier, 2009). Estos HAP sufren transformaciones metabólicas a través de las enzimas del citocromo P450 (CYP450), epóxido hidrolasas, aldoketo reductasas, resultando en la formación de metabolitos más tóxicos a saber 1,4-benzoquinona, naftoquinona, fenantroquinona, antraquinona (Spencer et al, 2009; Shultz et al, 2011; Zhang et al, 2012). Estos compuestos tienen el potencial de interactuar con macromoléculas, tales como enzimas celulares responsables de la transcripción, la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y metabolismo celular llevando eventualmente a mutaciones y cáncer (Courter et al, 2008; Misaki et al, 2008). Los habitantes de nuestras ciudades están expuestos rutinariamente a los HAP y a las emisiones de las fuentes móviles que circulan con Diesel (Ryno et al, 2006; Huang et al, 2007). La exposición a los HAP se ha demostrado que causa efectos cancerígenos y genotóxicos (Karaman y Pirim, 2009). Los HAP son conocidos agentes genotóxicos e inducen efectos dañinos del ADN,

tales como aductos de ADN, roturas de cadena de ADN, aberraciones cromosómicas y la formación de micronúcleos (Zidzik et al, 2007; Franco, Nardocci y Gunther, 2008). Es de señalar que los HPA provienen exclusivamente de la combustión de las fuentes móviles que circulan con diesel y gasolina (Guo et al, 2003). El Fenantreno uno de los HAP encontrados en el aire de Pamplona es característico de las emisiones del tráfico (Ravindra et al, 2006). En el aire de Pamplona-Colombia, además de los HAP, se han encontrado los siguientes metales Fe, Pb, Zn, K, Ni, Mn y Cr (Quijano Parra, Quijano Vargas y Henao Martínez, 2010). El Pb ha sido asociado con varios efectos, incluyendo carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad. (Mari, Nadal y Domingo, 2009). Parte de la actividad mutagénica encontrada en el PM2.5 del aire de Pamplona, la podemos atribuir al Cr y el Ni, los cuales son conocidos metales cancerígenos (Kuo et al, 1998; Cancio et al, 2008; Nguyen Thi y Byeong-Kyu, 2010). Los metales pesados causan estrés oxidativo y pueden asociarse con formación de tumores en células mamarias (Mumford y Lewtas, 1984).

4. DETERMINACIÓN DEL DAÑO DEL ADN POR EL ENSAYO COMETA

Las concentraciones de las dosis que se trabajaron en el ensayo cometa fueron: (D1=12.5 µg, D2=25 µg, D3=50 µg). Se realizaron tres ensayos, cada uno por duplicado, (F1D1, F1D2, F1D3, C+ y C-), (F2D1, F2D2, F2D3, C+ y C-), (F3D1, F3D2, F3D3, C+ y C-). En estos ensayos cometas se observaron 200 células individuales (linfocitos) por cada dosis, con la finalidad de evaluar la fragmentación del ADN ocasionada por la exposición a contaminantes genotóxicos. Para llegar a ello, básicamente se tuvieron en cuenta los siguientes pasos: se obtuvieron las células (sangre total), posteriormente se fijaron con agarosa en un portaobjetos, las cuales fueron sometidas a una solución de lisis con la finalidad de romper su membrana celular y además, se utilizó una solución amortiguadora para desenrollar el ADN, por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN, el paso a seguir, fue someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, en el cual los fragmentos negativamente cargados de ADN (ADN dañado) migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo, apreciándose el daño, el cual es representado por un aumento de fragmentos del ADN que migran

fuera de las células del núcleo bajo una forma característica similar a la cola de un cometa; estos fragmentos son generados por rompimientos del ADN; esto se puede observar por medio de un microscópico de fluorescencia; finalmente se utiliza un software para tabular estos datos y determinar el daño al material genético. En la figura 5 se observa la fotografía de algunos linfocitos, tomadas a través del microscopio de fluorescencia, durante los diferentes ensayos cometas. En la tabla 3 se muestran los promedios de las colas de los cometas en función de cada una de las dosis estudiadas de PM2.5

Se analizaron un total de 200 células en cada uno de los ensayos. Como control positivo se usó el peróxido de hidrogeno y como control negativo se utilizó dimetil sulfoxido que fue el solvente usado para disolver las muestras.

En el ensayo cometa se considera que existe un daño en el ADN si el valor del daño supera dos veces el cociente del promedio de la cola de los linfocitos entre el control negativo. En la tabla 4 se muestra el resumen de los daños producidos en el ADN respecto de cada una de las dosis de PM2.5 del aire de Pamplona.

Como se observa en la tabla N 4, las muestras de PM2.5 analizadas muestran un alto potencial genotóxico, cuando se evaluó en el ensayo Cometa, lo que indica que la presencia de HAP y metales en el material particulado PM2.5 del aire de Pamplona puede ocasionar efectos genotoxicos..

5. CONCLUSIONES

Nuestro estudio confirma la presencia en el aire de Pamplona-Colombia de siete Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos (HAP) priorizados en partículas PM2.5: el naftaleno, criseno, la mezcla de benzo(b,k)fluorantenos, la mezcla de Indeno(1,2,3-cd)pireno y Dibenzo(a,h) antraceno y el benzo (a) pireno clasificado como cancerígeno para los seres humanos. Es evidente que los HAP encontrados en el aire de Pamplona, son aportados por las emisiones de vehículos que funcionan con diesel y gasolina. Por lo tanto, la emisión y la potencia tóxica de estos HAP aumentan las preocupaciones sobre el riesgo para la salud humana y para la población en general.

El aire de Pamplona-Colombia muestra niveles de genotoxicidad que indica el riesgo existente en la población expuesta, teniendo en cuenta que existe una correlación entre el incremento del daño en el ADN y cáncer en humanos.

AGRADECIMIENTOS

A la Rectoría de la Universidad de Pamplona por su apoyo financiero a este proyecto

REFERENCIAS

- Amaral, A.F; Porta, M; Silverman, D.T; Milne, R.L; Kogevinas, M; Rothman, N et al. (2012). *Pancreatic cancer risk and levels of trace elements. Gut, 61(11),1583-1588*
- Ayala MC. (2004). *Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. Acta Farm. Bonaerense, 23(3), 277-84*
- Aubier M.(2009). *Traffic-related pollutants and their impact on allergic respiratory diseases. Bull. Acad. Natl. Med, 193 (6), 1303–1313 (discussion 1313-1315).*
- Banjoo, D y Nelson, P.(2005). *Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. J Chromatogr A, 1066,(1-2),9-18.*
- Brunekreef, B; Holgate, S.T.(2002). *Air pollution and health. Lancet, 360,1233–1242*
- Cancio, J.L; Castellano, A.V; Hernández, M.C; Bethencourt, R.G; Ortega, E.M.(2008). *Metallic species in atmospheric particulate matter in Las Palmas de Gran Canaria. Journal of Hazardous Materials,160,521–528*
- Castro, D; Slezakova, K; Oliva-Teles, M.T; Delerue-Matos, C; Alvim-Ferraz, M.C; Morais, S. et al.(2009). *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate samples by microwave-assisted extraction and liquid chromatography. J. Sep. Sci, 32(4), 501–510*
- Courter, L.A; Luch, A; Musafia-Jeknic, T; Arlt, V.M; Fischer, K; Bildfell, R. et al.(2008). *The influence of diesel exhaust on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage, gene expression, and tumor initiation in Sencar mice in vivo. Cancer Lett,265,135–147.*

- Cohen, A.J; Pope, C.A.(1995). *Lung cancer and air pollution. Environ. Health Perspec*,103 (Suppl), 219–224.
- Claxton, L.D; Warren, S; Zweidinger, R; Creason, J.(2001). *A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microsuspension Salmonella mutagenicity assays. Sci. Total Environ* , 275,95–108.
- Da Costa, G.G; Singh,R; Arlt, V.M; Mirza, A; Richards, M; Takamura-Enya, T. et al. (2009). *Quantification of 3-nitrobenzanthrone-DNA adducts using online column-switching HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. Chemical Research in Toxicology*, 22(1),1860-1868.
- Fukino, H; Mimura, S; Inoue, K; Yamane, Y.(1982). *Mutagenicity of airborne particles. Mutat. Res*,102, 237–247
- Franco, S.S; Nardocci, A.C; Gunther, W.M.(2008). *PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state of the art. Cad. Saude. Publica* , 24 (Suppl.4), s569–580.
- Goldberg, M.S; Burnett, R.T; Bailar, J.C; Brook, J; Bonvalot, Y; Tamblyn, R. et al. (2001). *The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec. Environ. Re*,86(1),26–36
- Guo, H; Lee, S.C; Ho, K.F; Wang, X.M; Zou, S.C.(2003). *Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong, Atmos. Environ*,37, 5307–5317.
- Huang,W; Smith, T.J; Ngo, L; Wang, T; Chen, H; Wu, F. et al.(2007). *Characterizing and biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in exposures to diesel exhaust. Environ. Sci. Technol* ,41,2711–2716.
- IARC (1987). *(International Agency for Research on Cancer), Overall evaluations of carcinogenicity; an updating of IARC monographs Volumes 1–42. IARC, Lyon.*
- Karaman, A; Pirim, I.(2009). *Exposure to bitumen fumes and genotoxic effects on Turkish asphalt workers. J. Clin. Toxicol*, 47,321–326.
- Kuo, C.Y; Cheng, Y.W; Chen, C.Y; Lee, H.(1998). *Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan, Environ. Res*,78, 43–49.
- Klaunig, J.E; Kamendulis, L.M.(2004). *The role of oxidative stress in carcinogenesis. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*,44,239–267.
- Li, N; Hao, M; Phalen, R.F; Hinds, W.C; Nel, A.E.(2003). *Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. Clinical Immunology*,109(3),250-65.
- Mari, M; Nadal, M; Domingo, J.L.(2009). *Exposure to heavy metals and PCDD/Fs by the population living in the vicinity of a hazardous waste landfill in Catalonia, Spain. Health risk assessment. Environ Int* ,35,1034-1039.
- Matés, J.M; Segura, J.A; Alonso, F.J; Marquéz, J.(2010). *Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. Free Radical Biology and Medicine*,49(9),1328-1341.
- Milaeva, E.R.(2011). *Metal-based antioxidants--potential therapeutic candidates for prevention the oxidative stress-related carcinogenesis: mini-review. Curr Top Med Chem*,11(21),2703-13.
- Misaki, K; Suzuki, M; Nakamura, M; Handa, H; Iida, M; Kato, T; et al.(2008). *Aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor ligand activity of organic extracts from road dust and diesel exhaust particulates. Arch. Environ. Contam. Toxicol* , 55,199–209.
- Mumford, J.L y Lewtas, J.(1984). *Evaluation of fly ash collection methods for short-term bioassay studies of fluidized-bed coal combustion, Environ. Sci. Technol*,18, 765–768,
- Nguyen, Thi. Hieu y Byeong-Kyu, Lee.(2010). *Characteristics of particulate matter and metals in the ambient air from aresidential area in the largest industrial city in Korea. Atmospheric Research*,98,526–537

- Pagano, P; de Zaiacomo, T; Scaecella, E; Bruni, E.S; Calamosca, M.(1996). Mutagenic activity of total and particle-sized fractions of urban particulate matter. *Environ. Sci. Tech*, 30(12), 3512–3516
- Pope III, C.A; Burnett, R.T; Thun, R.T; Calle, E.E; Krewski, D; Ito, K. et al.(2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med.*,287(9),1132–1141
- Ping, L y Panuwat, H.(2006). Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on lime spray dryer (LSD) ash using different extraction methods. *Chemosphere*,62,265-274.
- Quijano Parra, A; Quijano Vargas, M.J; Henao Martinez, J.A.(2010). Caracterización físicoquímica del material particulado fracción respirable del PM2.5 en Pamplona Norte de Santander. *Bistua: revista de la facultad de Ciencias Basicas*,8(1),1-20
- Ravindra, K; Bencs, L; Wauters, E; de Hoog, J; Deutsch, F; Roekens, E. et al. (2006). Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment*,40,771-785.
- Riger, C.J; Fernandes, P.N; Vilela, L.F; Mielniczki-Pereira,A.A;Bonatto, D; Henriques, J.A. et al.(2011). Evaluation of heavy metal toxicity in eukaryotes using a simple functional assay. *Metallomics* ,3(12),1355-1356
- Ryno, M; Rantanen, L; Papaioannou, E; Konstandopoulos, A.G; Koskentalo, T; Savela, K.(2006). Comparison of pressurized fluid extraction, Soxhlet extraction and sonication for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air and diesel exhaust particulate matter. *J. Environ. Monit*, 8,488–493.
- Sevastyanova,O; Novakova,Z; Hanzalova, K; Binkova, B; Sram, R.J; Topinka, J. (2008). Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat. Res*,649,179–186
- Singh, P; De Marini, D.M; Dick, C.A.J; Tabor, V.J.V; Ryan, W.P; Linak, T. et al. (2004). Sample characterization of automobile and forklift diesel exhaust particles and comparative pulmonary toxicity in mice. *Environ. Health Perspect*,112,820–825
- Slezakova, K; Castro, D; Delerue–Matos, C; Alvim–Ferraz, M.C; Morais, S; Pereira, M.C.(2011). Air pollution from traffic emissions in Oporto, Portugal: Health and environmental implications. *Microchem. J*,99,51–59
- Slezakova, K; Castro, D; Pereira, M.C; Morais, S; Delerue–Matos, C; Alvim–Ferraz, M.C.M.(2010). Influence of traffic emissions on the carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in outdoor breathable particles. *J. Air Waste Manag Assoc*,60, 393–401.
- Shah, M.H; Shaheen, N; Jaffar, M; Khalique, A; Tariq, S.R; Manzoor, S.(2006). Spatial variations in selected metal contents and particle size distribution in an urban and rural atmosphere of Islamabad, Pakistan. *Journal of Environmental Management*, 78, 128–137
- Shaheen, N; Shah, M.H; Khalique, A; Jaffar, M.(2005). Metal levels in airborne particulate matter in urban Islamabad, Pakistan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*,75(4),739–746
- Shultz, C.A; Quinn, A.M; Park, J.H; Harvey, R.G; Bolton, J.L; Maser, E. et al. (2011). Specificity of human aldo-keto reductases, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, and carbonyl reductases to redox-cycle polycyclic aromatic hydrocarbon diones and 4-hydroxyequilenin-o-quinone. *Chem. Research. Tox-icol*,24,2153–2166.
- Spencer, W.A; Lehmler, H.J; Robertson, L.W; Gupta, R.C.(2009). Oxidative DNA adducts after Cu(2+)-mediated activation of dihydroxy PCBs: role of reactive oxygen species. *Free Radical Bio. Med*,46,1346–1352.
- Taga, R; Tang, N; Hattori, T; Tamura, K; Sakai, S; Toriba, A; et al.(2005). Direct-acting mutagenicity of extracts of coal burning-derived particulates and contribution of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons.

- Mutat. Res*,581(1-2),91–95
- Taguchi, K; Fujii, S; Yamano, S; Cho, A.K; Kamisuki, S; Nakai, Y. et al.(2007). An approach to evaluate two-electron reduction of 9,10-phenanthraquinone and redox activity of the hydroquinone associated with oxidative stress. *Free Radical Biol. Med*,43,789–799.
- US EPA (2012). (United States Environmental Protection Agency), Integrated risk information system. Benzo[a]pyrene (BaP) (CASRN 50-32-8). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://www.epa.gov/iris/subst/0136.htm>,20 12 (accessed 11.12.2012).
- Valavanidis, A; Fiotakis, K; Vlachogianni, T.(2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev* 2008; 26(4),339–362.
- Vinitketkumnuen, U; Kalayanamitra, K; Chewonarin, T; Kamens, R.(2002). Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat. Res*, 519,121–131
- Wada, M; Kido, H; Kishikawa, N; Tou, T; Tanaka, M; Tsubokura, J. et al.(2001). Assessment of air pollution in Nagasaki city: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives, and some metals. *Environ. Pollut*, 115,139–147.
- Yang,X.Y; Igarashi, K; Tang, N; Lin, J.M; Wang, W; Kameda, T; Toriba, A; Hayakawa K.(2010). Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*,695(1-2),29-34.
- Zidzik, J; Kalina, I; Salagovic, J; Sram, R.J; Rossner, P; Popov, T. et al.(2007). Influence of PAHs in ambient air on chromosomal aberrations in exposed subjects: international study – EXPAH. *Mutat. Res*,620(1-2),41-8
- Zmirou, D; Masclat, P; Boudet, C; Dor, F; Dechenaux, J.(2000). Personal exposure to atmospheric polycyclic hydrocarbons in a general adult population and lung cancer risk assessment. *J. Occup. Environ. Cancer Risk Assess*,4,121–126
- Zhang, L; Jin,Y; Huang, M; Penning, T.M.(2012). The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones. *Front.Pharmacol*, 3, 193.
- Zheng, Na;Jingshuang, L; Qichao, W; Zhongzhu, L.(2010). Health risk assessment of heavy metal exposure to street dust in the zinc smelting district, Northeast of China. *Science of the Total Environment*, 408,726–733