



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD EN CÉLULAS  
HUMANAS HEPG2 EXPUESTAS A DIFERENTES TIPOS  
DE PARTÍCULAS FINAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIÓLOGIA**

**PRESENTA :  
KARIN AGUILAR PELÁEZ**



**Director de Tesis:  
Dra. Rosario Rodriguez Arnaiz**

**MEXICO. D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que me proporcionó. Asimismo, a mi tutora la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por el tiempo, atención recibida y comentarios sobre mi tesis. A la Dra. Pernille Danielsen y al Dr. Peter Møller del Instituto de Salud Pública de la Universidad de Copenhague en Dinamarca por haberme proporcionado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio durante mi estancia de intercambio académico.

Gracias a mis padres, a Sairi y a Rusty por el apoyo y paciencia que siempre me han proporcionado.

ÍNDICE	PÁGINA
Resumen	1
Abstract	2
1.0 Introducción	3
1.1 Partículas	3
1.1.1 Partículas de contaminación del aire	3
1.1.2 Partículas de Diesel	7
1.2 Enfermedades causadas por exposición a partículas	8
1.3 Estrés oxidante	9
1.4 Metales	11
1.5 Bioensayos	12
2.0 Justificación	15
3.0 Hipótesis	16
4.0 Objetivos	16
5.0 Materiales y Métodos	17
5.1 Células empleadas	17
5.2 Solución de partículas (compuestos genotóxicos)	17
5.3 Ensayo cometa	17
5.4 El paso enzimático	19
5.5 Solución de partículas	22
6.0 Resultados	23
7.0 Discusión	28
8.0 Conclusiones	33
9.0 Referencias	35
10.0 Anexo 1	41

## **Resumen**

Los procesos de combustión incompletos de las gasolinas dan como resultado de su presencia en el medio la emisión continua al ambiente de mezclas complejas de contaminantes orgánicos, metales y partículas finas. La fuente de estos procesos es muy variada, sin embargo, son los vehículos de combustión interna los responsables en gran medida de su presencia en el ambiente. La exposición continua a estos compuestos puede afectar de forma severa a la salud humana ya que pueden ocasionar daños a biomoléculas y causar enfermedades como el cáncer. Los mecanismos de acción de estas partículas incluyen la inflamación y el estrés oxidante. Estas partículas no son fagocitadas de manera eficiente por los macrófagos alveolares, por lo que pueden llegar a otros órganos del cuerpo como el hígado. El ensayo cometa es un método simple utilizado frecuentemente para medir las lesiones al DNA en las células de eucariontes. El daño al DNA se evalúa en términos de la rotura de la cadena (SB) que puede ser cuantificado utilizando diferentes tinciones de DNA.

En el presente trabajo se expusieron cultivos de células hepáticas provenientes del hígado de humano (HepG2) a distintos tipos de partículas: Fullereno de  $C_{60}$  ( $C_{60}$ ), Negro de Carbón (CB), Material de Referencia Estándar 2975 (SRM 2975) y Nanotubos de carbono monocapa o de capa simple (SWCNT) a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ . Los análisis estadísticos demostraron que no existe diferencia significativa en el daño provocado a la cadena de DNA por los diversos tipos de partículas.

## **Abstract**

Incomplete combustions processes result in emissions on complex mixtures of organic pollutants, metals and fine particles. The sources of these emissions can be very varied but it is the internal combustion engines that contribute in greater extent. Exposure to these compounds can affect human health due to the fact that they damage biomolecules and cause diseases like cancer. The action mechanisms of these particles include inflammation and oxidative stress. These particles are not efficiently phagocytised by the alveolar macrophages and can therefore reach other organs like the liver. The comet assay is a simple method frequently used for the detection of damaged DNA in eukaryotic cells. The DNA damage is assessed in terms of strand breaks (SB) which can be quantified under the microscope using different dyes. In the present research, human liver carcinoma cells were exposed to different types of particles: Fullerene C<sub>60</sub> (C<sub>60</sub>), Carbon Black (CB), Standard Reference Material 2975 (SRM 2975) and Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNT) at a concentration of 25µg/ml. Statistical analysis showed that there was no significant difference of damage caused to the DNA strands between the different types of particles.

## **1.0 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Partículas**

#### **1.1.1. Partículas de contaminación del aire**

Los seres humanos siempre han estado expuestos a nanopartículas (NP) que se encuentran en el ambiente (partículas con un diámetro menor a 100 nm), sin embargo, ha sido a partir de la revolución industrial que esta exposición se ha incrementado de manera dramática ya que existen muchos más orígenes antropocéntricos de estas partículas tales como motores de combustión interna, plantas de energía y muchas otras fuentes de termodegradación. En la tabla 1 se mencionan algunas de las fuentes naturales y antropocéntricas de nanopartículas, incluyendo partículas ultrafinas (Günter *et al.*, 2005).

**Tabla 1.** Algunas fuentes naturales y antropogénicas de las NPs (<100nm) y partículas ultrafinas (Günter *et al.*, 2005).

Natural	Antropogénica	
	No intencional	Intencional (NPs)
Conversión de gas a partícula	Motor de combustión interna	Tamaño y forma controlados, diseñados por funcionalidad
Fuegos forestales	Plantas de energía	
Volcanes (lava caliente)	Incineradores	Metales, semiconductores, óxidos de metal, carbón, polímeros
Virus	Motores de jet	
Magnetita biogénica: moluscos, artrópodos, aves, peces, cerebro humano, meteorito (?)	Emanaciones de metales (fundición, soldadura, etc. )	Nanoesferas, -alambres, -agujas, -tubos, -armazones, -anillos, -plaquetas
Ferritina (12.5 nm)	Emanaciones de polímeros	
Micropartículas (< 100 nm; células activadas)	Superficies calientes	No tratadas, con cubiertas (nanotecnología aplicada a muchos productos: cosméticos, médico, telas, electrónicos, ópticos, exhibición, etc. )
	Freír, asar	
Motores eléctricos		

La composición de las partículas que contaminan el ambiente está influenciada por las emisiones de diferentes fuentes tales como el tránsito de vehículos automotores, las actividades industriales, los sistemas de calefacción de los hogares y el transporte de las partículas en el medio. Además, las variaciones temporales en los

orígenes de las emisiones y las variaciones de temperatura junto con otras condiciones meteorológicas pueden influenciar la composición de las partículas en el ambiente. Como resultado de esto, existen variaciones estacionales en las características físicas y químicas de las partículas de contaminación (Hetland *et al.*, 2005).

Las partículas que contaminan el ambiente varían en tamaño y están clasificadas de acuerdo a éste. Existen las ultrafinas, las cuales tienen un diámetro aproximado menor a  $0.1 \mu\text{m}$ , las finas tienen un diámetro de entre  $0.1$  y  $2.5 \mu\text{m}$  y finalmente están las gruesas las cuales presentan un diámetro mayor a  $2.5 \mu\text{m}$ . Estos tres tipos de partículas poseen composiciones químicas diferentes ya que cada una proviene de una fuente distinta y por lo tanto, también muestran una vida atmosférica diferente. La mayoría de las partículas de contaminación entran en las categorías de partículas finas y gruesas (Sioutas *et al.*, 2005).

Las partículas gruesas son en su mayoría producidas por procesos mecánicos como la erosión, resuspensión por el viento, procesos de pulido, etc. Su vida media en el ambiente es corta, de algunas horas, esto se debe al hecho de que son relativamente grandes y tienen una velocidad de sedimentación alta (Sioutas *et al.*, 2005).

Las partículas finas tienen generalmente un origen antropocéntrico, estas partículas son generadas por mecanismos de conversión de gas a partículas, son agregaciones de partículas ultrafinas y vapores. Las partículas finas son muy pequeñas para poderse asentar, lo cual causa que su vida en la atmósfera sea de hasta días y también pueden ser transportadas una gran distancia (Sioutas *et al.*, 2005).

Las partículas ultrafinas son generadas mecánicamente. Los principales constituyentes de las partículas ultrafinas son sulfato, nitrato, amonio, carbono orgánico y carbono elemental así como una variedad de rastros de metales formados por procesos de combustión (Sioutas *et al.*, 2005).

La exposición a partículas de contaminación ha sido asociada a varios efectos nocivos en la salud, incluyendo morbilidad y mortalidad cardiopulmonar y mortalidad de cáncer de pulmón. Todavía no se comprenden del todo los mecanismos responsables de este efecto adverso ni se sabe cuáles de las propiedades de las partículas son responsables. El tamaño de éstas es un parámetro crítico ya que su pequeña dimensión significa que tienen una gran área de superficie por unidad de masa (Borm *et al.*, 2006) y que haya depositación diferencial de las partículas en distintas partes del cuerpo (Hetland *et al.*, 2005).

Un estudio epidemiológico llevado a cabo en el suroeste de la ciudad de México, indica que existe una asociación entre la mortalidad y el alto nivel de contaminación por partículas finas. De igual manera, reportaron una asociación entre el incremento en la concentración de partículas finas y la mortalidad de personas mayores de 65 años y mortalidad por causas respiratorias y cardiovasculares (Borja-Aburto, *et al.*, 1998).

Estudios de toxicología sugieren que para partículas tóxicas, entre mayor sea el área de superficie, existe más toxicidad (Borm *et al.*, 2006). Algunas investigaciones revelan que entre mayor sea el área de superficie de la partícula, la respuesta biológica se incrementa así como el potencial de inflamación (Kocbach *et al.*, 2006). Las partículas generadas por combustión incompleta de combustibles fósiles y biomasa, consisten de cientos de partículas de carbón primario, lo que lleva a una gran área de superficie por masa. Estas partículas están muy ligadas a efectos negativos en la salud como inflamación, potencial mutagénico y cáncer de pulmón (Kocbach *et al.*, 2006).

Las partículas finas son suficientemente pequeñas para introducirse en los pulmones a través de la respiración, la exposición a las partículas se extiende, es difícil de evitar y ocurre durante toda la vida. Las partículas ultrafinas tienen la mayor eficiencia de deposición en la región alveolar en los pulmones y pueden penetrar de

manera rápida el epitelio. Las partículas ultrafinas siempre están presentes en la atmósfera urbana, por lo que es muy posible que desempeñen un papel en la causa de lesiones de graves de pulmón (Avakian *et al.*, 2002).

Parece ser que después de su depositación en el pulmón, las partículas ultrafinas no son fagocitadas de manera eficiente por los macrófagos alveolares. La translocación de las partículas ultrafinas al hígado a lo largo de neuronas ha sido documentado, lo que sugiere que sistemas orgánicos, además de pulmones, pueden ser afectados por estas partículas ultrafinas (Avakian *et al.*, 2002).

Las partículas están definidas generalmente por su tamaño, es decir, su diámetro. En los últimos años, las partículas ultrafinas (con un diámetro menor a 100nm) han sido objeto de investigación debido a la importancia que representan para la salud humana por su gran depositación alveolar, su composición química y su habilidad para producir una respuesta inflamatoria.

Las emisiones vehiculares, en particular las relacionadas con los motores a diesel, son una fuente importante de partículas ultrafinas. La mayoría de los vehículos de carga utilizan diesel y existe un incremento en el uso de vehículos particulares alimentados por este combustible. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) también son compuestos químicos muy importantes ya que se ha demostrado que algunos de ellos pueden estar asociados con los procesos de iniciación de cáncer (Risom *et al.*, 2005). Se cree que uno de los efectos en la salud que tienen estas partículas, es que provocan estrés oxidante e inflamación (Ntziachristos *et al.*, 2007).

Varias investigaciones han demostrado la relación que existe entre los efectos negativos en la salud o la toxicología con ciertas características de las partículas como su tamaño, la concentración y la composición química. Por ejemplo, existe evidencia de

que las partículas ultrafinas pueden ser más tóxicas que las de mayor tamaño (Ntziachristos *et al.*, 2007).

### **1.1.2 Partículas de Diesel**

Las partículas de diesel contribuyen de manera muy importante a la contaminación del aire en áreas urbanizadas y existe una preocupación de que éstas puedan ser cancerígenas para los seres humanos expuestos a ellas ya que existen estudios en los cuales ratas expuestas a altas concentraciones de ellas durante 21 días desarrollaron tumores en el pulmón (Müller *et al.*, 2004). La mayoría de los experimentos con este tipo de partículas, se han centrado en sus efectos en los pulmones ya que la inhalación es la ruta primaria de exposición. Sin embargo, una alta proporción de partículas pasan por la cavidad oral, son tragadas y eliminadas vía el tracto intestinal (Dybdahl *et al.*, 2003).

Por otro lado, los alimentos también pueden estar contaminados con partículas de diesel durante su cultivo o transporte. Estudios epidemiológicos demuestran una relación entre la exposición ocupacional y cáncer de colon e hígado (Dybdahl *et al.*, 2003).

Los mecanismos por los cuales existe una respuesta carcinogénica a la exposición de partículas de diesel no se entienden por completo todavía. Las partículas de diesel contienen una mezcla de varios hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA), algunos con potencial mutagénico y cancerígeno. Los HPAs podrían ser uno de los factores responsables de la respuesta carcinogénica (Dybdahl *et al.*, 2003) o esta respuesta

puede consistir de la acción de varios factores incluyendo compuestos asociados a las partículas o las partículas por sí mismas (Müller *et al.*, 2004).

Los HPA y los HPA nitrogenados adsorbidos en la superficie de las partículas pueden inducir la formación de aductos voluminosos de DNA y roturas en la doble hélice. Las partículas de negro de carbón, que son similares a las de los gases de diesel pero no contienen HPAs, son igual de carcinogénicas que las partículas de diesel (Müller *et al.*, 2004).

## **1.2 Enfermedades causadas por exposición a partículas**

Se ha demostrado que la exposición a partículas de contaminación en el aire genera daño oxidante al DNA en modelos experimentales y en humanos (Danielsen *et al.*, 2008 *a*), y está asociado a enfermedades cardiovasculares y pulmonares así como a cáncer (Risom *et al.*, 2005).

Los componentes de las partículas generan radicales libres en los pulmones, causando estrés oxidante, que lleva a inflamación. La inflamación juega un papel importante en las enfermedades de las vías respiratorias y en las enfermedades coronarias, que son las que se presentan más frecuentemente en las principales poblaciones susceptibles a los efectos de las partículas de contaminación. El asma y las enfermedades coronarias manifiestan inflamación como una característica central para su desarrollo, por lo que el estrés oxidante se agrava por la inflamación a través de la actividad oxidante de leucocitos inflamatorios. El cáncer de pulmón también está relacionado con el aumento en los niveles de partículas de contaminación en estudios crónicos y puede ser que el estrés oxidante sea un factor importante en su causa (Ayres *et al.*, 2008).

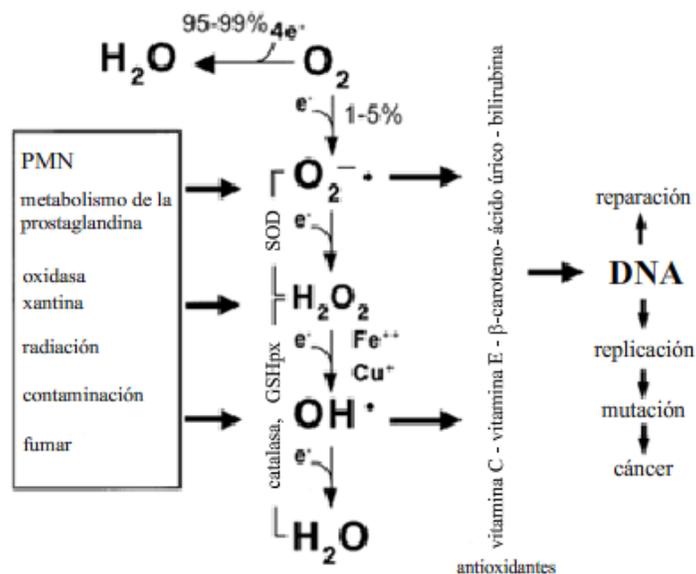
Las partículas de contaminación toman las rutas gastrointestinales cuando son ingeridas a través del alimento contaminado y al ser tragadas después de ser removidas de las vías respiratorias por el sistema de limpieza mucociliar. Se estima que del 12 al 18% de la exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos en seres humanos no-fumadores es debido a la ingestión de alimentos contaminados con partículas atmosféricas, mientras que únicamente el 6% del total de hidrocarburos aromáticos policíclicos se origina de partículas inhaladas (Danielsen *et al.*, 2008 *b*).

### **1.3 Estrés oxidante**

El estrés oxidante es un desbalance a favor de los oxidantes y en contra de los antioxidantes, lo cual puede llevar a daño en biomoléculas (Risom *et al.*, 2005).

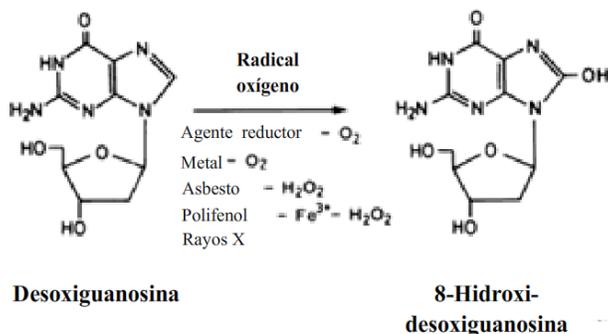
Algunos oxidantes importantes incluyen a las especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales se forman en las células por la reducción de oxígeno por agentes reductores biológicos (Ntziachristos *et al.*, 2007). Las principales EROs son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical oxidrilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Ríos de Molina, 2003). Los intermediarios de la reducción de oxígeno atacan al DNA y los radicales libres a otros componentes celulares, como lípidos o proteínas, para generar intermediarios que reaccionan con las bases (Marnett, 2000).

Existen sistemas de defensa antioxidantes para contrarrestar el daño producido por los EROs, por ejemplo, las vitaminas C y E, carotenoides, enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, glutatión peroxidasa. El daño producido puede llegar a ser demasiado para los sistemas de defensa o éstos son inadecuados y no se puede contrarrestar. El radical superóxido muestra reactividad limitada, pero es convertido a peróxido de hidrógeno por medio de la superóxido dismutasa. La reducción de peróxido de hidrógeno a agua se lleva a cabo por la catalasa y la glutatión peroxidasa (Figura 1) (Loft *et al.*, 1996).



**Fig. 1.** EROs generados por fuentes exógenas y endógenas, sistema de defensa antioxidante y daño potencial al DNA y posibles consecuencias. *SOD* superóxido dismutasa, *GSHpx* glutatión peroxidasa (Loft *et al.*, 1996).

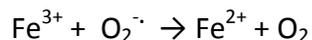
Uno de los productos del daño oxidante al DNA más estudiado es la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), la cual induce transversiones GT. Este producto es relativamente fácil de medir y tiene un gran potencial mutagénico (Figura 2) (Risom *et al.*, 2005).



**Fig. 2.** Hidroxilación de guanina (Kasai *et al.*, 1986)

## 1.4 Metales

Las partículas pueden contener metales de transición en su superficie, como hierro, cobre, cromo y vanadio. Varios estudios demuestran que estos metales provenientes de la superficie de partículas juegan un papel en la generación de EROs a través de la reacción de Fenton y actúan como catalizadores en reacciones Haber-Weiss (Risom *et al.*, 2005). El hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reduce el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) con la formación del radical hidroxilo y la oxidación de hierro ferroso a hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Risom *et al.*, 2005), esto resulta en la reacción neta de Haber-Weiss. La reacción de Fenton puede ser reciclada por reductores como aniones superóxido, glutatión y ácido ascórbico reduciendo  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Risom *et al.*, 2005).



Reacción Neta (Haber-Weiss):



Estudios de células libres empleando DNA desnudo expuesto a partículas en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  han demostrado generar  $\text{HO}\cdot$ . La importancia del hierro en el daño inducido al DNA fue determinado utilizando deferoxamina (quelante de hierro), el cual inhibe la formación de  $\text{HO}\cdot$  y disminuye los niveles de daño al DNA después de ser expuestos a partículas (Knaapen *et al.*, 2002).

## **1.5 Bioensayos**

A lo largo de los años se han ido desarrollando gran cantidad de pruebas para medir el daño al material genético. Los bioensayos son métodos que se llevan a cabo para medir y determinar la genotoxicidad de ciertos componentes. Uno de los más utilizados para evaluar en daño al DNA es el ensayo cometa, el cual detecta las rupturas en la cadena del DNA (Møller, 2005).

### **Ensayo Cometa**

Es un método usado frecuentemente para la detección de daño al DNA desde que fue introducido en 1984 por Östling y Johanson (Klaude *et al.*, 1996). El daño al DNA se evalúa en términos de rotura de la cadena de DNA (SB por sus siglas en inglés) que pueden ser cuantificadas empleando diferentes tinciones de DNA. El DNA es observado en un microscopio de fluorescencia.

El ensayo cometa tiene como antecedente el trabajo de Rydberg y Johanson, quienes describieron un método para detectar la cantidad de daño al DNA en cadenas sencillas y en cadenas dobles. Esto fue a través de células de mamífero en agarosa, lisadas bajo condiciones alcalinas, lo que permitía que se desenrollaran las cadenas con roturas. Cuando el DNA era teñido, las cadenas sencillas emitían luz roja mientras que las cadenas dobles emitían luz verde (Møller, 2005).

En 1984, Östling y Johanson modificaron este método reemplazando el tratamiento alcalino por la electroforesis. En 1988, Singh y colaboradores utilizaron el tratamiento alcalino durante la electroforesis, lo cual le dio una mayor sensibilidad al ensayo (Møller, 2005).

Existen actualmente dos versiones del ensayo cometa, uno introducido por Singh y colaboradores en el cual se utiliza un pH alcalino (pH > 13) en la electroforesis para

analizar en daño al DNA y el cual es capaz de detectar roturas simples de la cadena y sitios lábiles alcalinos en células individuales. Por otro lado, Olive y colaboradores introdujeron una versión neutral, la cual involucra lisis en tratamiento alcalino seguido por electroforesis neutral o electroforesis con un nivel bajo de alcalinidad (pH 12.3). Esta versión puede detectar roturas simples de la cadena. En principio, los dos métodos son iguales, sin embargo, el de Singh y colaboradores parece ser uno o dos órdenes de magnitud más sensible (Rojas *et al.*, 1999).

En la última década, el ensayo cometa ha sido ampliamente utilizado como uno de los métodos estándar para evaluar daño al DNA (Collins, 2004). Ha sido aplicado en gran variedad de campos científicos como toxicología genética, ecotoxicología, apoptosis (Møller, 2005), biomonitoreo humano, epidemiología molecular y reparación del DNA, entre otros. Esto se debe a que es un método simple, sensible, versátil, rápido y económico (Collins, 2004).

El principio básico de la detección del daño al DNA en este método es la evaluación del movimiento del DNA en el gel de agarosa (Møller, 2005). El procedimiento comienza con la lisis de las células, lo cual remueve membranas celulares y nucleares así como las proteínas (Møller, 2006). Lo que queda son los nucleoides, que consisten de una matriz nuclear compuesta de RNA con proteínas, junto con el DNA que está superenrollado como consecuencia del enrollamiento de la doble cadena de DNA alrededor de las histonas, esto implica que el DNA no tiene movimiento libre (Collins, 2004).

La electroforesis de las células en agarosa a un pH alto tiene como resultado estructuras que parecen cometas, los cuales se pueden observar teñidos bajo un microscopio de fluorescencia. La longitud de la cola del cometa en relación a la cabeza refleja el número de rompimientos en el DNA. Esto ocurre ya que las cadenas de DNA

que tiene un rompimiento, pierden su estructura de superenrollado y pueden extenderse hacia el ánodo (Collins, 2004).

En 1993 Collins y colaboradores modificaron el método para detectar tipos específicos de daño al DNA utilizando la enzima DNA-Formamidopirimidina Glicosilasa (FPG) de *E. coli*. La FPG es una enzima bacteriana que tiene la misma función que OGG1 en los humanos (Danielsen *et al.*, 2008 *a*) y detecta purinas oxidadas como por ejemplo, 8-oxodG (Møller, 2005).

Es posible medir la puntuación en el ensayo del cometa sin el uso de programas sofisticados de análisis de imagen. El ojo humano se puede entrenar de manera fácil para discriminar el grado de daño de acuerdo a la apariencia del cometa. Se pueden clasificar en 5 categorías, desde la 1 en la que no se presenta una cola, hasta la 5 en la que casi todo el DNA está en la cola. Se cuentan 100 cometas por gel y se les asigna un valor del 1 a 5 unidades arbitrarias dependiendo de la categoría en la que se encuentren.

## **2.0 JUSTIFICACIÓN**

Los procesos ineficientes de combustión dan como resultado la emisión de mezclas complejas de contaminantes orgánicos, metales y partículas finas. Las fuentes de combustión incompleta de carburantes son muy variadas, entre ellas los procesos de fabricación, el uso de combustibles para la calefacción, la cocción de alimentos, y los incendios forestales, entre otros. Sin embargo, son los vehículos de combustión interna los responsables en gran medida de la contaminación ambiental. Las mezclas complejas de partículas y gases derivados de estos procesos de combustión, generan problemas a la salud humana y al ambiente. Las fuentes de combustión se presentan globalmente, por lo que tanto las poblaciones de las ciudades industriales como las de las ciudades y del campo enfrentan riesgos importantes que afectan su salud ambiental. Además, los productos de la combustión pueden tener impacto en ecosistemas enteros y en el cambio climático (Avakian *et al.*, 2002). La exposición a los constituyentes del aire contaminado puede provocar daños a las biomoléculas de los seres humanos y de otros seres vivos, lo cual puede estar relacionado con diversas enfermedades como el cáncer. Recientemente se ha demostrado una asociación entre el nivel de partículas finas en el aire contaminado y la muerte por cáncer de pulmón (Møller *et al.*, 2008). El aire contaminado por humo de motores de diesel es un factor de riesgo ambiental para la salud humana. Estas partículas contienen una mezcla diversa de compuestos químicos incluyendo diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos con potencial mutagénico (Müller *et al.*, 2004). Las partículas de diesel, son consideradas tóxicas ya que provocan estrés oxidante, saturación de los sistemas de defensa del organismo y la formación de diversas lesiones en el DNA (Danielsen *et al.*, 2008 *b*). El ensayo del cometa es un método simple para medir las lesiones al DNA en las células de eucariontes. En la última década este ensayo se ha vuelto uno de los métodos estándar para evaluar el daño al DNA, con aplicaciones en la medición de la genotoxicidad, la epidemiología molecular, la ecogenotoxicología así como en la investigación sobre los diversos mecanismos de reparación del DNA (Collins, 2004). Por lo anterior el presente trabajo pretende evaluar

el daño inducido al DNA por diversas partículas (Fulereo de  $C_{60}$  ( $C_{60}$ ), Negro de Carbón (CB), Material de Referencia Estándar 2975 (SRM 2975) y Nanotubos de carbono monocapa o de capa simple (SWCNT)) en el ensayo cometa.

### **3.0 HIPÓTESIS**

Las células cancerígenas de hígado humano (HepG2) serán afectadas por la exposición a diferentes nanopartículas que provocarán rupturas en las cadenas de DNA visualizadas a través del ensayo cometa.

### **4.0 OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

Evaluar la genotoxicidad de nanopartículas en células hepáticas humanas *in vitro*, provenientes de pacientes con cáncer de hígado (HepG2), mediante el ensayo cometa.

#### **4.2 Particular**

Las diferentes partículas que serán evaluadas son:  $C_{60}$  (nanotubos de carbono), EliCarb® SWCNT, CB (carbon Black) Printex 90 y SRM2975.

## **5.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Células empleadas**

Las células HepG2 (carcinoma hepatocelular) se obtuvieron de la compañía LGC Prochem. Éstas se crecieron en medio nutriente F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina al 1% y penicilina-streptomina al 1% (Invitrogen, Dinamarca).

### **5.2 Solución de partículas (compuestos genotóxicos)**

El C<sub>60</sub> al 99.9% puro. Comprado a través de Sigma Aldrich, Denmark (Prod. 572500).

El EliCarb® SWCNT (Nanotubos de carbono de pared simple) fue comprado como polvo seco de Thomas Swan, Consett, Reino Unido.

El CB (carbon Black) Printex 90 fue donado por Degussa-Hüls, Frankfurt, Alemania.

El R<sub>0</sub> 19-8022 fotosensibilizador fue donado por Hoffman-La Roche, Basel, Suiza.

El SRM2975 fue comprado a través del National Institute of Standards and Technology (Gaitersburg, MD, USA).

La solución de partículas (SRM2975) se preparó a una concentración de 2500 µg/ml; se guardó a una temperatura -20°C. Antes de ser empleada se ultrasónico durante 20 minutos, y al término, se resuspendió colocándola unos segundos en el vortex.

### **5.3 Ensayo cometa**

Las células fueron colocadas en placas de cultivo de 24 pozos (1.9 cm<sup>2</sup>/pozo), a una concentración de 2.25x10<sup>5</sup> células por mililitro por pozo y se dejaron crecer durante la noche. Al día siguiente, se les removió el medio F12 en el que crecían y posteriormente fueron tratadas con 1 ml de solución de partículas diluido con medio F12 a concentraciones finales de 0, 2.5, 25, 100 y 200 µg/ml. Las diluciones fueron calculadas de la siguiente manera:

Concentración final	µl de solución de partículas necesaria	µl de medio necesario
0 µg/ml	0 µg/ml	1000 µl
2.5 µg/ml	2500 µg/ml → 1 2.5 µg/ml → x $x = (2.5 \mu\text{g/ml}) / (2500 \mu\text{g/ml})$ x = 0.001 ml x = 1 µl	999 µl
25 µg/ml	2500 µg/ml → 1 25 µg/ml → x $x = (25 \mu\text{g/ml}) / (2500 \mu\text{g/ml})$ x = 0.01 ml x = 10 µl	990 µl
100 µg/ml	2500 µg/ml → 1 100 µg/ml → x $x = (100 \mu\text{g/ml}) / (2500 \mu\text{g/ml})$ x = 0.04 ml x = 40 µl	960µl
200 µg/ml	2500 µg/ml → 1 200 µg/ml → x $x = (200 \mu\text{g/ml}) / (2500 \mu\text{g/ml})$ x = 0.08 ml x = 80 µl	920 µl

Las células se expusieron a las concentraciones de partículas por 3 horas en una incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al término de este tiempo, se les removió la solución de partículas con medio y se lavaron una vez con 1 ml de amortiguador fosfato salino (PBS) y se removió. A continuación, se agregaron 100 µl de tripsina al 0.05% (Invitrogen™, DK) a cada pozo y se colocó la placa de cultivo en la incubadora por 7 minutos, al término se corroboró en el microscopio si las células se separaron del pozo. Se agregó un mililitro de medio en cada pozo para recolectar las células en tubos eppendorf y se centrifugaron a 3000 rpm, a 4°C por 5 minutos.

Cámaras de gel fueron posicionadas en el lado hidrofílico de la película de GelBond® (Cambrex, Medinova Scientific A/S, Helerup, DK) utilizando agarosa al 1%. La película de gel consiste de ocho áreas, divididas por cuatro cámaras de plástico). Se

debe cortar por lo menos una de las esquinas como punto de referencia y tomar nota de cómo van a estar distribuidos los geles.

Se derritió agarosa al 0.75% y se mantuvo en la incubadora a 37°C. El sobrenadante de los tubos eppendorf fue descartado. Se tomaron 600 µl de la agarosa al 0.75% y se mezclaron con la pastilla (las células) hasta disolverla por completo. De esta mezcla, se tomaron únicamente 120 µl y se situaron de manera uniforme sobre el gel en la cámara correspondiente:

SB (roturas en la cadena de DNA)

FPG (DNA-Formamidopirimidina Glicosilasa)

0 µg/ml	2.5µg/ml
25µg/ml	100µg/ml
200µg/ml	
R <sub>0</sub>	Cél. limpia

0 µg/ml	2.5µg/ml
25µg/ml	100µg/ml
200µg/ml	
R <sub>0</sub>	Cél. limpia

En los geles, se agregaron también los testigos: células limpias y células expuestas a R<sub>0</sub>.

Se colocaron los geles en el refrigerador por 5 minutos, al término de éstos, se removieron las cámaras de plástico. Los geles fueron puestos en amortiguador de lisis durante la noche a 4°C.

#### **5.4 El paso enzimático:**

Se removió el amortiguador de lisis y se lavaron los geles 3 veces por 5 minutos en endoamortiguador. Se hicieron combinaciones paralelas de las concentraciones en los geles, uno para exposición a DNA-Formamidopirimidina Glicosilasa (FPG) y otro no. Al gel para exposición a FPG, se le agregaron 60 µl de FPG (1 mg/ml) a cada una de las concentraciones y a los testigos mientras que al otro gel, se le agregaron 60 µl de endoamortiguador. Se les colocó un cubreobjetos y se incubaron a 37°C por 45 minutos.

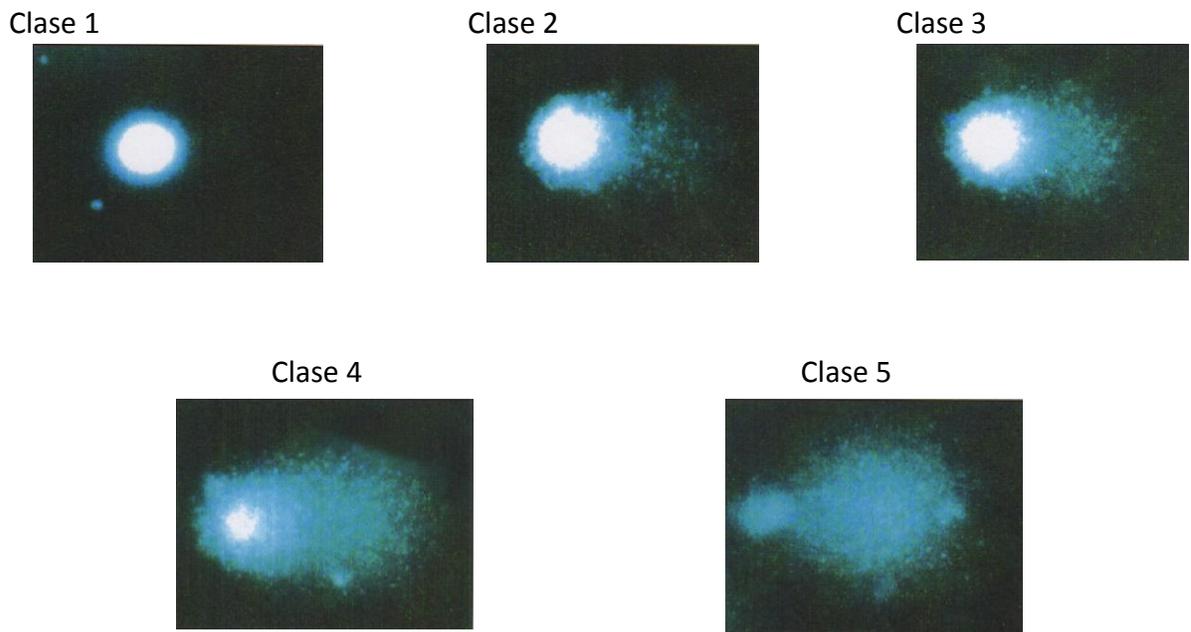
Al término de este tiempo, se enjuagaron los geles con agua antes de ponerlos en el tanque de electroforesis. En el cuarto frío, se vertieron en el tanque de electroforesis aproximadamente 1200 ml de amortiguador de electroforesis; este debe estar fresco y frío (4°C). Se dejaron los geles en el tanque por 40 minutos. Posteriormente, se conectó la bomba y se ajustó la corriente a 300 mA y a un voltaje de 25 V por medio de adición o sustracción de solución al tanque. Se dejó correr el gel por 20 minutos.

Al finalizar la electroforesis, los geles se enjuagaron tres veces por 5 minutos en amortiguador neutralizador. Se dejaron en etanol al 96% durante la noche y al día siguiente se sacaron y se dejaron secar.

Se le agregaron 60 µl de colorante fluorescente YOYO-1 a cada uno de los geles. El nivel de daño en el DNA fue observado en un microscopio de fluorescencia a una magnitud de 40x. Se evaluaron 100 células por cada muestra. El nivel de daño al DNA se obtuvo evaluando las imágenes de acuerdo a las 5 clases diferentes y la siguiente ecuación:

Daño total = (No. de células clase 1 \* 1 + No. de células clase 2 \* 2 + No. de células clase 3 \* 3 + No. de células clase 4 \* 4 + No. de células clase 5 \* 5) – número total de imágenes evaluadas. En el caso de las células tratadas con la enzima FPG, se realizó la siguiente operación para demostrar la diferencia en la mayor cantidad de daño que detectó la enzima:

$$\text{Daño total de FPG} - \text{Daño total de SB}$$



**Fig. 3** Tipos de daño al DNA (Puntuación) que se espera obtener en el ensayo cometa (Tomado bajo permiso de The Rowett Research Institute, Scotland, UK). Clase 1 que no presenta daño hasta clase 5 que presenta el mayor daño.

El mismo procedimiento se siguió para hacer los seis experimentos utilizando diferentes tipos de partículas:

- I. C<sub>60</sub>
- II. CB
- III. SRM 2975
- IV. SWCNT

### 5.5 Solución de partículas

Las partículas utilizadas estaban a una concentración de 500 µg/ml y almacenadas a una temperatura de -20°C. Todas las muestras se hicieron a una concentración de 25 µg/ml de solución de partículas, por lo que la misma cantidad de medio y solución de partículas fueron empleadas en todos los casos:

Concentración final	µl de solución de partículas necesaria	µl de medio necesario
25 µg/ml	50 µl	950 µl

La distribución de los geles fue la siguiente:

SB (roturas al DNA)

0µg/ml	I
II	III
IV	
R <sub>0</sub>	Céls. limp

FPG (células tratadas con enzima)

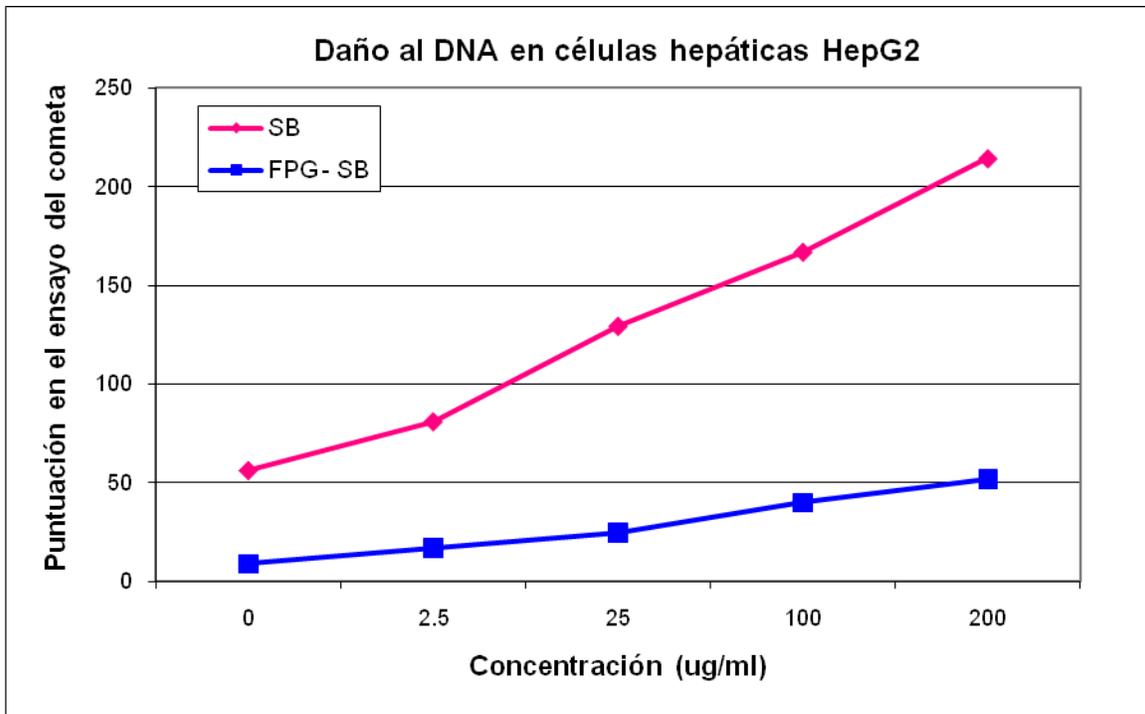
0 µg/ml	I
II	III
IV	
R <sub>0</sub>	limpias

## 6.0 RESULTADOS

Se muestra tanto en la **Tabla 1** como en la **Gráfica 1** que existe una correlación entre la concentración de partículas y el daño al DNA; entre mayor sea la concentración de partículas, mayor es el daño al DNA presentado en las células. Se puede también notar que el daño en SB y en células tratadas con la enzima FPG siguen este patrón.

**Tabla 1.** Cifras promedio del daño al DNA en los experimentos realizados con diferentes concentraciones de solución de partículas (0, 2.5, 25, 100, 200 µg/ml) en SB y FPG - SB.

	Concentración (µg/ml)	Repeticiones						Promedio	Desviación estándar
		1	2	3	4	5	6		
FPG - SB									
	0	8	9	7	7	8	14	8.83	1.08
	2.5	18	18	15	13	20	17	16.83	1.01
	25	24	22	20	33	28	21	24.66	2.03
	100	42	27	49	39	32	50	39.83	3.74
	200	62	36	53	46	58	55	51.66	3.81
SB									
	0	120	35	40	59	45	37	56	13.27
	2.5	141	80	57	71	75	61	80.83	12.53
	25	139	117	108	110	147	155	129.33	8.2
	100	184	148	145	138	195	192	167	10.6
	200	179	187	228	237	228	228	214.5	11.12



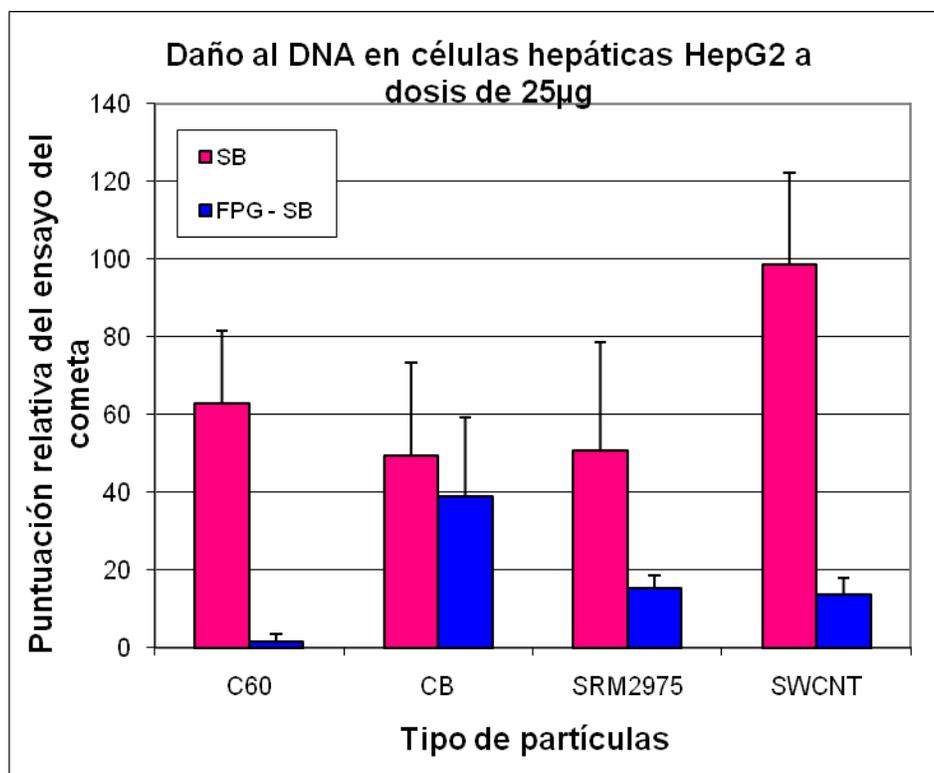
**Gráfica 1.** Relación entre las concentraciones de la solución de partículas y el daño al DNA.

En cuanto a la **Tabla 2** , se puede ver que FPG muestra valores más altos que las células tratadas con SB para todos los promedios de daño de los diferentes tipos de partículas. En cuanto a SB, las partículas SWCNT muestran el valor más alto de puntaje relativo con 194.166, mientras que CB muestra el más bajo con 145. El valor más alto de FPG lo muestra CB con 50.83 más que SB mientras que el más bajo le corresponde a C<sub>60</sub> con 13.16 más que SB.

**Tabla 2.** Promedio del daño al DNA en los experimentos realizados con diferentes soluciones de partículas en SB y FPG.

	Partícula	Repeticiones						Promedio	Desviación estándar
		1	2	3	4	5	6		
<b>FPG - SB</b>									
	Testigo	17	19	4	8	18	4	11.66	2.91
	C <sub>60</sub>	13	10	12	23	9	12	13.16	2.06
	CB	143	12	54	10	56	30	50.83	20.16
	SRM2975	14	30	25	24	33	36	27	3.2
	SWCNT	30	16	40	34	15	18	25.5	4.3
<b>SB</b>									
	Testigo	49	52	64	55	147	206	95.5	26.8
	C <sub>60</sub>	151	121	115	134	203	226	158.33	18.70
	CB	77	113	94	168	205	213	145	23.81
	SRM2975	129	73	98	116	230	232	146.33	27.85
	SWCNT	156	179	155	140	266	269	194.16	23.74

La **Gráfica 2** muestra que las partículas SWCNT fueron las que más dañaron a la cadena de DNA en cuanto a SB. Las células expuestas a CB fueron las que reportaron una mayor diferencia de daños a la cadena de DNA entre SB y las células tratadas con la enzima FPG. Las células expuestas a C<sub>60</sub> reportaron la menor diferencia de daño a la cadena entre las SB y las células tratadas con la enzima FPG.



**Gráfica 2.** Daño al DNA provocado por los diferentes tipos de partículas.

El experimento realizado con diferentes concentraciones de solución (0, 2.5, 25, 100, 200 µg/ml) de partículas SRM2975, demuestra que el nivel de daño al DNA incrementó significativamente, en comparación al testigo, en las concentraciones de 25 µg/ml en adelante para SB. Para las células tratadas con la enzima FPG, el nivel de daño al DNA incrementó significativamente en comparación al testigo en las concentraciones 2.5 µg/ml en adelante.

Esto se determinó al realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos de las lecturas de las preparaciones. La prueba utilizada en este caso es una prueba de Leven para conocer la homogeneidad de la varianza y posteriormente un análisis de la varianza (ANOVA).

Al obtener estos resultados, se procedió a comparar los diferentes tipos de partículas ( $C_{60}$ , CB, SRM 2975, SWCNT) utilizando únicamente la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para todas. A los resultados de este experimento también se les realizó una prueba de Leven para determinar la homogeneidad de la varianza y posteriormente un ANOVA.

Los resultados obtenidos del ANOVA muestran que para SB, el nivel de daño al DNA incrementa significativamente entre el testigo y las partículas  $C_{60}$  y entre el testigo y las partículas SWCNT. Para las células tratadas con la enzima FPG, el nivel de daño incrementó significativamente entre el testigo y las partículas SWCNT. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los tipos de partículas a esta concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## **7.0 DISCUSIÓN**

El ensayo cometa empleado en este trabajo detecta lesiones en las cadenas de DNA (SB) que pueden ser resultado de varios tipos de daño como la oxidación pero pueden también representar intermediarios del proceso de reparación. Para conocer cuáles son intermediarios del proceso de reparación, se utilizan endonucleasas de reparación de origen bacteriano con especificidad apropiada, como la enzima FPG (Collins, 2007).

Se demostró que existe una relación directa entre la concentración y el daño, esto es que a mayor concentración de las partículas, más elevado será el daño producido en el DNA, en el caso de SB y de las células tratadas con la enzima FPG. Las partículas de diesel utilizadas (SRM2975) fueron colectadas de una carretilla elevadora industrial de diesel que contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y nitroarenos (una familia de los hidrocarburos poliaromáticos). Existen estudios que sugieren que estos compuestos químicos orgánicos pueden causar una respuesta carcinogénica en roedores (Dybdahl *et al.*, 2003). Está muy bien documentado que el mecanismo de acción de los PAHs, la mayoría carcinogénicos, es a través de la formación de aductos en el DNA y la inducción de daño oxidante (Møller *et al.*, 2008).

El daño oxidante causado a las cadenas de DNA es provocado por las especies reactivas del oxígeno (EROs). Se ha argumentado que los EROs juegan un papel importante en los efectos citotóxicos de las partículas de diesel. La generación de EROs puede ocurrir a través de la presencia de radicales libres y oxidantes en la superficie de las partículas (Risom *et al.*, 2005). Estudios *in vivo* señalan que las propiedades oxidantes de las partículas de diesel incrementan las lesiones 8-oxodG, el aducto oxidante del radical hidroxilo, en los pulmones de ratas expuestas y en cultivos de células tratadas con partículas de diesel. Al haber estrés oxidante, existe una

subsecuente señalización pro-inflamatoria en la cual pueden estar involucrados algunos metales de transición (Donaldson *et al.*, 2005).

La enzima FPG detecta purinas oxidadas, en particular 8-oxodG. En este trabajo las células que fueron tratadas con la enzima FPG mostraron mayor daño que las células a las que no se les agregó la enzima. El rango de sitios sensibles a la enzima en el experimento es menor a SB porque estos sitios son obtenidos sustrayendo el número promedio de lesiones de SB del número promedio de lesiones tratadas con la enzima (**Tabla 2**). Ello se puede deber a que la enzima FPG, al tener la misma función que la enzima OGG1 en los seres humanos (reparar daño oxidante en el DNA), corta el DNA para así poder comenzar a repararlo (Møller *et al.*, 2008). La reparación por medio de escisión de bases es la manera más común de reparación de DNA de mamíferos para remover purinas oxidadas como 8-oxodG. La eliminación de 8-oxodG por este medio es iniciada por la hidrólisis de la base alterada por la enzima oxoguanina DNA glicosilasa 1 (Møller *et al.*, 2008). Por esta razón, se muestran más lesiones en las células con la enzima FPG.

Las bases oxidadas como las 8-oxodG son potencialmente mutagénicas al alterar las propiedades de apareamiento de la base (8-oxodG tiende a aparearse con adenina), y es claro que las mutaciones somáticas en genes cruciales son la causa de la mayoría de los cánceres (Collins, 2007). Existe evidencia epidemiológica que indica que el cáncer puede ocurrir en un sitio de previa inflamación, infección o lesión. Esto demuestra una relación entre el estrés oxidante y el cáncer (Collins, 2007).

El presente trabajo muestra que existe daño al DNA después de exponer a las células hepáticas de hígado humano a las diferentes partículas con una concentración de 25 µg/ml. Hay estudios que confirman que partículas como carbón black (CB) son genotóxicas, a pesar de no contener PAHs, y pueden incluso causar tumores, así como

partículas que contengan PAHs como las de diesel, las cuales pueden causar aductos al DNA y roturas a las cadena (Dybdahl *et al.*, 2003).

En cuanto al daño observado en las células expuestas a los distintos tipos de partículas (**Gráfica 2**), se puede notar que no existe una diferencia cualitativa significativa en la inducción de daño al DNA, lo que indica que todos los tipos de partículas dañan a la cadena en forma similar.

El daño causado por las partículas CB utilizadas en este experimento no mostró diferencia significativa con el daño causado por otras partículas. Las partículas de CB han sido utilizadas de manera extensa en estudios de toxicología como sustituto del carbón elemental en el aire contaminado (Guo *et al.*, 2009).

El carbono elemental se encuentra comúnmente en la atmósfera urbana; un estudio realizado en ciudades de California del sur indica que las partículas ultrafinas atmosféricas están compuestas (por masa) en un 8.7% de carbono elemental (Guo *et al.*, 2009). Estas partículas son producidas industrialmente por la descomposición térmica incompleta de hidrocarburos (Donaldson *et al.*, 2005).

En estudios a largo plazo en animales se ha encontrado que las partículas CB son cancerígenas, también se ha descrito que causan niveles bajos pero detectables de efectos inflamatorios en ratas que fueron sometidas a exposición por inhalación, lo cual parece ser una consecuencia de su alta área de superficie por unidad de masa (Donaldson *et al.*, 2005). En estudios con cultivos de células, las partículas CB causan estrés oxidante y transcripción de genes pro-inflamatorios (Donaldson *et al.*, 2005). En estudios sobre el estado de salud de individuos que trabajan en la industria del negro de carbón, hay evidencias que muestran anomalías en radiografías de pecho y morbilidad respiratoria (Donaldson *et al.*, 2005).

En este trabajo, se pudo observar que el daño al DNA incrementó significativamente entre el testigo y las células expuestas a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{C}_{60}$ . Las partículas  $\text{C}_{60}$  son fulerenos que consisten de 60 átomos de carbono arreglados en una estructura de un domo geodésico aromático con un diámetro nanométrico (Folkmann *et al.*, 2009). Se ha demostrado en otros experimentos que las partículas  $\text{C}_{60}$  causan daño oxidante al DNA (Folkmann *et al.*, 2009). Según los estudios de Folkmann y colaboradores (2009) el tejido de hígado de ratas presentó un incremento de lesiones 8-oxodG al ser expuesto a altas y bajas concentraciones de partículas  $\text{C}_{60}$ . Incluso evidenciaron que existe una correlación entre la concentración de partículas y el daño al DNA. Otros estudios, como los de Dhawan y colaboradores (2006), también señalaron que la exposición de células en cultivo a los fulerenos  $\text{C}_{60}$  está asociada con niveles elevados de daño al DNA en el ensayo cometa (Folkmann *et al.*, 2009).

La oxidación y el daño que provocan los fulerenos de  $\text{C}_{60}$  a las cadenas de DNA se podría deber a la mezcla de EROs que presentan estas partículas, como explican Usenko y colaboradores (2008), quienes reportan incremento en la mortalidad de peces zebra expuestos a fulerenos de  $\text{C}_{60}$  en la oscuridad y también mortalidad de estos peces después de co-exponerlos a fulerenos de  $\text{C}_{60}$  y peróxido de hidrógeno (Usenko *et al.*, 2008).

En el experimento realizado, los resultados de la exposición a las partículas SWCNT son los únicos en los que el daño causado a la cadena de DNA fue significativamente mayor al testigo, tanto en SB como en las células tratadas con la enzima FPG. Las partículas SWCNT son nanotubos de carbono de monocapa o de pared simple. Estos nanotubos están organizados en estructuras parecidas a cuerdas y tienden a aglomerarse (Warheit *et al.*, 2004). Varios estudios, como el de Warheit y colaboradores (2004), reportan el daño causado por la exposición a estas partículas, en el cual se expusieron ratas a SWCNT vía instilación intratraqueal, reportando efectos

inflamatorios y daño celular localizado alrededor de agregados de partículas SWCNT (Shedova *et al.*, 2005).

Otros estudios como el de Folkmann y colaboradores (2009) indican que la exposición a SWCNT provocó incremento en el nivel de lesiones 8-oxodG en el hígado de ratas, lo cual indica que produce lesiones de naturaleza oxidante. Además encontraron niveles elevados de lesiones en el DNA tanto en tejido de hígado como de pulmones, 24 horas después de administración oral de partículas SWCNT (Folkmann *et al.*, 2009). Los estudios de Shvedova y colaboradores (2005) también reportan que la exposición a partículas SWCNT ocasionan lesiones oxidantes ya que obtienen acumulación de el biomarcador característico de estrés oxidante 4-HNE (4-hidroxinonenal) y un antioxidante importante, GSH (glutación) (Shvedova *et al.*, 2005). Esto puede explicar el alto nivel de lesiones oxidantes reportadas en las células tratadas con la enzima FPG.

Según Choi y colaboradores (2004), las partículas finas como PM10 inducen enfermedades como tos crónica, bronquitis y otras enfermedades de pecho, sin embargo, estudios recientes demuestran que las partículas finas como PM2.5 también pueden causar roturas de la cadena de DNA y estrés oxidante al igual que las partículas ultrafinas (Choi *et al.*, 2004). Estudios realizados por Gasser y colaboradores (2009) han comprobado que la exposición de partículas finas a células epiteliales de pulmón también origina daño oxidante a la células así como respuestas inflamatorias.

## **8.0 CONCLUSIONES**

Se demostró que existe daño al DNA en células hepáticas de hígado después de ser expuestas a las diferentes partículas (SRM2975, CB, SWCNT y C<sub>60</sub>).

Se evidenció que el daño inducido son roturas de la cadena de DNA (SB) y lesiones oxidantes sensibles a la enzima FPG que se les agregó a las células y fueron evaluadas por medio del ensayo cometa.

**La diferencia del daño al DNA evaluada por el ensayo cometa entre las distintas partículas no fue significativa.** Esto puede indicar que los niveles de metales de transición e hidrocarburos aromáticos policíclicos en la superficie de las partículas de diesel (SRM2975) no deben ser responsables del daño a la cadena de DNA ya que las partículas de carbono (CB, SWCNT y C<sub>60</sub>) casi no tienen metales de transición ni hidrocarburos aromáticos policíclicos y a pesar de esto, provocaron daño al DNA, lo cual significa que tienen la habilidad de provocar daño y lesiones oxidantes por sí solas.

Otros estudios en diversos tipos de células así como estudios *in vivo* son necesarios para poder evaluar el daño que provocan estas partículas a los seres humanos. Las células de hígado tienen una tasa de proliferación baja, al igual que las células de pulmón, lo cual permite que el daño se pueda acumular. Sin embargo, esto no pasa en otros tejidos como en las células de la mucosa del colón, por lo que el daño al DNA podría ser menor.

Es también esencial desarrollar y aplicar tecnologías que puedan evaluar el grado al que los seres humanos están expuestos a las partículas en los diferentes ambientes. La complejidad del origen y la naturaleza de las partículas ultrafinas sugieren que es necesario descubrir y/o refinar el conocimiento acerca de la relación entre la exposición a partículas y los diversos daños provocados a la salud humana.

Es fundamental la investigación para incrementar los conocimientos acerca de los mecanismos de formación de contaminación y de la estabilización en la interfase gas-partículas. La investigación de la tasa de formación de contaminantes gaseosos y precursores, así como el desarrollo de mecanismos de interacción gas-partículas para formar contaminantes también es importante.

## **9.0 REFERENCIAS:**

Ayres JG, Borm P, Cassee FR, Castranova V, Donaldson K, Ghio A, Harrison RM, Hider R, Kelly F, Kooter IM, Marano F, Maynard RL, Mudway I, Nel A, Sioutas C, Smith S, Baeza-Squiban A, Cho A, Duggan S, Froines J: **Evaluating the Toxicity of Airborne Particulate Matter and Nanoparticles by Measuring Oxidative Stress Potential- A Workshop Report and Concensus Statement.** *Inhalation Toxicology Internal Forum for Respiratory Research* 2008, **20**:75-99.

Avakian MD, Dellunger B, Fiedler H, Gullet B, Koshland C, Marklund S, Oberdörster G, Safe S, Sarofim A, Smith KR, Schwartz D, Suk WA: **The Origin, Fate and Health Effects of Combustion By-Products: A Research Framework.** *Environmental Health Perspectives* 2002, **110**:11.

Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S, Loomis D: **Mortality and Ambient Fine Particles in Southwest Mexico City, 1993-1995.** *Environmental Health Perspectives* 1998, **106**:12.

Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdoster E: **The Potential Risk of Nanomaterials: a Review Carried out for ECETOC.** *Particle and Fibre Toxicology* 2006, **3**:11.

Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH: **Comparative Study of Pm2.5 – and PM10 Induced Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells.** *Journal of veterinary Science* 2004, **5**: 11-8.

Collins AR : **Investigating Oxidative DNA Damage and its Repair Using the Comet Assay.**  
*Mutation Research: Reviews in Mutation Research* 2007, **681**:1.

Collins AR: **The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations.** *Molecular Biotechnology* 2004, **26**: 249-261.

Danielsen Høgh P, Loft S, Møller P: **DNA Damage and Cytotoxicity in Type II Lung Epithelial (A549) Cell Cultures After Exposure to Diesel Exhaust and Urban Street Particles.** *Particle and Fibre Toxicology* 2008 *a*, **5**:6.

Danielsen PH, Risom L, Wallin H, Autrup H, Vogel U, Loft S, Møller P: **DNA Damage in Rats After Single Oral Exposure to Diesel Exhaust Particles.** *Mutation Research* 2008 *b*, **637**: 49-55.

Dhawan A, Taurozzi JS, Pandey AK, Shan W, Miller SM, Hashsham SA, Tarabara VV: **Stable Colloidal Dispersions of C<sub>60</sub> Fullerenes in Water: Evidence for Genotoxicity.** *Environmental Science Technology* 2006, **40**: 7394-7401.

Donaldson K, Tran L, Jiménez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V: **Combustion-derived Nanoparticles: A Review of their Toxicology Following Inhalation Exposure.** *Particle and Fibre Toxicology* 2005, **2**:10.

Dybdahl M, Risom L, Møller P, Autrup H, Wallin H, Vogel U, Bornholdt J, Daneshvar B, Dragsted LO, Weimann A, Enghusen Poulsen H, Loft S: **DNA Adduct Formation and Oxidative Stress in Colon and Liver of Big Blue ® Rats After Dietary Exposure to Diesel Particles.** *Carcinogenesis* 2003, **24**: 1759-1766.

Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Møller P: **Oxidatively Damaged DNA in Rats Exposed by Oral Gavage to C<sub>60</sub> Fullerenes and Single-Walled Carbon Nanotubes.** *Environmental Health Perspectives* 2009, **117**:5.

Gasser M, Riediker M, Mueller L, Perrenoud A, Blank F, Gehr P, Rothen-Rutishauser B: **Toxic Effect of Break Wear Particles on Epithelial Lung Cells In Vitro.** *Particle and Fibre Toxicology* 2009, **6**:30.

Guo B, Zebda R, Drake SJ, Sayes CM: **Synergistic Eof Co-Exposure to Carbon Black and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles on Oxidative Stress in Cultured Lung Epithelial Cells.** *Particle and Fibre Toxicology* 2009, **6**:4.

Günter O, Oberdöster E, Oberdöster J: **Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles.** *Environmental Health Perspectives* 2005, **113**:7.

Hetland RB, Flemming RC, Låg M, Refsnes M, Dybing E, Schwarze PE: **Cytokine Release from Alveolar Macrophages Exposed to Ambient Particulate Matter: Heterogeneity in Relation to Size, City and Season.** *Particle and Fibre Toxicology* 2005, **2**:4.

Kasai H, Nishimura S: **Hydroxylation of Guanine in Nucleosides and DNA at the C-8 Position by Heated Glucose and Oxygen Radical-Forming Agents.** *Environmental Health Perspectives* 1986, **67**:111-116.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G: **The Comet Assay: Mechanisms and Technical Considerations.** *Mutation Research/Dna Repair* 1996, **363**: 89-96.

Knaapen AM, Shi T, Borm P, Schins R: **Soluble Metals as Well as the Insoluble Particle Fraction are Involved in Cellular DNA Damage Induced by Particulate Matter.** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002, **234/235**: 317-326.

Kocbach A, Li Y, Yttri KE, Cassee FR, Schwarze PE, Namork E: **Physicochemical Characterisation of Combustion Particles from Vehicle Exhaust and Residential Wood Smoke.** *Particle and Fibre Toxicology* 2006, **3**:1.

Loft S, Poulsen HE: **Cancer Risk and Oxidative DNA Damage in Man.** *Journal of Molecular Medicine* 1996, **74**:297-312.

Marnett LJ: **Oxyradicals and DNA damage.** *Carcinogenesis* 2000, **21**: 361-370.

Müller AK, Farombi EO, Møller P, Autrup HN, Vogel U, Wallin H, Dragsted LO, Loft S, Binderup M : **DNA Damage in Lung After Oral Exposure to Diesel Exhaust Particles in Big Blue® Rats.** *Mutation Research* 2004, **550**: 123-132.

Møller P. : **Genotoxicity of Environmental Agents Assesed by the Alkaline Comet Assay.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2005, **96**:1.

Møller P. : **The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006, **98**: 336-345.

Møller P, Folkmann JK, Forchhammer L, Bräuner EV, Danielsen PH, Risom L, Loft S : **Air Pollution, Oxidative Damage to DNA, and Canrcinogenesis.** *Cancer Letters* 2008, doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.030.

Ntziachristos L, Froines JR, Cho AK, Sioutas C: **Relationship Between Redox Activity and Chemical Speciation of Size-Fractionated Particulate Matter.** *Particle and Fibre Toxicology* 2007, **4**:5.

Risom L, Møller P, Loft S: **Oxidative Stress-Induced DNA Damage by Particulate Air Pollution.** *Mutation Research* 2005, **592**: 119-137.

Ríos de Molina M: **El Estrés Oxidativo y el Destino Celular.** *Química Viva* 2003, **2**:1.  
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.html>

Rojas E, Lopez MC, Valverde M : **Single Cell Gel Electrophoresis Assay: Methodology and applications.** *Journal of Chromatography B* 1999, **722**: 225-254.

Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ki B, Ramsey D, Maynard E, Kagan VE, Castranova V, Baron P : **Unusual Inflammatory and Fibrogenic Pulmonary Responses to Single-Walled Carbon Nanotubes in Mice.** *AJP-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2005, **289**: 698-708.

Sioutas C, Delfino RJ, Manisha S: **Exposure Assessment for Atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and Implications in Epidemiologic Research.** *Environmental Health Perspectives* 2005, **113**:8.

Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL: **Fullerene C60 Exposure Elicits an Oxidative Stress Response in Embryonic Zebrafish.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008, **229**: 44-55.

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR: **Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats.** *Toxicological Sciences* 2004, **77**: 117-125.

## **10.0 ANEXO 1**

### **Preparación de soluciones**

#### **Amortiguador Neutralizador**

1600 ml H<sub>2</sub>O

96.88 g Trisma base (0.4M)

pH ajustado a 7.5 utilizando 6M HCl

#### **Endo-amortiguador**

1800 ml H<sub>2</sub>O

19.06 g Hepes (40mM)

14.9 g KCl (0.1M)

0.36 g Na<sub>2</sub> EDTA (0.5mM)

pH ajustado a 8.0 utilizando 1M NaOH

Al final se agregan 0.4 g BSA (0.2 mg/ml)

#### **Amortiguador de lisis**

900 ml H<sub>2</sub>O

146.1 g NaCl (2.5 M)

37.22 g Na<sub>2</sub>EDTA (100mM)

1.211 g Trisma base (10mM)

pH ajustado a 10 utilizando 5M NaOH

Justo antes de utilizarse, se le agrega 1 ml de Triton X-100 a 100ml de buffer

#### **Agarosa**

Agarosa al 1% tipo I-A

1 g a 100 ml PBS

Agarosa al 0.75% tipo VII

0.75 g a 100 ml PBS

**Amortiguador de electroforesis**

1500 ml H<sub>2</sub>O

18 g NaOH (300 mM)

0.558 g Na<sub>2</sub>EDTA (1mM)

**Enzima**

La enzima FPG fué obtenida del Profesor Andrew Collins de la Universidad de Oslo, Noruega.