

ANÁLISIS DE LA GENOTOXICIDAD DE MATERIAL PARTICULADO RECOLECTADO EN DOS CIUDADES DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA, ARGENTINA, MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

GENOTOXICITY ANALYSIS OF PARTICLE FORMED MATERIAL COLLECTED IN TWO CITIES IN THE PROVINCE OF CORDOBA, ARGENTINA, BY MEANS OF A MICRONUCLEI ASSAY

MARÍA FERNANDA GARCÍA FERREYRA^{1*}, HEBE ALEJANDRA CARRERAS ARANCIBIA¹

¹Cátedra de Química General. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba - Argentina

*Autor para correspondencia: María Fernanda García Ferreyra, fernanda.garciaferreyra@gmail.com, Vélez Sarsfield 1611 – FCEfYN Ciudad Universitaria - X5016GCA Córdoba, Argentina. Teléfono: +54 351 4344983 - Fax: +54 351 4334139.

RESUMEN

En los ambientes urbanos, las partículas en suspensión y el material adsorbido a ellas constituyen uno de los contaminantes atmosféricos más importantes debido a que contienen compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica o carcinogénica. Con el objetivo de evaluar la genotoxicidad de extractos orgánicos e inorgánicos de material particulado recolectado en dos ciudades de la provincia de Córdoba, Argentina (Córdoba y Río Ceballos), se empleó el ensayo de micronúcleos en *Tradescantia pallida*. Las muestras fueron obtenidas mediante un equipo colector de gran volumen y luego fueron extraídas con agua y dimetilsulfóxido para separar las fracciones acuosa y orgánica, respectivamente. Los resultados mostraron que la concentración de material particulado recolectado en Córdoba fue significativamente mayor a la de Río Ceballos, debido probablemente a diferencias en la intensidad de tránsito vehicular en ambas ciudades. Además se observó que el dimetilsulfóxido tuvo un efecto significativo en la formación de micronúcleos, lo cual podría enmascarar los resultados del ensayo para la fracción orgánica. Para la fracción acuosa, ambos sitios de muestreo mostraron un efecto significativo en su capacidad genotóxica con respecto a la formación de micronúcleos espontánea.

Palabras clave: Material particulado, análisis de genotoxicidad, *Tradescantia pallida*, ensayo de micronúcleos.

ABSTRACT

In urban environments, suspended particles and the material absorbed by them are one of the most important atmospheric pollutants due to the fact that they are formed by compounds with high genotoxic, mutagenic or carcinogenic activity. In order to assess the genotoxicity of organic as well as inorganic extracts of particle formed material collected in two cities of the province of Córdoba, Argentina, (Córdoba and Río Ceballos) the micronucleous assay was used in *Tradescantia pallida*. Samples were obtained using a high volume collecting equipment and were then extracted with water and dimethylsulphoxide to separate aqueous and organic fractions, respectively. Results showed that the concentration of particle formed material collected in Córdoba was significantly higher than in Río Ceballos, probably due to differences in the intensity of vehicle traffic in both cities. It was also observed that the dimethylsulphoxide had a significant effect on the formation of micronuclei, which could mask the results of the assay for the organic fraction. In the aqueous fraction, the frequency of micronuclei in both sampling sites was significantly higher, in their genotoxic capacity concerning the spontaneous formation of micronuclei.

Keywords: Particulate material, genotoxicity, *Tradescantia pallida*, micronuclei assay.

Recepción: 03/03/08. Revisión: 07/04/08. Aprobación: 30/04/08.

INTRODUCCIÓN

En los ambientes urbanos existe una gran variedad de compuestos contaminantes emitidos por fuentes estacionarias y móviles. Entre ellos, las partículas atmosféricas constituyen uno de los contaminantes atmosféricos más importantes, debido a que contienen compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y sus derivados, metales pesados, óxidos de azufre y de nitrógeno (Barale *et al.*, 1991; Pope *et al.*, 2002; Guimaraes *et al.*, 2000). La mayoría de estos compuestos, una vez emitidos al aire, condensan y son adsorbidos sobre las superficies de partículas de hollín y cenizas, de este modo se trasladan e ingresan a los pulmones de animales y seres humanos. Al respecto, estudios recientes han demostrado que los HAPs pueden interactuar con las cadenas de ADN, provocando un incremento en los errores durante la mitosis y hasta muerte celular (Calderón-Segura *et al.*, 2004).

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que el incremento en la exposición a partículas atmosféricas puede provocar un aumento en la morbilidad y mortalidad del hombre (Schwartz *et al.*, 1996). La mayor parte de los efectos adversos del MP se producen por la presencia de partículas cuyo diámetro es inferior a 10 μm (PM_{10}) ya que, por su tamaño, pueden penetrar más profundamente en el tracto respiratorio e incluso llegar a depositarse en los alvéolos pulmonares. Más aún, estudios recientes demuestran que existen efectos adversos producidos por acción de MP a niveles que es frecuente encontrar en ambientes urbanos (Pope *et al.*, 2002; Health Effects Institute, 2004).

Por otro lado, si bien existe gran cantidad de información respecto a la genotoxicidad del material particulado, la mayoría

de estos estudios se ha realizado en ciudades de Estados Unidos y Europa (Crebelli *et al.*, 1995; Viras *et al.*, 1991; Isidoro *et al.*, 2003). Por este motivo, sus conclusiones pueden no ser válidas en el contexto de ciudades latinoamericanas que poseen características climáticas, geográficas y socioeconómicas considerablemente diferentes. Así, el monitoreo de genotoxinas en el ambiente debería ser primordial en las políticas de salud de los países en vías de desarrollo para establecer medidas de prevención o mitigación de los efectos provocados por estos compuestos.

Desde hace algunas décadas, diversas especies de plantas superiores, musgos y líquenes se emplean como bioindicadores de contaminación ambiental, dado que estos organismos brindan información acerca de la respuesta de un individuo no sólo frente a un contaminante en particular durante un cierto periodo de tiempo, sino también frente a otras variables climáticas, meteorológicas y otros contaminantes que pueden presentar interacción entre sí (Seaward, 1995).

Entre las especies empleadas como biomonitores de compuestos genotóxicos el género *Tradescantia* es uno de los más usados debido a su alta sensibilidad, eficiencia y bajo costo (Batalha *et al.*, 1999; Monarca *et al.*, 1999), además puede ser adaptado para el monitoreo de aire, suelo o agua. Es razonable suponer entonces que, si un contaminante no causa daño detectable a las especies más sensibles, no afectará significativamente a otras especies (Guimaraes *et al.*, 2000). El género *Tradescantia* es empleado para realizar el ensayo de micronúcleos (Trad-MCN), que depende de la extrema sensibilidad de los cromosomas meióticos de algunas especies de *Tradescantia* a sustancias genotóxicas. Estas sustancias rompen la molécula de ADN y generan fragmentos de cromosomas que se asemejan a micronúcleos en las células madres de granos de polen (tétradas) (Falistocco *et al.*, 2000).

Con el objetivo de evaluar la genotoxicidad de extractos orgánicos e inorgánicos de MP recolectado en las ciudades de Córdoba y de Río Ceballos, Provincia de Córdoba, Argentina, se empleó la especie *Tradescantia pallida*, muy bien adaptada al clima de la región, para realizar el ensayo de micronúcleos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

En el presente estudio se seleccionaron dos sitios de muestreo teniendo en cuenta sus características ambientales, principalmente la intensidad de emisiones vehiculares y las condiciones de seguridad disponibles para la ubicación de los equipos muestreadores.

Los sitios de muestreo elegidos fueron, en primer lugar, la ciudad de Córdoba, ciudad capital de la Provincia de Córdoba, con 1.284.532 habitantes; en segundo lugar, la ciudad de Río Ceballos, localizada a 33 km de la ciudad capital, con 16.632 habitantes, según el censo poblacional 2001. Estudios previos realizados en Córdoba demuestran que la principal fuente de emisión de contaminantes a la atmósfera es el tránsito vehicular (Stein y Toselli, 1996).

El primer equipo recolector de MP se montó a 4 m del nivel del suelo, en el edificio de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, ubicada en el microcentro de Córdoba, con una alta intensidad de tránsito vehicular, tanto de vehículos particulares como del sistema de transporte público de pasajeros. El segundo equipo recolector se ubicó en el techo de una vivienda particular (a 3 m del suelo), en una calle secundaria sin pavimentar de la localidad de Río Ceballos. Este sitio tiene muy baja intensidad de tránsito vehicular. Si bien la distan-

cia entre los sitios elegidos supone variaciones en sus condiciones meteorológicas, durante el periodo de muestreo no se registraron diferencias climáticas marcadas.

Muestreo de material particulado

Las muestras de MP fueron recolectadas mediante un equipo de gran volumen (0,2 L/min) con filtros de fibra de vidrio cuya eficiencia es superior al 99% para la retención de partículas totales en suspensión en el ambiente, de diámetro superior a 0,3 μm .

En ambos sitios de muestreo las muestras fueron tomadas entre los meses de septiembre y noviembre de 2007, periodo durante el cual aún no había comenzado la temporada de lluvias. Cada muestreo tuvo una duración de 24 horas. Se tomaron muestras de MP en seis filtros en Córdoba y cuatro en Río Ceballos.

El cálculo de la concentración de MP ($\mu\text{g m}^{-3}$) se realizó a partir de información obtenida gravimétricamente y de variables ambientales presentes en la toma de muestras. Cada muestra se dividió en dos partes que se utilizaron para extraer una fracción orgánica y una acuosa.

Extracción de la fracción orgánica y la fracción acuosa

La extracción de los compuestos orgánicos presentes en el MP recolectado en los filtros se realizó según la técnica descrita por Villalobos-Pietrini *et al.* (2006). Para extraer la fracción orgánica se empleó diclorometano dado que este solvente es frecuentemente empleado para extraer compuestos polares de MP (Marvin y Hewitt, 2007; Vieraira Cononas *et al.*, 2007), que son los de mayor actividad mutagénica (De Martinis *et al.*, 1999). Los filtros fueron sonicados dos ve-

ces durante 30 minutos, con 60 mL de diclorometano. Posteriormente el extracto se filtró y secó a temperatura ambiente y luego fue resuspendido con el mismo volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) para realizar la exposición de los brotes de *T. pallida*.

La extracción de la fracción acuosa se realizó de manera similar a la de la fracción orgánica, utilizando agua destilada como solvente de extracción. El volumen final extraído (120 mL) fue empleado directamente para realizar los ensayos de genotoxicidad.

Ensayo de genotoxicidad

Para analizar la capacidad genotóxica de cada una de las fracciones extraídas se empleó el ensayo de micronúcleos (Trad-MCN) con la especie *Tradescantia pallida* Rose.Hunt. cv. *purpurea* Boom.

Se recogieron brotes con inflorescencias jóvenes de *T. pallida* y se colocaron en vasos de precipitados con solución nutritiva (Solución de Hoagland) por 24 h para su aclimatación. Luego, se expusieron a los extractos obtenidos del MP durante 6-8 h y finalmente se colocaron en agua por 24 h para su recuperación. Todas las etapas se realizaron con aireación del líquido en el que estaban sumergidos los brotes. Una vez finalizada la exposición, los brotes fueron colocados en solución fijadora. Los brotes sólo pudieron ser analizados después de 3 días de la fijación para asegurar que el material estuviera completamente deshidratado, blando y en condiciones de montar el preparado fácilmente. Para cada muestra y cada fracción se utilizaron 30 brotes de *T. pallida*, aunque en reiteradas ocasiones los brotes no presentaban células en estadio de tétradas.

Se realizaron además exposiciones con los solventes de los extractos (DMSO y agua) que se utilizaron como blancos de exposición. La exposición en agua fue considerada

control negativo; como control positivo los brotes fueron expuestos en cloroformo.

Ensayo de micronúcleos

Para realizar el ensayo de micronúcleos se siguieron los protocolos establecidos por la bibliografía (Ma *et al.*, 1994). Con las inflorescencias fijadas de *T. pallida* se realizaron preparados tiñendo con acetocarmín a fin de determinar los estadios de tétradas tempranas en las células madres de granos de polen mediante microscopía (400x). Se analizaron 300 tétradas por cada preparado. Los resultados se expresaron como frecuencia de micronúcleos (MCN) por cada 100 tétradas (Formin y Hafner, 1998).

Análisis estadístico

Luego del análisis microscópico, se eliminaron los datos anómalos de cada muestra a $p < 0,05$ utilizando la distribución de T de Student. Todos los valores son expresados como medias \pm desviación estándar. La normalidad de los datos fue analizada por el Test de Shapiro Willks. Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos sitios monitoreados y entre fracciones de extracción se realizó un ANOVA seguido de un *test* paramétrico de comparaciones múltiples propuesto por Fisher (LSD Fisher - InfoStat/P, 2001) con $p < 0,05$.

RESULTADOS

La caracterización y comparación de los dos sitios de muestreo comienza al medir la concentración de material particulado en cada uno de ellos. En la Figura 1 se observa que la concentración media de MP es significativa-

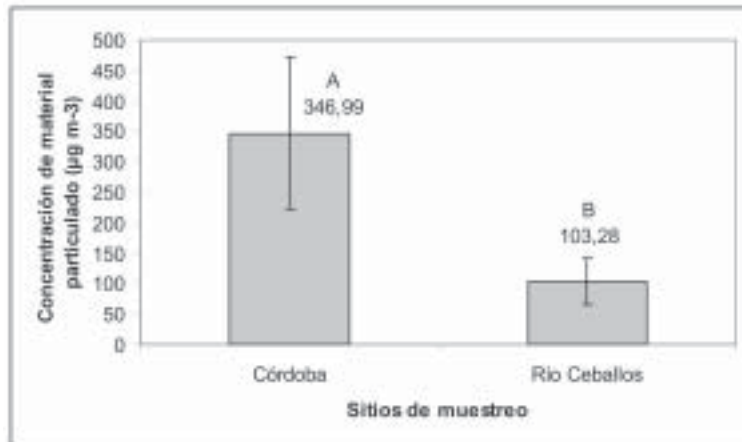


Figura 1. Concentración de material particulado, recolectado en las ciudades de Córdoba y Río Ceballos (Córdoba, Argentina), entre los meses de septiembre y noviembre del año 2007.

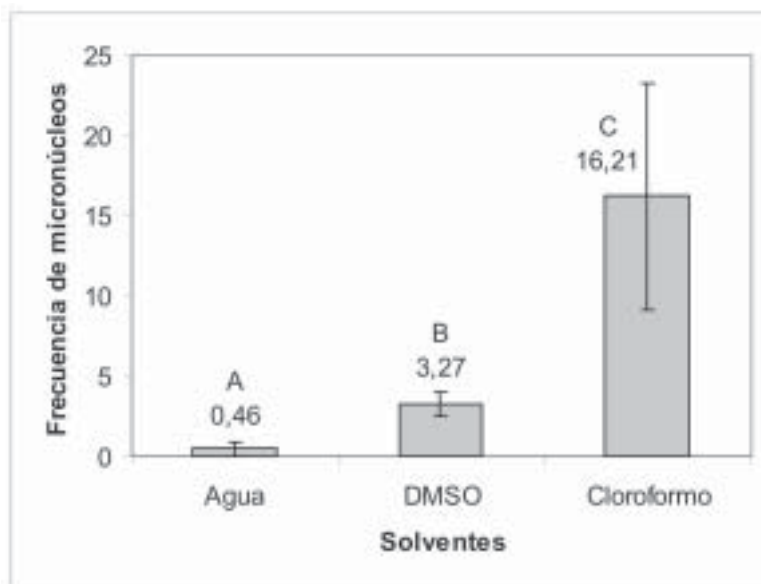


Figura 2. Frecuencia de micronúcleos determinada en muestras de *T. pallida* expuestas en solventes empleados como control.

mente diferente y mayor en el microcentro de Córdoba que en Río Ceballos.

La comparación de los efectos provocados por los solventes utilizados como control en la formación de micronúcleos mostró diferencias significativas (Fig. 2). Las fre-

cuencias de MCN espontáneas en *T. pallida* correspondió al tratamiento con agua; más aun los valores encontrados fueron menores a las mencionadas en otros estudios (Mornarca *et al.*, 1999; Formin y Hafner, 1998; Carvalho-Oliveira *et al.*, 2005). La mayor

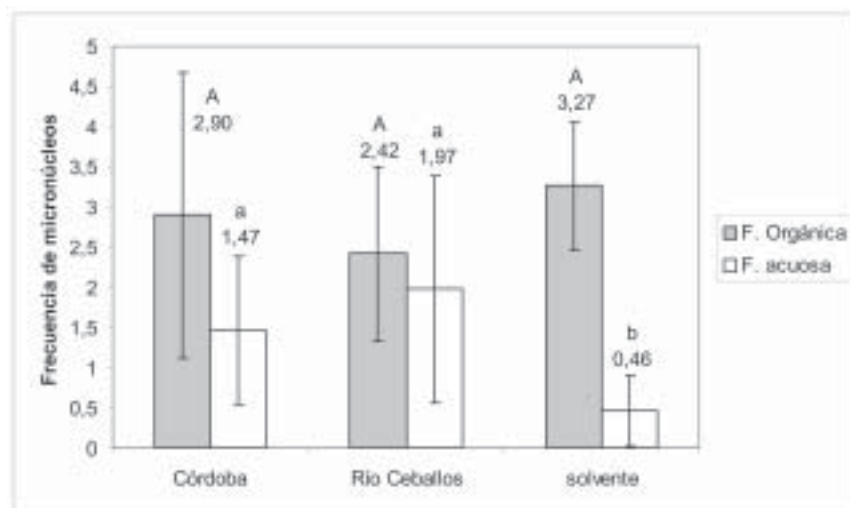


Figura 3. Frecuencia de micronúcleos determinada en la fracción orgánica y fracción acuosa del MP recolectado en Córdoba y Río Ceballos. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas en la fracción orgánica y las minúsculas, en la fracción acuosa.

genotoxicidad fue observada en las muestras que estuvieran expuestas a cloroformo, validando así la sensibilidad de este ensayo con *T. pallida*. Por último, el tratamiento con DMSO mostró valores significativamente diferentes a los encontrados en el tratamiento con agua, lo cual indica que este solvente tuvo efectos genotóxicos en los brotes *T. pallida*.

En la Figura 3 se presentan y comparan los datos obtenidos en el ensayo de micronúcleos con las fracciones acuosa y orgánica, para ambos sitios de muestreo. En la fracción orgánica, los sitios de muestreo no presentan diferencias significativas en las frecuencias de MCN con respecto al control con DMSO, mientras que la frecuencia de MCN correspondiente a la fracción acuosa mostró que Córdoba y Río Ceballos tuvieron un efecto significativamente diferente y mayor al control con agua.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En base a los niveles significativamente superiores de MP colectados en la ciudad de Córdoba, fue posible suponer una mayor concentración de compuestos potencialmente genotóxicos en esta ciudad. Sin embargo, el hecho de que la exposición en DMSO haya provocado un efecto significativo en la frecuencia de MCN no permitió comprobar esta hipótesis, ya que podría estar produciendo un enmascaramiento que interferiría en la correcta diferenciación de los sitios de muestreo.

En cuanto al tratamiento con agua, el MP colectado en ambos sitios de muestreo mostró niveles de genotoxicidad similares pero significativamente mayores al solvente control. Este resultado sugiere que los extractos acuosos podrían contener compuestos con capacidad genotóxica. Estudios previos han

demostrado que extractos conteniendo óxidos de azufre tuvieron capacidad genotóxica en ensayos con *T. pallida* (Guimaraes *et al.*, 2000).

Aunque los dos sitios de muestreo son diferentes en cuanto a sus características poblacionales y de actividad, sólo se manifestaron de distinta forma en la concentración de MP. En los análisis de genotoxicidad, Córdoba y Río Ceballos presentaron consecuencias iguales significativamente.

Para futuros estudios con esta especie de *Tradescantia* se propone utilizar soluciones más diluidas de DMSO y estandarizar los métodos de recolección de brotes, a fin de disminuir la variabilidad de la respuesta de la planta a las exposiciones.

Con el fin de complementar la información obtenida del ensayo de genotoxicidad, se está trabajando actualmente en la realización de un análisis físico-químico del MP. Para esto sería muy conveniente contar con estaciones de monitoreo en los sitios de muestreo que registren concentraciones de sustancias genotóxicas ambientales y otros parámetros. La combinación de monitoreo con plantas *T. pallida* y de análisis físico-químicos suministrarán información detallada sobre el potencial genotóxico de la contaminación ambiental del aire en extensas zonas, sobre los riesgos de salud asociados con agentes mutagénicos y sobre las sustancias responsables de los efectos genotóxicos (Klumpp *et al.*, 2005).

REFERENCIAS

BARALE R, GIROMINI L, GHELARDINI G, SCAPOLI C, LOPRIENO N, PALA M, VALERIO F y BARRAI I (1991), Correlations between 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and the mutagenicity of the total PAH fraction air particles in La Spezia (Italy). *Mutation Research* 249:227-241.

BATALHA JRF, GUIMARAES ET, LOBO DJA,

LICHTENFELS AJFC, DEUR T, CARVALHO HA, ALVES ES, DOMINGOS M, y RODRIGUES GS (1999), Exploring the clastogenic effects of air pollution in Sao Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutation Research* 426:229-232.

CALDERÓN-SEGURA ME, GÓMEZ-ARROYO S, VILLALOBOS-PIETRINI R, BUTTERWORTH FM y AMADOR-MUÑOZ O (2004), The effects of seasonal weather on the genotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutation Research* 558:7-17.

CARVALHO-OLIVEIRA R, POZO RMK, LOBO DJA, LICHTENFELS AJFC, MARTINS-JUNIO HA, BUSTILHO JOWV, SAIKI M, SATO IM y SALDIVA PHN (2005), Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil. *Environmental Research* 98:1-7.

CREBELLI R, FUSELLI S, BALDASSARRI LT, ZIEMACKI G, CARERE A, y BENIGNI R (1995), Genotoxicity of urban air particulate matter: correlations between mutagenicity data, airborne micropollutants and meteorological parameters. *International Journal of Environmental Health* 5:19-34.

DE MARTINIS BS, KADO NY, CARVALHO LRF, OKAMOTO RA, y GUNDEL LA (1999), Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from Sao Paulo, Brazil. *Mutation Research*. 446:83-94.

FALISTOCCO E, TORRICELLI R, FERETTI D, ZERBINI I, ZANI C y MONARCA S (2000), Enhancement of micronuclei frequency in the *tradescantia* /micronuclei test using a long recovery time. *Hereditas* 133: 171-174.

FOMIN A, Y HAFNER C (1998), Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with *Tradescantia* micronucleous bioassay. *Mutation Research* 414: 139-148.

GUIMARAES ET, DOMINGOS M, ALVES ES, CALDINI JR N, LOBO DJA, LICHTENFELS AJFC y SALDIVA PHN (2000), Detection of the genotoxicity of air

- pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental and Experimental Botany* 44:1-8.
- HEALTH EFFECTS INSTITUTE, 2004. Health effects of outdoor air pollution in developing countries of Asia: a literature review. Special Report 15. Boston: Health Effects Institute.
- ISIDORI M, FERRARA M, LAVORGNA M, NARDELLI A, Y PARRELLA A (2003), In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the Tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere* 52:121-126.
- KLUMPP A, ANSEL W, KLUMPP G, CALATAYUD V, GARREC JP, HE S, PEÑUELAS J, RIBAS A, RO-POULSEN, H, RASMUSSEN S, SANZ MJ y VERGNE P (2006), Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environmental Pollution* 139:515-522.
- MATH, CABRERA GL, CHEN R, GILL BS, SANDHU SS, VANDENBERG AL, y SALAMONE MF (1994), Tradescantia micronucleus bioassay. *Mutation Research* 310:221-230.
- MARVIN CH, y HEWITT LM (2007), Analytical methods in bioassay directed investigations of mutagenicity or air particulate material. Review in *Mutation Research*. 636:4-35.
- MONARCA S, FERETTI D, ZANARDINI A, FALISTOCCO E, y NARDI G (1999), Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutation Research* 426:189-192.
- POPE CA, BURNET RT, THUN MJ, CALLEE, KEWSKI D, ITO K y THURSTON GD (2002), Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med. Assoc.* 287:1132-1141.
- SCHWARTZ J, DOCKERY DW y NEAS LM (1996), Is daily mortality associated specifically with fine particles? *Journal of the Air & Waste Management Association* 46:927-939.
- SEAWARD MRD (1995), Use and abuse of heavy metals bioassay in environmental monitoring. *Science of the Total Environment* 176:129-134.
- STEIN AF Y TOSELLI BM (1996). Street level air pollution in Córdoba city, Argentina. *Atmospheric Environment* 30:3941-3945.
- VIERAIRA CORONAS M, HORN RC, DUCATTIA, VAZ ROCHA J, y FERRAO VARGAS VM (2007), Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2008, 650:196-201.
- VILLALOBOS-PIETRINI R, AMADOR-MUÑOZ O, WALISZEWSKI S, HERNÁNDEZ-MENA L, MUNIVÉCOLÍN Z, GÓMEZ-ARROYO S, BRAVO-CABRERA JL y FRÍAS-VILLEGAS A (2006), Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10\mu\text{m}$ in southwest Mexico City. *Atmospheric Environment* 40:5845-5857.
- VIRAS, L.G., SISKOS P.A., SAMARA C., KOUIMTZIS T., ATHANASIOU K., y VAVATZANDIS A., 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagens in ambient air particles sampled in Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment* 10: 999-1007.