

# Avances recientes en toxicología de partículas y nanopartículas: Una revisión de los estudios *in vivo* e *in vitro*

Abderrahim Nemmar,<sup>1</sup> Jørn A. Holme,<sup>2</sup> Irma Rosas,<sup>3</sup>  
Per E. Schwarze,<sup>2</sup> and Ernesto Alfaro-Moreno<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, College of Medicine and Health Sciences, United Arab Emirates University, Al Ain 17666, UAE

<sup>2</sup> Department of Air Pollution and Noise, Norwegian Institute of Public Health, N-0403 Oslo, Norway

<sup>3</sup> Aerobiology Laboratory, Atmospheric Sciences Center, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, DF, Mexico

<sup>4</sup> Environmental Toxicology Laboratory, Instituto Nacional de Cancerología, México. Avenida San Fernando 22, Tlalpan, 14080 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Ernesto Alfaro-Moreno; ealfaro.incan@gmail.com

Received 7 March 2013; Revised 8 May 2013; Accepted 22 May 2013

Academic Editor: Tim Nawrot

Copyright © 2013 Abderrahim Nemmar et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Estudios epidemiológicos y clínicos han relacionado la exposición a partículas (PM) con efectos negativos para la salud, que pueden estar relacionados con el aumento de mortalidad y morbilidad por diversas enfermedades cardiopulmonares. Pese a las pruebas que relacionan las PM con efectos para la salud, los mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares que causan tales efectos aún no están plenamente identificados. Dos principales enfoques se utilizan para dilucidar los mecanismos de toxicidad. Uno es el uso de modelos experimentales *in vivo*, donde se analizan varios efectos de PM en los sistemas respiratorio, cardiovascular y nervioso. Para examinar más de cerca los procesos moleculares y celulares más allá de los diferentes efectos fisiológicos, el uso de varios modelos *in vitro* ha demostrado ser de utilidad. En el presente ensayo, analizamos los avances actuales sobre toxicología de materia particulada y nanopartículas basados en estas técnicas.

## 1.- Introducción

La exposición a las partículas (PM) está asociada con el aumento de visitas a las salas de urgencias y del aumento de la mortalidad [1]. La niebla del valle del Mosa de 1930 [2], el incidente de niebla tóxica de Donora de 1948 [3], y el gran suceso de niebla tóxica de Londres de 1952 [4] desencadenaron el estudio de los efectos en la salud a la exposición a las PM en las grandes ciudades y, más tarde, la legislación relativa a los límites de nivel de PM. Por ejemplo, en los Estados Unidos, la Ley de Aire Limpio se decretó en 1972.

Las partículas inhaladas penetran en el tracto respiratorio donde se dirigen a diferentes puntos anatómicos, dependiendo entre otras propiedades del tamaño aerodinámico. Las partículas se clasifican según su tamaño aerodinámico, PM<sub>10</sub>, partículas torácicas ( $\leq 10 \mu\text{m}$ ) y PM<sub>2.5</sub> ( $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ), o de fracción fina. Las partículas con un rango de tamaño aerodinámico entre 10 y 2,5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>10-2,5</sub>) se conocen como de fracción gruesa. Si el tamaño aerodinámico es igual o menor que 0.1  $\mu\text{m}$ , las partículas se denominan partículas ultrafinas (UFP), y una de las fuentes principales de este tipo de partículas primarias son los escapes de diesel (DEP). Las partículas de ingeniería, medidas por su

tamaño geométrico y con al menos una dimensión menor que  $0.1 \mu\text{m}$ , se conocen como nanopartículas (NP) [5]. Se resume el objetivo anatómico principal de las partículas con sus diferentes tamaños en la imagen 1.

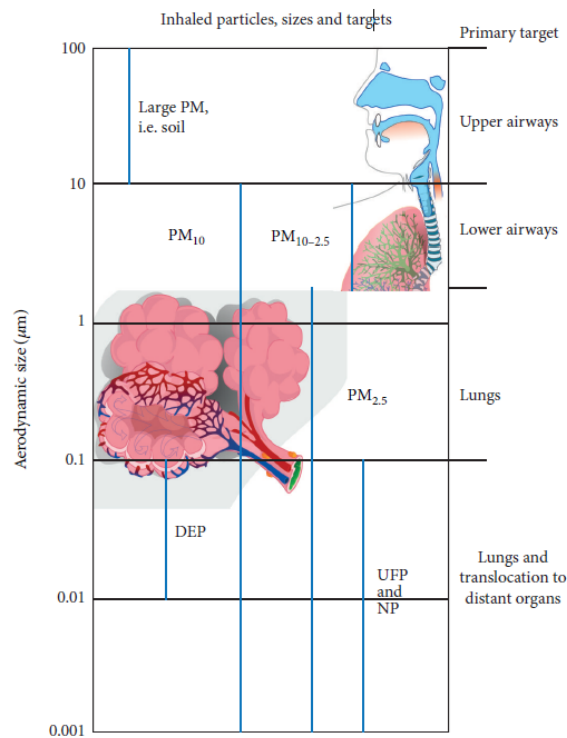


Imagen 1- esquema del tamaño y principales objetivos del material particulado y nanopartículas

Normas sobre la Calidad del Aire han sido adoptadas por muchos países de todo el mundo para proteger la salud pública y el bienestar de la gente de los efectos adversos de la contaminación atmosférica. De hecho, países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han adoptado una constitución que establece las directrices sobre los contaminantes en el aire.

La OMS, que cuenta con una representación de casi 200 países, recomienda que las concentraciones diarias de  $\text{PM}_{10}$  no superen los  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  [6]. Sin embargo, muchos países han optado por establecer normas de Calidad del Aire que sean más o menos rigurosas que las normas de la OMS. Normas sobre la Calidad del Aire se crean o revisan de acuerdo con la política nacional y la información científica que demuestre la asociación plausible entre las enfermedades relacionadas con la salud y la exposición a contaminantes. Los límites para  $\text{PM}_{10}$  y  $\text{PM}_{2.5}$  que se utilizan en diferentes países y regiones se muestran en la Tabla 1 (Modificada de [6]).

A pesar de todos los esfuerzos para medir el impacto en la salud que supone inhalar materia particulada, aún estamos lejos de comprender completamente todos los efectos y mecanismos relacionados con éstos, y tampoco entendemos aún qué papel desempeña la longitud (tamaño), forma y composición de las partículas en sus efectos biológicos. En el presente documento, examinamos la información pertinente relativa a tres aspectos principales del problema: 1) la determinación y función de los componentes biológicos y químicos de las partículas, (2) la evaluación de los efectos in vivo, tanto de los objetivos pulmonares como sistémicos, y (3) la evaluación de los mecanismos de los efectos celulares de partículas con diferentes tamaños, formas y composición. Entre la gran

cantidad de artículos que se publican sobre estos temas, elegimos aquellos que creemos ayudan a entender los diferentes problemas y también esos artículos que generan nuevas preguntas, llevando los límites de nuestro conocimiento más allá.

## 2.- Caracterización de partículas

Partículas de combustión de combustibles tradicionales (biomasa, carbón, madera, petróleo crudo y diesel con alto contenido en azufre) se encuentran ahora en concentraciones mucho más bajas en el aire que hace 30-40 años gracias a tecnologías mejoradas y más limpias. La distribución del tamaño relativo ha cambiado, y otros contaminantes, tales como el PM ultrafino (UFP)[7] han ganado prominencia. Este nuevo y más ligero PM se encuentra no sólo en grandes ciudades, sino también en pueblos grandes y pequeños. Destaca que difieren en su composición respecto a diversos metales pesados y a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y a menudo poseen mayor potencial oxidativo y tóxico.

Dependiendo de la fuente y de la composición de los PM, diferentes subconjuntos de componentes pueden encontrarse en diferentes fracciones. PM2.5 comprende la fracción de hollín y de las partículas cultivadas a partir de fase gaseosa con la consiguiente aglomeración. PM2.5 incluye iones inorgánicos tales como sulfato, nitrato, y amoníaco, así como combustión de carbono, aerosoles orgánicos, metales y otros productos de combustión. PM10-2,5 está dominado por partículas mecánicamente desgastadas o molidas que incluyen minerales finamente divididos tales como óxido de silicato de aluminio, hierro, calcio y potasio [8].

Tabla 1: Comparativa de las directrices y normas de la OMS y diversos países. Modificado a partir de las directrices de calidad del aire de la OMS, actualización mundial, 2005, un informe sobre una reunión del Grupo de Trabajo, Bonn, Alemania, 18-20 de octubre de 2005[5].

| Selected air quality guidelines and standards         |                        |                 |    |    |
|---|------------------------|-----------------|----|----|
| Source  | PM ( $\mu^3 \mu^3$ )   |                 |    |    |
|   | 10 g/m ) PM2.5 ( g/m ) |                 |    |    |
|   | 1 year 24 hours        | 1 year 24 hours |    |    |
| European Union  | 40                     | 50              | 25 |    |
| United States   | 50                     | 150             | 12 | 35 |
| California  | 20                     | 50              | 15 | 65 |
| Japan   |                        | 100             | 12 | 65 |
| Brazil  | 50                     | 150             |    |    |
| Mexico  | 50                     | 120             | 15 | 65 |
| South Africa  | 60                     | 180             | 15 | 65 |
| India (sensitive populations/ residential/industrial) | 50/60/120              |                 |    |    |
| China   | 40/100/150             | 50/150/250      |    | 35 |
| (Classes I/II/III)                                    |                        |                 |    |    |

Los UFPs están compuestos tanto de partículas primarias como secundarias [9]. La fracción primaria es la que se emite directamente desde las fuentes de emisión y a menudo incluye aglomerados/agregados de partículas más pequeñas [9]. Su tamaño se encuentra generalmente entre 30 y 100 nm [10, 11]. La fracción primaria está asociada a los motores y automóviles diesel y a la combustión de biomasa que se cree que se emiten alrededor de los 30 nm de diámetro (el llamado modo de nucleación) para luego coagularse en la mayor fracción del modo ultrafino. La fracción secundaria se compone de partículas formadas en la atmósfera e incluye ácido sulfúrico, sulfatos y productos de reacción orgánica de baja volatilidad [9]. Fotorreacciones de óxidos de nitrógeno (NOx) y dióxido sulfúrico (SO<sub>2</sub>) participan en este proceso; ambos productos lo son de combustión. El tamaño de fracción se encuentra generalmente en el rango entre 100 y 200 nm, lo que permite se distinga en parte de otras fuentes antropogénicas.

Diferentes autores han explorado el papel de la composición en los efectos tóxicos durante la última década. El dogma en los 90 era que el tamaño de la partícula era el principal factor de toxicidad, siendo las partículas más pequeñas las más tóxicas [12]. Sin embargo, durante los últimos 15 años, las pruebas han relacionado la superficie, la reactividad y los diferentes componentes de las partículas con su toxicidad [13-15]. Los primeros análisis se realizaron mediante la recolección de muestras de diferentes fuentes tanto en el interior como en el exterior [16], diferentes ciudades [17], o regiones dentro de una gran ciudad [18] y comparando sus efectos tóxicos *in vitro*. En algunos casos, las tipificaciones químicas parciales o determinación de presencia de algunos componentes se relacionaban empíricamente con diferencias en la intensidad de esos efectos tóxicos [19-21]. Más tarde, tipificaciones exhaustivas se correlacionaron utilizando diferentes modelos estadísticos [13- 15]. Actualmente, la tipificación del tamaño, composición físico-química, y química es necesaria para comprender la toxicología de las partículas. Por ejemplo, para las nanopartículas (NP), es obligatorio determinar el tamaño de las partículas, la dinámica de la aglomeración y agregación, el área y la carga para cualquier evaluación toxicológica [22]. En el campo de las partículas urbanas, y teniendo en cuenta que se trata de mezclas complejas, no hay mediciones estándar de los componentes fisicoquímicos y químicos, sino la identificación del carbono total, carbono negro, metales de transición, nitratos, sulfatos, oxidantes y los hidrocarburos aromáticos policíclicos que se encuentran entre los principales componentes más evaluados [23, 24]. Un informe reciente que evalúa el carbono elemental, la materia orgánica de carbono, sulfato y nitrato en PM<sub>2.5</sub> y su relación con los ingresos hospitalarios demuestra que los cambios en el contenido de carbono elemental están asociados con ingresos hospitalarios por problemas cardiovasculares [25]. Los autores concluyen que una comunicación más estrecha entre los evaluadores de riesgos y los epidemiólogos ayudaría a comprender la influencia de los componentes de los contaminantes atmosféricos en la población.

Entre los muchos componentes que están presentes en PM, los componentes biológicos juegan un papel fundamental en los efectos biológicos. Cada vez hay más pruebas que demuestran que cuando se inhala PM, el componente biológico es el responsable de estimular los macrófagos alveolares y el tejido epitelial respiratorio para liberar citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Los componentes biológicos también pueden tener efectos sinérgicos con otros componentes del PM, tales como escapes de gasóleo que aumentan la producción de IgE y facilitar así la sensibilización alérgica [26].

Estos componentes biológicos pueden proceder de mecanismos pasivos o activos de plantas, tierra, biofilms, fuentes sólidas o líquidas y que se suspenden en el aire. La medición de proteína asociada con el PM se considera indicador de cuánta PM procede de sustancia biológica. Representa alrededor del 1-4% de la masa total de PM10 para zonas urbanas y rurales [27, 28].

Partículas biológicas suspendidas en el aire o polvo con agentes biológicos y/o sustancias de origen biológico son componentes a destacar del PM grueso y fino. Estos componentes están presentes en diferentes tipos de aerosoles biológicos primarios o secundarios (células biológicas fragmentadas) [29]. La materia biológica está compuesta predominantemente de polen, esporas y microorganismos de las plantas (moho y bacterias) o microbialmetabolitos [30, 31] y está relacionado con la alergia, respuestas tóxicas e infecciosas en individuos bajo exposición.

El PM puede transportar eficazmente alérgenos secundarios o compuestos proinflamatorios [32-34]. Recientemente, se ha encontrado correlación para los principales alérgenos, principalmente entre polen y pacientes asmáticos. De hecho, se ha encontrado polen de hierba, hierbajos y árboles, entre otros, en diferentes tamaños de partículas [35]. La mayoría de los alérgenos primarios (polen intacto, 10-100  $\mu\text{m}$ ) no puede llegar a las vías respiratorias pequeñas; sin embargo, los alérgenos secundarios del polen presentes en PM2.5 sí pueden fácilmente acceder [36].

Los lipopolisacáridos de endotoxina (LPS) son otros compuestos proinflamatorios de origen microbiano presentes en PM. La endotoxina es un componente de la pared celular de las células gramnegativas y su principal fuente son los residuos depositados en el suelo urbano y rural. Cuando el LPS es resuspendido e inhalado, se estimulan los macrófagos alveolares y el tejido epitelial respiratorio para liberar citoquinas/quimiocinas, iniciando un proceso inflamatorio [37, 38]. Otro componente biológico con efectos similares es el  $\beta$ -1,3-Glucan, un polímero de glucosa que es el componente estructural de la mayoría de las paredes celulares de los hongos.  $\beta$ -1,3-Glucan se ha utilizado como indicador de la presencia de moho [39, 40].

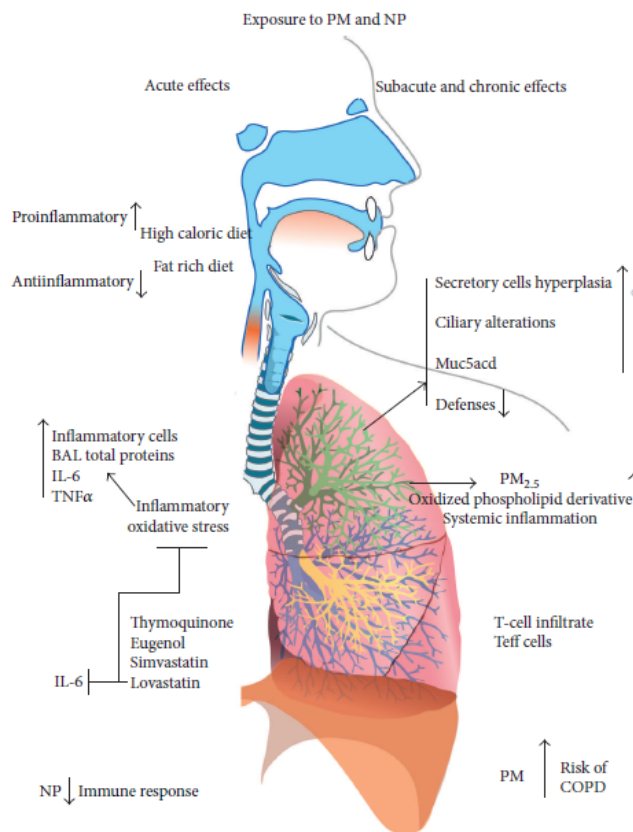


Imagen 2: Esquemización de los principales efectos agudos, subagudos y crónicos inducidos por la inhalación de partículas y nanopartículas. Respecto a los efectos agudos, es interesante destacar que una dieta rica en calorías y grasas favorece los efectos proinflamatorios de las partículas. También, el Tymoquinone, eugenol, simvastatin, y lovastatin tienen efectos protectores *in vivo*. Respecto a los efectos subagudos y crónicos, cabe destacar la presencia de alteraciones de tejido, filtración pulmonar de células T y aumento del riesgo de EPOC.

### 3.- Estudios *In Vivo*

El objetivo principal de las partículas inhaladas es el sistema respiratorio, pero hay pruebas sólidas de que pueden causar efectos sistémicos. Presentamos algunos de los estudios más relevantes en cuanto a los efectos locales y sistémicos causados por la inhalación de partículas. En la imagen 2, resumimos algunos de los más relevantes efectos agudos, subagudos y crónicos relevantes que provocan las partículas *in vivo*.

#### 3.1. Efectos Respiratorios de las Partículas

**3.1.1. Efectos Agudos.** Varios estudios han investigado los efectos respiratorios causados por la contaminación atmosférica y las nanopartículas. Si bien la mayoría de los estudios se han centrado en los efectos respiratorios tras la inhalación, instilación intratraqueal o intranasal, otros han investigado los efectos por administración intravenosa, intraperitoneal u oral.

Es bien sabido que la exposición pulmonar a la contaminación causa inflamación y estrés oxidativo [41–43]. Se ha demostrado que las partículas de escape de gasóleo (15-30  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) que llegan a la zona intratraqueal causan inflamación pulmonar que se caracteriza por la presencia de células inflamatorias, aumenta las proteínas totales, un marcador de permeabilidad epitelial, y estrés oxidativo [41, 42]. La liberación de

interleuquina-6 (IL-6) vino a demostrar que aumentaba el líquido de lavado broncoalveolar (BAL) a las 18h pero no a las 4 o 24h [42]. Pretratamiento con timoquinona, un constituyente de *Nigella sativa*, mejoró los efectos pulmonares inducidos por la DEP[42].

La exposición aguda (24 h) de ratones sanos por vía intranasal a PM<sub>2.5</sub> (5 o 15  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) según datos recogidos en el área urbana de Sao Paulo causa inflamación pulmonar y estrés oxidativo y empeoramiento de la impedancia pulmonar [44]. El mismo grupo de investigación ha informado recientemente que el pretratamiento de ratones con eugenol, un componente de metoxifenol del aceite de clavo con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, evitó los cambios en la mecánica pulmonar, inflamación pulmonar y colapso alveolar provocado por exposición aguda al DEP[45].

Las estatinas son inhibidores de la reductasa de hidroximetil-glutaril-CoA, ampliamente utilizados en el tratamiento de la hiperlipidemia. Desempeñan un papel clave en la prevención primaria y secundaria de enfermedad cardiaca aterosclerótica y apoplejía. De hecho, se ha indicado que tienen beneficios potenciales sobre una gran variedad de enfermedades cardiovasculares y no cardiovasculares, entre ellas cáncer, trastornos respiratorios y neurológicos [46, 47]. Cabe mencionar que Ferraro y sus colaboradores [48] informaron que los residuos de cenizas volátiles de petróleo (ROFA) y partículas de aire urbano (UAP) en Buenos Aires producen lesión pulmonar aguda en ratones, lo que se traduce en inflamación neutrófica, aumento de O<sub>2</sub> y producción de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Pretratamiento con simvastatina no tuvo un efecto significativo pero previno la citotoxicidad pulmonar y la inflamación inducida por la ROFA y la UAP. Más recientemente, Miyata y sus colaboradores [49] indicaron que la exposición pulmonar a PM<sub>10</sub> en conejos aceleró el volumen de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) acortando su tiempo de tránsito en la médula. Destacan también que la lovastatina atenúa estas respuestas sistemáticas disminuyendo los niveles de PM<sub>10</sub>- mediadores de circulación inducidos (IL-6), suprimiendo de este modo la estimulación de la médula ósea. El efecto de las estatinas predomina en los PMNs del pool postmitótico, como lo demuestra el uso de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU/G3). Asimismo, las estatinas también redujeron la retención de estos recién liberados PMNs en los tejidos pulmonares. Estos resultados corroboran el hallazgo previo del mismo grupo de investigación que indican que las partículas PM<sub>10</sub> inducen respuestas inflamatorias sistemáticas que se caracterizan por un aumento en la producción de proinflamatorios sistémicos, mediadores tales como IL-6[50].

El metabolismo de la L-arginina desempeña una importante función homeostática en las vías respiratorias, a través de la combinación de la molécula broncodilatadora, óxido nítrico (NO). La arginasa (arginasas 1 y 2) convierte la L-arginina en lornitina y urea y así compite con las isozimas NOS por el sustrato. La sobreexpresión de arginasa contribuye a la hiperreactividad de las vías respiratorias al asma, siendo aún mayor en los asmáticos fumadores [51]. Recientemente se ha indicado que la arginasa aumenta la exposición al O<sub>3</sub> y concentra las partículas de ambiente en modelos murinos de asma y contribuye a la exacerbación inducida por la contaminación de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias[52].

Götz y sus colaboradores han analizado la cuestión sobre si un desafío dietético aumenta o no la respuesta inflamatoria en las áreas alveolar y sanguínea ante las nanopartículas de carbono (CNP) [53]. En su estudio, los ratones se alimentan de alto contenido calórico de carbohidratos o de alto contenido de grasas durante seis semanas y se comparan con los ratones alimentados con dieta purificada baja en grasas. Se toman muestras de lavado broncoalveolar (BAL) y de sangre 24 horas después de la instilación intratraqueal y se comprueba la presencia de marcadores de inflamación celulares y moleculares. Los autores informan de un aumento de los factores proinflamatorios BAL en grupos con alto contenido calórico y de reducción en las concentraciones séricas de factores antiinflamatorios en el grupo rico en grasa. Llegaron a la conclusión de que los períodos de alimentación, que manifiestan obesidad, son clave para generar una mayor tendencia a la inflamación pulmonar por partículas inducidas, aunque el desafío de la dieta es eficaz en la conducción de eventos sistémicos proinflamatorios.

Barlow y sus colaboradores [54] evaluaron los efectos del PM10 instilado intratraquealmente, según datos recogidos en Londres sobre la eliminación de macrófagos en ratas *ex vivo*. Estos autores concluyeron que la exposición a PM10 tiene efectos sobre la fagocitosis de los macrófagos y quimiotaxis y puede ser perjudicial para la eliminación de partículas en la zona alveolar del pulmón. La disminución de la capacidad quimiotáctica puede representar un mecanismo que genera inflamación tras el aumento en los niveles ambientales de PM. También concluyeron que está justificada una investigación adicional para determinar los efectos de la exposición crónica al PM10 en los mecanismos de eliminación de macrófagos.

Los PNs conllevan respuestas inflamatorias y estrés oxidativo, pero también pueden tener efectos inmunosupresores, perjudicando la función de macrófago y alterando las funciones de la barrera epitelial. Se ha investigado recientemente sobre si la exposición al PN puede o no aumentar el riesgo de infección pulmonar [55]. Se ha demostrado que la exposición al Cu NP deteriora las defensas contra infecciones bacterianas pulmonares e induce a una disminución de la dosis dependiente en la eliminación bacteriana. Además, se ha demostrado que la exposición aguda a la DEP por inhalación aumenta la inflamación pulmonar inducida por lipopolisacárido [56].

En un estudio, se ha investigado con ratones cómo afecta el impacto de la exposición pulmonar al NP carbono negro en casos de lesión pulmonar producida por la elastasa pancreática porcina [57]. Se ha demostrado que el NP carbono negro aumenta el enfisema y la inflamación pulmonar inducida por EPP. Esta mejora puede ser mediada, al menos en parte, a través del aumento de moléculas proinflamatorias.

Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> cuentan con varias aplicaciones industriales, y, como tal, también tienen diferentes tamaños, formas, química y estructuras cristalinas [58, 59]. El TiO<sub>2</sub> se manifiesta en cuatro polimorfos cristalinos de los cuales el rutilo y la anatasa son los más comunes [60]. El rutilo se considera inerte, mientras que la anatasa es una forma activa de TiO<sub>2</sub>. Las partículas de anatasa y rutilo, a dosis similares de superficie, aumentan la liberación de lactato deshidrogenasa, interleucina-8 y especies de oxígeno reactivas, así como una actividad mitocondrial deprimida en patrones diferentes de células epiteliales humanas cultivadas [61].



*In vivo*, se observó que las partículas ultrafinas de anatasa del TiO<sub>2</sub> aumentan los indicadores de lavado broncoalveolar inflamatorio, la proliferación celular y la histopatología si se compara con las partículas ultrafinas del rutilo [62]. Sin embargo, con ambas partículas, se observaron efectos pulmonares a las 24 horas y resueltos antes de una semana tras la exposición [62]. Además, también se ha demostrado que el nanóxido de TiO<sub>2</sub> de rutilo causó aumento de la inflamación pulmonar y sistémica y aglutinación de plaquetas [63].

La fotocatalisis basada en TiO<sub>2</sub> ha despertado un gran interés por sus grandes ventajas en la mineralización completa de contaminantes orgánicos en las aguas residuales y el aire [64, 65]. Como popular fotocatalizador, el TiO<sub>2</sub> ha sido ampliamente estudiado dados sus diversos méritos, propiedades óptico-electrónicas, bajo coste y estabilidad química. Se pueden modificar las características de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para mejorar su funcionamiento. En este contexto, el nanóxido de TiO<sub>2</sub> se dopa con hierro para aumentar su actividad fotocatalítica [63,64]. Se ha demostrado recientemente que la exposición a las nanopartículas de SiO<sub>2</sub>- de TiO<sub>2</sub> recubiertas de rutilo (cnTiO<sub>2</sub>) causa neurofilia pulmonar, aumenta la necrosis tumoral factor alfa (TNF $\alpha$ ) y la quimiocina que atrae a los neutrófilos CXCL1 en el tejido pulmonar. Rutilo y anatasa no recubiertos, así como el SiO<sub>2</sub> nanoasignado no conllevan inflamación significativa [66]. Más recientemente, la exposición pulmonar al Fe-TiO<sub>2</sub> de rutilo conlleva inflamación pulmonar y sistémica y estrés oxidativo. También acrecienta la función trombótica, la frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica (PAS) e induce la hepatotoxicidad. Además, el Fe-TiO<sub>2</sub> de rutilo muestra toxicidad directa sobre las células cancerosas del pulmón humano NCI-H460-Luc2 y las células humanas de hepatoma HepG2 [67].

**3.1.2. Efectos subagudos y crónicos.** Se ha demostrado que las ratas expuestas durante 6 meses a la contaminación urbana desarrollan hiperplasia celular en las vías respiratorias y alteraciones ciliares ultraestructurales del epitelio de las vías respiratorias, lo que sugiere que la exposición crónica a la contaminación de niveles urbana puede causar alteraciones respiratorias [68]. Además, las ratas sometidas a una exposición prolongada a bajos niveles de contaminación experimentan defensas respiratorias deterioradas frente a agentes infecciosos [69]. Recientemente, se ha informado de que la instilación intranasal de DEP durante más de 60 días incrementa la expresión de muc5ac en los pulmones y el contenido de mucosidad ácida en la nariz comparado con el tratamiento de 30 días. Además, la exposición al DEP mejora el total de leucocitos en BAL y el grosor del epitelio nasal si se compara con la solución de control salina [70].

La exposición crónica a PM<sub>2.5</sub> se traduce en respuestas inflamatorias prominentes en el pulmón caracterizadas por el aumento de los niveles de derivados fosfolípidos oxidados, así como de respuesta sistémica inflamatoria [71]. En un estudio posterior, el mismo grupo ha analizado más aún sus conclusiones y ha informado que la exposición a PM<sub>2.5</sub> aumenta la filtración de células T y la activación de las células T-efectoras (evidenciado por un aumento de las células T CD4+CD44+CD62L- y CXCR3+ en los pulmones) y sugiere el cambio fenotípico a un fenotipo Th1/Th17 en células de teflón pulmonar. Estos resultados tienen importantes implicaciones sobre la forma en que las PM<sub>2.5</sub> pueden modular negativamente respuestas inmunitarias pulmonares y sistémicas [72].

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por la obstrucción no totalmente reversible del flujo de aire que es por lo general progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anormal del pulmón a partículas nocivas o gases. El principal factor etiológico de la EPOC es el estrés crónico oxidativo producido por el tabaquismo a largo plazo, el uso de combustibles de biomasa y la exposición a la contaminación atmosférica [73]. Lopes y sus colaboradores informaron recientemente de un estudio en el que se investigó en ratones los efectos de exposición crónica (2 meses) a niveles ambientales de MP en desarrollo de proteasa (papaína) y que provocaban enfisema y remodelación pulmonar [74]. Detectaron que la intercepción lineal media y la cantidad total de fibras de colágeno en el parénquima eran significativamente mayor en los pulmones de ratones tratados con papaína y expuestos a partículas ambientales frente a los tratados con papaína y expuestos a aire filtrado durante 2 meses. Estos aumentos en destrucción del parénquima pulmonar y del contenido de colágeno pulmonar se observa sólo en el grupo de ratones tratados con papaína y expuestos a las partículas del ambiente asociándose a un aumento de la cantidad de expresión de 8-isoprostano en el tejido pulmonar; esto sugiere que el aumento del estrés oxidativo es un mecanismo probable que explica estas alteraciones [74].

Diferentes tipos de PNs pueden causar diversas reacciones inflamatorias en el pulmón. En los pulmones de los ratones, la toxicidad de nanotubo de carbono de pared simple (SWCNT) que causa granulomas de epitelio e inflamación intersticial entre 7 y 90 días después de la instilación intratraqueal es mayor en comparación con otros NPs, como el carbono negro o partículas de cuarzo [75]. Sin embargo, ha sido objeto de debate científico la importancia de la inflamación SWCNT inducida. Inicialmente se ha indicado que la instilación intratraqueal SWCNT en ratas causa granulomas discretos que no respondieron a la dosis y la ausencia de signos de inflamación en BAL sugiere la posibilidad de que grandes aglomerados de SWCNT causen granulomas [76]. Un segundo estudio en ratas, usando la aspiración SWCNT, también informa de un ligero cambio en los diferenciales BAL y una relativa falta de evidencia histopatológica de inflamación [77]. Estudios en ratones que mostraron inflamación significativa, confirmaron que la inflamación inducida SWCNT era a menudo granulomatosa, y, lo más importante, demostraron que la inflamación estaba presente tanto si la SWCNT era inhalada como aspirada [75, 78]. Se concluye que la inhalación de SWCNT es más efectiva que la aspiración a la hora de causar respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, deposición de colágeno y fibrosis, así como mutaciones de Kras locus genético en el pulmón de ratones C57BL/6[79]. Del mismo modo que el SWCNT, múltiples exposiciones a nanotubos de carbono (MWCNT) por inhalación de concentraciones igual o inferior a 5 mg/m<sup>3</sup> durante 14 días produjo una ligera evidencia de inflamación pulmonar, pero suprimió las funciones inmunitarias dependientes de las células T [80]. Sin embargo, la instilación intratraqueal de MWCNT más cortas no muestra la presencia de inflamación o fibrosis [81]. Recientemente, se ha demostrado que la inhalación de MWCNT durante 13 semanas causa inflamación granulomatosa y engrosamiento pleural en concentraciones de exposición superior a 6mg/m<sup>3</sup>. Sin embargo, la afluencia de células inflamatorias en el líquido BAL y la fibrosis intersticial se muestra en exposiciones superiores a 0,4 mg/m<sup>3</sup>[82].

La inflamación pulmonar causada por la PN también puede generar cambios en la permeabilidad de la membrana, que a su vez puede provocar una translocación de partículas más allá del pulmón y que afecta al sistema cardiovascular [83]. De hecho, se ha demostrado que las PNs tienen el potencial de acceder al cerebro [84], a la circulación de la sangre [85, 86] y posteriormente a otros órganos principales causando inflamación y estrés oxidativo en estos órganos.

### **3.2. Efectos extrapulmonares de las partículas**

**3.2.1. Posibles mecanismos implicados.** A pesar de la consistencia de las observaciones epidemiológicas, los mecanismos fisiopatológicos que vinculan la contaminación atmosférica con problemas cardiovasculares adversos siguen siendo poco claros. Existen tres hipótesis principales que están siendo investigadas para explicar el efecto extrapulmonar de NP [87, 88], y en la Imagen 3, resumimos los principales mecanismos planteados para los efectos sistémicos. El primero relaciona el efecto de las partículas con su capacidad para impactar en el sistema nervioso autónomo. Los estudios demostraron que la exposición a la contaminación está asociada con cambios rápidos en el equilibrio del sistema nervioso autónomo, favoreciendo el sistema nervioso simpático y el retraimiento parasimpático que conduce a cambios en el patrón de respiración, la frecuencia cardíaca y la variabilidad de la tasa cardíaca. La disminución en la variabilidad de la frecuencia cardíaca evidencia la existencia de un estado de disfunción de la autonomía cardíaca y es un factor de riesgo de muerte súbita cardíaca por arritmias [89]. Los mecanismos responsables en el aumento del impulso simpático siguen sin estar claros, pero pueden implicar activaciones de los arcos reflejos neurales pulmonares y efectos directos de los contaminantes en los canales de iones cardíacos [89]. Las partículas inhaladas pueden afectar al sistema cardiovascular a través de mediadores inflamatorios producidos en los pulmones y liberados en la circulación [87,88]. Se informa de que las partículas inhaladas pueden llevar a una respuesta inflamatoria sistémica a través de la liberación de IL-6, TNF $\alpha$  o histamina, y a estrés oxidativo dentro de los pulmones y/o sistémicamente [87, 88].

Además, varios estudios han demostrado que las nanopartículas, debido a su pequeño tamaño, pueden evitar las defensas normales fagocíticas del sistema respiratorio y acceder a la circulación sistémica, además de a diferentes puntos extrapulmonares [85, 86, 90-93]. La UFP puede pasar de los pulmones a la circulación sanguínea en hámsteres [86]. Otros [91-94] también han reportado translocación extrapulmonar de UFPs tras instilación o inhalación intratraqueal en otras especies animales. Sin embargo, la cantidad de UFPs que se translocó a la sangre y a los órganos extrapulmonares difiere en estos estudios. También se ha demostrado que, a raíz de la liberación intranasal, las micropartículas de poliestireno (1.1  $\mu$ m) pueden translocarse a los tejidos del compartimento sistémico [95]. Recientes estudios [96-98] han proporcionado datos morfológicos que ilustran que las partículas inhaladas se transportan al espacio capilar pulmonar, presumiblemente por transcitosis. Recientemente, Elder et al. [91] demostró que la vía neuronal olfativa representa una ruta de exposición significativa del tejido del sistema nervioso central (SNC) a los UFP inhalados. Estos autores demostraron que, en ratas, que son respiradores nasales obligatorios, la translocación de partículas nanoscópicas inhaladas a lo largo de las neuronas es una vía más eficiente al SNC que a

través de la circulación sanguínea. Especularon que, puesto que esta translocación neuronal también se demostró en el caso de los primates no humanos, es probable que también funcione en humanos [84, 91]. En humanos, la información sobre la translocación de UFPs desde los pulmones a la circulación sanguínea todavía es contradictoria [85, 99, 100]. Sin embargo, dada la profunda penetración de nanopartículas en los alvéolos y la cercana aposición de la red alveolar y capilar, tal translocación de partículas parece plausible, ya sea como una partícula desnuda o tras su ingestión por los macrófagos alveolares [98]. Los eritrocitos [101] absorben las partículas desnudas y pueden presumiblemente distribuirse a varios órganos. La distribución de las partículas de carbono ultrafino de radiomarcado, conocidas comúnmente como "Technegas", ha sido investigada tras su inhalación por voluntarios humanos sanos no fumadores [85]. El tamaño de las partículas individualizadas es de entre 5 y 10 nm, como lo confirmamos por microscopía electrónica de partículas. La radiactividad, que en gran medida estaba ligada a las partículas, y evaluada por cromatografía de capa fina, se detecta en sangre un minuto después, alcanzando su máximo entre 10-20 minutos, y permaneciendo en este nivel hasta 60 min. Las imágenes de la cámara gamma muestran bastante radioactividad en el hígado y otras partes del cuerpo. La presencia de radiactividad en el hígado es compatible con una acumulación de partículas en células de Kupffer, como se sabe que ocurre con las partículas coloidales [102]. Más recientemente, Pery y sus colaboradores [103] desarrollaron un modelo cinético de base fisiológica para nanopartículas de carbono con etiqueta técnica (99 m) (Technegas). Se diseñó el modelo para analizar los datos de imagen obtenidos del estudio de Nemmar y sus colaboradores [85]. Incluía diferentes índices de translocación y cinética para tecnecio libre y pequeñas y grandes partículas de etiqueta técnica. Los autores llegaron a la conclusión de que el porcentaje de pequeñas partículas capaz de translocarse se estima del 12,7% del total de partículas, mientras que el porcentaje de tecnecio no vinculado se estima en un 6,7% del tecnecio total [103].

Nurkiewicz y sus colaboradores han estudiado los efectos de partículas inhaladas y nanopartículas en el sistema endotelial y microvascular. Primero, demostraron que las ratas expuestas a ROFA o TiO<sub>2</sub> presentaron una reducción de su capacidad para responder al ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187, que induce a la dilatación de las arterias [104]. En otros estudios, el mismo grupo ha demostrado que la exposición a ROFA o TiO<sub>2</sub> NP, por instilación o inhalación, induce a la disfunción microvascular sistémica [105, 106]. También detectaron que la señalización de óxido nítrico (NO) parece estar involucrada en los efectos endotelial sistémico de las partículas [107].

**3.2.2. Efectos Agudos.** Varios estudios demuestran que la exposición a UFP o DEP causa inflamación pulmonar y problemas protrombóticos en la vena del oído de ratas o en la vena femoral y arteria de los hámsteres [108-112]. Mutlu y sus colaboradores [113] demostraron que la exposición a MP desencadena la producción de IL-6 mediante macrófagos alveolares, lo que reduce el tiempo de coagulación, la formación de trombina intravascular y la trombosis arterial acelerada de la carótida [113]. La aparición de estrés oxidativo se ha detectado en ratones ante la tendencia trombótica aguda inducida por DEP en las venas piales del cerebro, la activación de las plaquetas circulatorias de la sangre, y la inflamación pulmonar [25]. Además, los mismos autores mostraron que el pretratamiento antioxidante con ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxílico previno la inflamación inducida por la DEP y las consiguientes complicaciones trombóticas [25].

Más recientemente, se han investigado los efectos agudos (4 y 18 h) de la DEP en parámetros pulmonares y cardiovasculares y el efecto protector de la timoquinona [41]. Cuatro horas después de la administración del DEP, no hubo cambios significativos en las células BAL, ni en la histología pulmonar o en la función pulmonar. Sin embargo, 18h tras la exposición, tanto la inflamación como la función pulmonar se ven afectados de manera significativa. Por el contrario, a las 4 h y 18 h, DEP causa inflamación sistémica caracterizada por leucocitosis, aumenta la concentración de IL-6 y reduce SBP. DEP reduce el número reducido de plaquetas y agrava la trombosis arterial pial. La suma de DEP (0.1-1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a la sangre no tratada favorece la agregación plaquetaria. Los efectos cardiovasculares que se aprecian 4 h después de la exposición al DEP parecen no proceder de la inflamación pulmonar pero posiblemente de la traslocación de la sangre de DEP y/o sus componentes asociados [41]. Sin embargo, a las 18 h, el DEP indujo cambios significativos en las funciones pulmonares, cardiovasculares e inflamación pulmonar. Pretratamiento con timoquinona evita eficazmente la toxicidad cardiorrespiratoria inducida por la DEP [41].

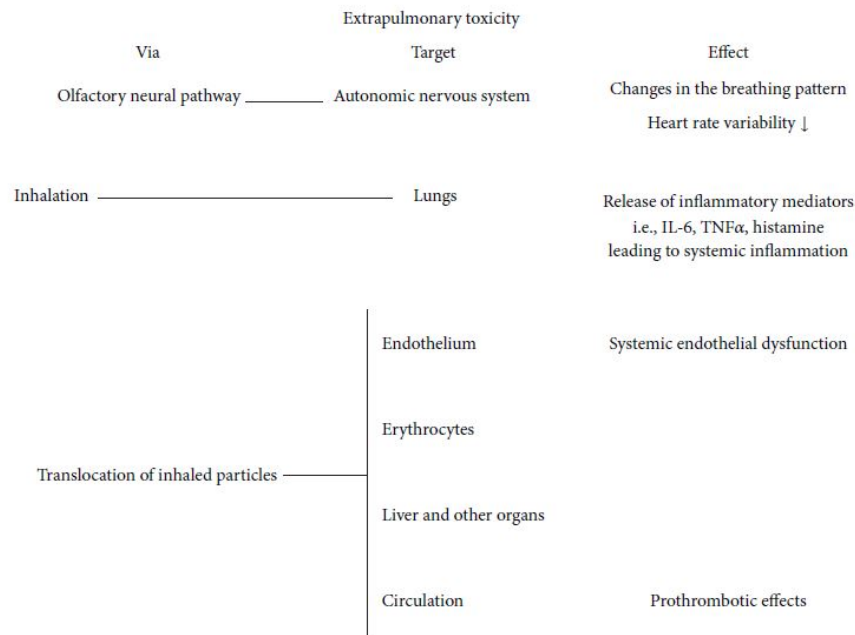


FIGURE 3: Summary of the main systemic effects associated with particle exposure and the possible mechanisms related to those effects.

Se informa de que TNF $\alpha$  es un agonista de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y se ha comprobado que desempeña un papel importante en la regulación del PAI-1 en una variedad de enfermedades. En el modelo endotoxemia de un ratón, se ha descubierto que TNF $\alpha$  contribuye al efecto de los lipopolisacáridos PAI-1[114]. Budinger et al.[115] demuestran que el aumento de la regulación del PAI-1 inducido por las MP ambientales desaparece en el tratamiento de ratones con un inhibidor de TNF $\alpha$ [115]. Relacionado con estos últimos hallazgos, se ha demostrado recientemente dado a la exposición repetida, la inflamación e hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por DEP, la inflamación sistémica, aumento del PAS, y la coagulación acelerada. La producción de TNF $\alpha$  aumenta tanto en BAL como en plasma. Pretratamiento con curcumina inhibe significativamente la liberación de TNF $\alpha$  y previene los efectos respiratorios y cardiovasculares de la DEP[116].

Un aspecto importante de las asociaciones epidemiológicas entre la contaminación atmosférica y la morbilidad o mortalidad es que los efectos adversos agudos parecen marcarse más en personas con funciones cardiovasculares complicadas ya existentes, tales como hipertensión o diabetes [89]. Para dar credibilidad a estas informaciones, varios estudios experimentales se han diseñado para comprobar si los efectos de contaminación, y en qué medida, se agravan utilizando un modelo animal de hipertensión inducida por la angiotensina II. De hecho, las partículas con diámetro  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) potencian la hipertensión inducida por la angiotensina II [117, 118]. Además, las PM<sub>2.5</sub> aumentan la hipertrofia cardíaca inducida por la angiotensina II, la deposición de colágeno y la activación RhoA cardíaca y vascular, lo que sugiere que los efectos sobre la salud cardiovascular son, sin duda, el resultado a la exposición de partículas contaminantes [118]. Se analiza también la evidencia de agravamiento de enfermedad trombotica pero no respiratoria en la hipertensión inducida por angiotensina II en ratones [119, 120]. Con respecto a la diabetes mellitus, se ha demostrado que la DEP aumenta de igual modo la resistencia de las vías respiratorias y causa la filtración de sustancias inflamatorias en el pulmón tanto de ratones diabéticos como no diabéticos. Sin embargo, la aparición de estrés oxidativo, la presencia de células apoptóticas pulmonares, y el aumento de proteínas totales, albúmina y TNF $\alpha$  en fluido BAL sólo se observa en ratones diabéticos expuestos a DEP lo que sugiere un aumento en la sensibilidad respiratoria a la contaminación atmosférica por partículas [121]. Además, el mismo grupo de investigadores ha demostrado que problemas de coagulación sistémicos se ven agravados por la diabetes en ratones que están expuestos de forma aguda a DEP [122]. Estos autores afirman que pueden ser relevantes para la exacerbación de la morbilidad cardiovascular que acompaña a la contaminación del aire por partículas en pacientes diabéticos.

Nemmar y sus colaboradores han informado recientemente de la novedosa evidencia de que la deposición pulmonar de DEP potencia los efectos renales, sistémicos y pulmonares debido al fallo renal inducido por el cisplatino (IRA) [123]. Estos hallazgos ponen de relieve la importancia de los factores medioambientales, tales como la contaminación por partículas en el aire, en la agravación del IRA.

Varios estudios han demostrado que las nanopartículas, debido a su pequeño tamaño, podrían evitar las defensas fagocíticas normales en el sistema respiratorio y tener acceso a la circulación sistémica y por lo tanto a diferentes lugares extrapulmonares [83, 84, 90-93, 103, 123]. Para determinar específicamente el efecto de partículas translocadas, se ha demostrado recientemente tanto en ratas normotensas como espontáneamente hipertensas que 24 horas después de su administración sistémica, DEP se ve afectado por la presión sanguínea y causa inflamación pulmonar tal y como se avala en BAL [124, 125]. Otro estudio en ratas revela que la administración i.v. de DEP (0.02mg/kg) causa efectos sistémicos agudos, principalmente a las 6 y 18 horas, pero no a las 48 horas, o 168h tras la exposición a partículas. Mientras que se detectaron DEPs en pulmones, corazón, hígado y riñones, los cambios histopatológicos sólo se detectaron en el pulmón. Esto implica que, según la dosis y tiempos investigados, DEP puede causar inflamación en pulmones, pero no en otros órganos, lo que sugiere que el tejido pulmonar es el sitio predominante para la inflamación según la base de administración de la DEP en este estudio [126]. Además, se ha demostrado que el TiO<sub>2</sub> ultrafino provoca inflamación pulmonar aguda tras la administración del i.p. y muestra efectos aditivos o sinérgicos

con LPS, al menos parcialmente, mediante la activación de inflamación dependiente de oxidantes y de NFkappaB, lo que conlleva un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios [127]. Geys et al.[128] investigan la toxicidad de los puntos cuánticos que tienen numerosas aplicaciones para la obtención de imágenes in vivo. QDs causa trombosis vascular en la circulación pulmonar, especialmente con QDs de carboxilo. Se detecta QDs principalmente en pulmón, hígado, y sangre. Se suprimen las complicaciones trombóticas, y el Pselectin no se ve afectado por el pretratamiento de los animales con heparina.

**3.2.3. Efecto Subagudo y Crónico.** Akinaga y sus compañeros [129] hablan de un estudio en el que los ratones están continuamente expuestos, desde su nacimiento, en dos cámaras abiertas (una filtrada y una no filtrada por partículas en el aire de  $\leq 0.3 \mu\text{m}$ ) y ubicadas a 20m de una calle con mucho tráfico en el centro de Sao Paulo, 24 horas al día durante 4 meses. Encontraron que la contaminación del aire producía leves pero significativas alteraciones estructurales vasculares en individuos normales, representadas como fibrosis coronaria y elastosis.

Se ha demostrado que las PM causan una disminución significativa de los patrones de frecuencia cardíaca, temperatura corporal y actividad física en ratones que carecen de apolipoproteína (ApoE<sup>-/-</sup>) después de 5 meses de exposición a PM en ambiente concentrado, con un menor y pequeño cambio no significativo en ratones C57[130].

Sun y sus compañeros de trabajo demostraron que los ratones ApoE expuestos a PM<sub>2,5</sub> concentradas en la zona del noreste durante 6 meses (6 h/día durante 5 días/semana) en combinación con un alto contenido de grasas potencia el desarrollo de inflamación vascular (CD68+ infiltración de macrófagos y expresión inflamatoria de óxido nítrico sintasa (iNOS)) y los marcadores de estrés oxidativo [131]. La formación de placa viene acompañada de alteraciones en el tono vasomotorial, incluida la caída de la función vasodilatadora dependiente del endotelio y vasoconstricción aumentada a los estímulos adrenérgicos. El mismo grupo de investigación confirmó sus hallazgos gracias a otro conjunto de experimentos que se realizó usando idéntico protocolo de exposición pero que conlleva un modelo de apoE<sup>-/-</sup> y un modelo de doble golpe (DK) de ApoE<sup>-/-</sup> y ratones con deficiencia receptora en lipoproteína de baja densidad (LDL) (ratones DK) y expuestos a PM<sub>2,5</sub> de ambiente durante 6 horas al día durante 5 días/semana y un máximo de 5 meses. Aunque las mediciones cuantitativas muestran que la exposición a PM<sub>2.5</sub> aumenta las lesiones ateroscleróticas en el apoE<sup>-/-</sup> de los ratones, los cambios producidos por PM<sub>2.5</sub> en ratones DK no fueron estadísticamente significativos [132]. En sucesivos experimentos, se ha demostrado que la exposición a PM<sub>2.5</sub> aumenta la expresión del factor tisular en macrófagos y las células musculares en la arteriosclerosis [132]. También informaron de la captación de monocitos en nichos de tejido microcirculatorio (es decir, adipocitos) en respuesta a la exposición a largo plazo a PM<sub>2.5</sub>[134]. Estos experimentos sugieren un papel clave de las PM<sub>2,5</sub> en la activación y movilización de las células inmunitarias innatas.

Kang y sus colaboradores han investigado los efectos cardiovasculares a largo plazo de la inhalación de hidróxido de níquel (nano-NH) en ratones hiperlipidémicos ApoE<sup>-/-</sup>. [135]. Se exponen los ratones a nano-NH a 0 o 79  $\mu\text{g Ni}/\text{m}^3$ , a través de un sistema de

inhalación corporal, durante 5 h/día, 5 días/semana, y desde 1 mes hasta 5 meses. La inhalación de nano-NH conlleva significativo estrés oxidativo e inflamación en los pulmones y órganos extrapulmonares, tal y como refleja el aumento de ARNm en los niveles de enzimas antioxidantes y genes de citoquinas inflamatorias; aumento del daño del ADN mitocondrial en la aorta; signos claros de inflamación en el líquido BAL; cambios en la histopatología pulmonar; e inducción de la respuesta en fase aguda. Además, después de 5 meses de exposición, el nano-NH aumenta la aterosclerosis en ratones ApoE-/-[135].

Emmrechts y su equipo han investigado cómo la exposición continua a la contaminación atmosférica relacionada con el tráfico afecta a parámetros de homeostasia en ratones jóvenes y viejos. Se colocan los ratones jóvenes (10 semanas) y los ratones viejos (20 meses) en un túnel de carretera de zona rural o en un entorno limpio durante 25 ó 26 días. Diagnostican en ratones viejos que la exposición subcrónica a la contaminación aumenta el número de plaquetas, el factor von Willebrand, la P-selectina soluble, y las microvesículas, lo que en conjunto corrobora una mayor elevación de la trombogenicidad, ya de por sí elevada en la edad adulta[136].

Existen posibilidades neurodegenerativas consecuencia de la entrada de partículas al cerebro. Se ha informado de evidencia histológica de neurodegeneración tanto en cerebros caninos como en humanos expuestos a altos niveles de PM ambientales, lo que sugiere la posibilidad de consecuencias neurotóxicas por PM[137, 138]. El daño mediado por MP puede venir causado por el efecto oxidante de estrés que puede acrecentar la sensibilidad a enfermedades neurodegenerativas. La relación entre la exposición a PM y la degeneración del sistema nervioso central también se puede detectar en condiciones experimentales controladas[137,138] Análisis morfométrico del sistema nervioso central de ratones ApoE-/- expuestos a la contaminación atmosférica concentrada muestra que el cerebro es un blanco crítico para la exposición de partículas contaminantes y el estrés oxidativo implicado como factor que vincula la exposición al MP y la tendencia a la neurodegeneración[137, 138]. Se necesitan otros estudios experimentales para aclarar el efecto y los mecanismos subyacentes a la neurotoxicidad de la contaminación atmosférica por partículas.

#### **4. Estudios in vitro**

Los modelos in vivo dan una buena idea de los efectos tóxicos de partículas, considerando las múltiples interacciones de los diferentes tipos de células en el pulmón, las respuestas complejas son bien documentadas, pero es difícil de aclarar los mecanismos celulares relacionados con las respuestas específicas. En este sentido, los modelos in vitro se utilizan como herramienta principal para evaluar los mecanismos celulares relacionados con la exposición a las partículas.

Existen varios enfoques para evaluar los efectos tóxicos de partículas en las células que se sugieren o señalan como objetivos de PM y NP. Cultivos de células individuales, cocultivos, múltiples cocultivos, exposición bajo condiciones de inmersión, y la exposición bajo la interfaz aire-líquido se encuentran entre los principales enfoques. Estamos analizando algunos de los más significativos avances en la evaluación de la



toxicología in vitro de MP. En el Cuadro 2 se resumen las pruebas in vitro más relevantes que apoyan los efectos observados in vivo.

**4.1. Propiedades de las partículas relacionadas con la interacción de las células primarias.** En el pulmón, las partículas pueden interactuar con el líquido que recubre el pulmón y las células epiteliales. Además, las partículas pueden extraerse por macrófagos y otras células inmunitarias por fagocitosis o pinocytosis. La interacción de las partículas con membrana celular plasma y sus receptores y canales de iones puede desencadenar directamente una respuesta biológica. Las reacciones provocadas por DEP a menudo comienzan a partir de componentes que se filtran de partículas, incluidos metales y diversos HAP, entre las que se incluyen derivados como nitro-PAHs y varios oxo-AH (quinonas). La posición relativa de tales componentes en la partícula es de importancia, ya que sólo añadiendo componentes extraídos puede dar lugar a menos efectos que los que ejerce la partícula nativa [139]. Además, la combinación de los componentes de las partículas tales como endotoxinas y productos químicos en la fracción orgánica puede provocar más que efectos aditivos de la respuesta de citoquinas [15]. Por otro lado, con respecto al efecto genotóxico, la respuesta será más alta en los extractos ya que la mayoría de los HAP cancerígenos están disponibles en las células [140, 141].

TABLE 2: *In vitro* evidence that supports and provides plausible mechanisms for the *in vivo* observed effects induced by PM and NP.

| <i>In vitro</i> evidence supporting the observed <i>in vivo</i> effects |  |
|---|--|
| <i>In vivo</i> observed effect  | <i>In vitro</i> evidence   |
| Oxidative stress  | ROS increases via NADPH-oxidase in lung epithelial cell exposed to PM.   |
| Local and systemic inflammation   | Secretion of IL-1b, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , MCP-1, and so forth, by lung cells, macrophages, and cocultures.  |
| Hyperplasia   | Proliferative stimuli induced by extracts of DEP components.   |
| COPD  | Increased cytotoxicity on exposed cell cultures.   |
| Systemic and endothelial dysfunction                                    | Endothelial cell activation by direct contact with particles or indirectly induced in cocultures where pneumocytes, macrophages, and other cell are exposed. |
| Particle translocation  | Changes in the TEER values related to tight junctions<br>Macrophage-dendritic transepithelial cells network alterations in the GJIC.                         |

Aunque sabemos que la captación de partículas tiene lugar en las células epiteliales [142], la mayoría de las respuestas biológicas desencadenadas por las partículas en estas células no parecen depender de la captación de partículas [143]. Se informa de que las partículas como tal desencadenan efectos biológicos a través de la formación de especies de oxígeno reactivas acelulares (ROS). Sin embargo, se indica que las respuestas inmunológicas inducidas por DEP en las células A549 dependen de la activación de la formación de células ROS a través de la NADPH oxidasa [144]. Además, nuevas pruebas sugieren que los constituyentes de las partículas son capaces de unirse o activar varias membranas y receptores citosólicos. Obviamente, tanto la vinculación enlace-AhR como los metabolitos de HAP electrofílicos reactivos covalentemente que se unen al ADN vienen causados por componentes químicos liberados de la partícula [143, 145].

**4.2. Estudios *in vitro* con implicaciones para diversos procesos inducidos por PM**  
**Efectos cardiovasculares y varias enfermedades pulmonares, incluyendo Cáncer.**  
 Como hemos visto en apartados anteriores, los daños ocasionados por el revestimiento

epitelial de los pulmones pueden tener implicaciones importantes relacionadas con enfermedades patógenas, asma y alergias. La inflamación crónica directa o indirecta inducida se considera elemento fundamental en varias enfermedades cardiovasculares, la EPOC, y una parte probable del desarrollo del cáncer.

Con respecto a esto último, hay cada vez más pruebas que sugieren que la exposición a la contaminación del aire aumenta el riesgo de cáncer de pulmón [146, 147]. Los componentes que generalmente se consideran de mayor interés para tales efectos son las partículas en el ultrafino (PM<sub>0.1</sub>) y fracción fina (PM<sub>2.5</sub>) incluyendo DEP y partículas del humo de madera (WSP) [148]. Sin embargo, los estudios más recientes in vitro indican que también las partículas PM<sub>10</sub> más grandes pueden desempeñar un papel en el desarrollo del cáncer a través del daño de las células epiteliales del pulmón, efectos en la proliferación celular incluyendo citotoxicidad, liberación de mediadores inflamatorios como quimiocinas y citoquinas, cambios en la expresión genética a través del enlace de receptores, y varias formas de daño del ADN celular, incluyendo cambios epigenéticos. También es posible estudiar los efectos in vitro de la exposición a partículas en las últimas fases del desarrollo de cáncer, efectos tales como la inestabilidad cromosómica y la migración celular, que son partes importantes en la difusión del tumor y metástasis. Sin embargo, no somos conscientes de que tales estudios hayan sido publicados.

**4.2.1. Tight junctions.** Tight junctions en las células del epitelio representan una barrera importante para la protección del resto de tejidos y órganos de la exposición a varios intrusos patógenos tales como virus, bacterias, hongos, contaminación del aire PM, y varios alérgenos ligados a partículas. La exposición a este tipo de componentes puede provocar infecciones y reacciones alérgicas/asmáticas. Si se combina con la exposición a PM, el resultado final pueden ser reacciones inflamatorias crónicas, que se consideran parte importante de muchas enfermedades pulmonares tales como EPOC y el desarrollo del cáncer. Geys y su equipo ha demostrado que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) está ligada a las tight junctions y a la correlación entre el valor TEER y la translocación de partículas a través de monocapas celulares [149]. Usando el modelo de cultivo de una célula triple in vitro compuesto de células epiteliales humanas (16HBE14), macrófagos derivados de monocitos y células dendríticas, se ha demostrado recientemente que los macrófagos y las células dendríticas crean una red transepitelial entre las células epiteliales para capturar antígenos sin alterar la rigidez epitelial [150]. Utilizando un modelo similar, Lehmann y su equipo [151] observan que una alta concentración de DEP (NIST 2975, 125 µg/mL) puede modular el ARN de oclusión de la tight junction en las células del sistema de defensa epitelial. En este sentido, también es interesante notar que se indica que los DEPs de NIST 2975 aumentan la liberación de metaloproteinasa MMP-1 de las células epiteliales de pulmón humano (A549 y NCI-H292). El MMP-1 está involucrado en la degradación del colágeno pudiendo dañar la barrera epitelial pulmonar [144]. Estos hallazgos sugieren que la DEP puede contribuir a cambios estructurales en el revestimiento epitelial con implicaciones inflamatorias y posiblemente carcinógenas.

**4.2.2. Comunicación intercelular GAP JUNCTION (GJIC).** El GJIC es una forma de intercambio intercelular de moléculas de bajo peso molecular entre células adyacentes. Alteraciones químicas inducidas en este tipo de comunicación dan lugar a un crecimiento y comportamiento anormal de las células y se considera un ensayo

interesante para estudios in vitro de productos químicos que pueden actuar como promotores de tumores [152]. Regiones de bahía / similares a bahías de HAP se identifican como potentes inhibidores del GJIC [153]. Interesantemente varios HAP de alto peso molecular con altas propiedades carcinogénicas poseen sólo potencia débil (dibenzopirenos) o ninguna potencia de inhibición (dibenzofluorantenos, naphtho [2,3-a]pireno, y benzo[a]perileno)[154]. Además, la inhibición del GJIC inducida por los HAP se produce en ausencia de metabolismo de HAP y del enlace del receptor de hidrocarburo arilo (AhR)[155]. Es probable que el PAH cambie el GJIC a través de la interacción directa con factores desconocidos en la membrana celular. En este sentido, se indica que el DEP inhibe la GJIC [156-158]. Los efectos de la GJIC de un extracto fraccionado de DEP se deben a los componentes en la fracción polar, mientras que la fracción menos polar de nitro-PAH muestra mayor potencial mutagénico (prueba de Ames)[158].

**4.2.3. Proliferación celular y citotoxicidad.** Se ha utilizado la medición de la proliferación y citotoxicidad como uno de los ensayos de toxicidad primaria para partículas [15, 16, 159]. Con métodos relativamente sencillos, se ha demostrado diferencias en la intensidad de la citotoxicidad. Idéntica masa de PM urbana se ha recogido en diferentes ciudades, o en una gran ciudad, y estando asociada con diferentes fuentes presenta diferencias en la proliferación y citotoxicidad celular [16, 17]. Estos resultados han sido de gran interés para analizar el papel de los efectos tóxicos de diferentes componentes de partículas y por lo tanto para identificar componentes tales como la endotoxina, carbono orgánico y algunos componentes asociados a la citotoxicidad [14, 16, 17].

El aumento de la citotoxicidad suele ir seguido de un aumento en los estímulos proliferativos, estímulos considerados de gran importancia tanto para la fijación de la lesión principalmente del ADN, así como para la fase de promoción tumoral. Una serie de compuestos en el DEP son citotóxicos; se sabe que otros compuestos dañan el ADN, lo que produce un arresto G1 y/o acumulación en fase S debido a la reducción de la síntesis del ADN[160, 161]. Sin embargo, los DEPs también incluyen compuestos que pueden afectar la proliferación celular de otras maneras. Dos nitrofenoles aislados del DEP 3-metil-4-nitrofenol (4-nitro-m-cresol, PNMC) y el 4-nitro-3-fenilfenol (PNMPP) se sabe que contienen actividad estrogénica y antiandrogénica. Lo más interesante, la proliferación de células MCF-7 se estimula mediante PNMC, PNMPP, y estradiol-17 beta y los antiestrógenos 4-hidroxitamoxifeno y el ICI 162,570 inhiben la proliferación [162]. El extracto crudo de DEP muestra ambas actividades estrógenas y antiestrogénicas. Actividad estrógena del extracto puro y algunas fracciones se induce a través del estrógeno-receptor. (ER-). En particular, la fracción polar del ácido de los DEPs, que contiene fenoles, conlleva altos niveles de actividad estrogénica en comparación con otras fracciones [163].

Una parte importante de los carcinógenos conocidos que se encuentran en las partículas de aire contaminantes son varios HAP. Se sabe que algunos de ellos tienen potencia mitogénica. Más específicamente, se informa de efectos mitogénicos débiles, que se producen a través del aumento de Ca<sup>2+</sup>, de la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del receptor de insulina [164-167]. Además, se aprecian interrupciones de la inhibición de contacto a través de la función AhR del JUN-D/cyclin

[168]. Este tipo de efecto obviamente también origina la proliferación en el aumento del número de células. Lo más interesante es que se sabe desde hace tiempo que varias de ellos tienen las llamadas "propiedades de ocultación"[169-171]. Esta es una propiedad por la cual los metabolitos reactivos son capaces de unirse al ADN sin ser detectados fácilmente por el sistema de defensa celular. Más específicamente, algunos metabolitos reactivos PAH se unen al ADN sin provocar un arresto G1.

Parece producirse un aumento de p53, pero no un aumento p21waf1/cip1- de la actividad transcripcional del p53. Además, algunos HAP parece que producen mdm2, lo que puede reducir la activación del p53 [172, 173]. Se indica que la inhibición dependiente de AhR de la apoptosis dependiente E2F1- [174] reduce la translocación nuclear del p53, la estimulación de las señales de supervivencia celular e inhibición del daño del ADN tras la exposición a ciertos HAP [175, 176]. Lo más importante es que estos productos químicos alteran el equilibrio entre la muerte celular y la supervivencia celular y la proliferación celular tras un evento dañino para el ADN. Si no se compensa con mayor reparación del ADN, el resultado final será el aumento en la formación de mutaciones. Además, los metabolitos reactivos que hacen reaccionar en mayor grado el ADN frente a otras macromoléculas en las células tendrán un mayor potencial mutagénico [177, 178]. En línea con esto, recientemente se ha informado de que varios contaminantes ambientales incluido el HAP cancerígeno benzo[a]pireno puede modificar las características de la membrana plasmática, alterando así la fisiología celular y el equilibrio entre la vida o la muerte de una célula [179].

**4.2.4. Mediadores Inflamatorios.** Varias citoquinas funcionan como factores de proliferación y/o supervivencia, por ejemplo, IL-6, IL-8, y IL-1 $\beta$ [180] pudiendo tener implicaciones en varias enfermedades pulmonares, incluyendo el desarrollo del cáncer. Así, una serie de estudios in vitro han elucidado el potencial inflamatorio de varias partículas contaminantes del aire [181]. En estudios con células DEP pulmonares del epitelio BEAS-2B bronquial en fecha anterior al año 2000 aumenta la liberación de quimiocinas tales como la IL-8[182]; mientras que el EURO-4 DEP induce IL-6 e IL-8, pero también en cierto grado CCL5, CXCL10 y IL1 $\beta$ [139]. Hashimoto et al. Informa del aumento de CCL5 (RANTES) tras exposición a DEP (antes del año 2000) [183]. A menudo la liberación de pro-IL-1 $\beta$  se debe a una combinación de endotoxinas y otros componentes de partículas [184]. En general, el estrés oxidativo se considera un importante mecanismo de toxicidad inducida por partículas e inflamación [181]. La formación directa de ROS por DEP puede proceder del metabolismo enzimático de compuestos orgánicos tales como HAPs [185, 186]. Los posibles mecanismos también incluyen un activación de la enzima NADPH oxidasa unida a la membrana, induciendo la formación de ROS cerca de la membrana plasmática [187]. Una correlación entre la activación de la NADPH oxidasa y respuesta proinflamatoria ha sido identificada usando ambos sistemas in vitro e in vivo y expuestos a partículas de aire [188]. Como se ve de manera habitual en estudios de contaminación atmosférica realizados en ciudades, parece haber grandes diferencias estacionales en las PM10 y PM2.5, tanto en lo que se refiere a la composición química como a sus efectos biológicos medidos a través de la liberación de citoquina proinflamatoria y la citotoxicidad [184]. La PM10 de verano muestran un mayor potencial proinflamatorio, en parte debido a componentes biológicos tales como LPS, como también ya se ha indicado anteriormente [189, 190]. Generalmente las citoquinas inducidas incluyen IL-6, IL-8, y IL-1 $\beta$ . Sin embargo, cabe

destacar que no existe un mecanismo simple que explique todos los efectos celulares, y en algunos casos se han observado resultados contradictorios para IL-6 e IL-8[191]. Además, el estrés oxidativo por sí solo parece ser insuficiente para inducir respuestas proinflamatorias en las células pulmonares, apuntando también a otros mecanismos [192, 193]. Además, los mecanismos de toxicidad inducida por partículas son propensas a cambiar con el aumento de concentraciones.

De particular interés, estudios recientes muestran que la DEP puede inducir la afluencia de Ca<sup>2+</sup> a través del receptor-2 activado por proteínasa (PAR-2) activación mediada de canales TRPV4 en células epiteliales bronquiales en humanos. Este efecto está probablemente vinculado a respuestas de IL-8 en las células epiteliales bronquiales inducidas por compuestos múltiples que se encuentran en el aire ambiente [194]. Estudios también sugieren que la exposición al DEP activa la señalización del EGFR [194]. La activación de la señalización EGFR a través de la división y la liberación del factor de crecimiento transformante ligado a la membrana (TGF- $\alpha$ ) por la enzima convertidora themetalloproteinase TNF $\alpha$  (TACE o ADAM17) parece ser un mecanismo universal de regulación de la IL-8 en las células epiteliales de las vías respiratorias por múltiples compuestos endógenos y exógenos, incluyendo DEP y diversos componentes de la contaminación atmosférica [194]. También es posible que la formación de metabolitos reactivos ligados a la partícula/DEP pueda interferir con la señalización de varias células u orgánulos de efecto, iniciando así una reacción inflamatoria.

El endotelio vascular desempeña un papel fundamental en el proceso inflamatorio y la producción de citoquinas, varias señales celulares desencadenan esta respuesta. Partiendo de la base de que la materia particulada puede translocarse desde los pulmones en pocos minutos tras la exposición [85], la inflamación podría llegar al endotelio vascular directamente por la exposición a partículas. En este sentido, varios estudios demuestran que las PM y NP inducen disfunción endotelial tras la exposición [16, 195-198]. El término moléculas de adhesión tempranas y tardías, (E-Selectin, P-Selectina) (ICAM-1, VCAM- 1, PECAM-1) respectivamente, se asocia con la presencia de endotoxina [199], el tamaño de las partículas [200] y el estrés oxidativo inducido por partículas y nanopartículas [201, 202]. Pese a las pruebas aportadas por estos estudios, no hay certeza de la cantidad de partículas que pueden translocarse, y, por lo tanto, las condiciones experimentales de exposición son siempre una preocupación.

In vivo, las células epiteliales o los macrófagos, o cualquier célula que esté interactuando con una partícula, interactúa con otros tipos de células, y esas interacciones pueden exacerbar o inhibir la respuesta inflamatoria. Los cultivos de células individuales tienen la limitación de no evaluar esas interacciones. Los cocultivos de dos o más tipos de células pueden ayudar a mejorar los estudios in vitro. Un estudio que utiliza cocultivos de células múltiples de células epiteliales del pulmón humano, macrófagos, mastocitos y células endoteliales demostró que cuando se presentaban lo cocultivos, se observa una mayor producción de citoquinas en comparación con las respuestas obtenidas en el cultivo único [203]. Estos tipos de modelos ayudan a evaluar si el primer contacto de PM o NP con las células relevantes es suficiente para inducir un efecto endotelial que pueda llevar a efectos sistémicos. En este sentido, una modificación al modelo descrito por Alfaro-Moreno et al., utilizando un cocultivo en el que las células endoteliales y epiteliales se siembran a ambos lados de una membrana, demuestra que, al exponer las

células epiteliales, se produce una activación de las células endoteliales que se hacen evidentes dentro de las 24 horas de exposición [204].

Es interesante notar que las enfermedades inflamatorias como el asma y la EPOC implican un mayor riesgo de cáncer de pulmón, aunque esta implicación puede no ser directa [199, 200]. La hipótesis se basa en que la liberación de mediadores inflamatorios (quimiocinas y citoquinas) tales como IL-1 $\beta$  tanto directamente como a través de una mayor citotoxicidad (liberación de moléculas de DAMP) puede suponer un aumento del número de neutrófilos/macrófagos en el pulmón. Así, varios estudios in vivo sobre otras sustancias químicas informan que el reclutamiento de esas células se traducirá en un aumento de liberación de moléculas de ROS que podrían exacerbar el aumento de la toxicidad y así amplificar el proceso inflamatorio. La mayor inflamación en un tejido aumentará el estrés oxidante/nitrosativo y peroxidación de lípidos (LPO), generando por tanto un exceso de ROS, especies de nitrógeno reactivo, y aldehídos reactivos de ADN. Las bases modificadas de ADN se generan, entre otras razones, por reacción del ADN ante estos importantes productos LPO [201]. El entorno resultante altamente citotóxico también creará un entorno que favorece la selección de células con mutaciones en p53, haciéndolas más resistentes a la muerte celular [202]. Otros mecanismos incluyen el camino para la reparación del ADN dañado o desequilibrado. De esta manera, el estrés oxidativo/nitrosativo persistente y el exceso de LPO se induce por procesos inflamatorios en un proceso que se autoperpetúa y que causa una acumulación progresiva del daño del ADN en los órganos objeto, incluido el pulmón [201].

Sin embargo, el papel que desempeña la inflamación inducida por partículas en el desarrollo del cáncer de pulmón es muy complejo. Durante los últimos años, cada vez está más claro que las citocinas y las quimiocinas pueden tener un papel profundo no sólo en la progresión, sino también en el rechazo de tumores [205].

**4.2.5. Cambios en la expresión genética a través de la unión de receptores.** Ciertos cambios en los fenotipos podrían aumentar la probabilidad de desarrollo de células cancerígenas. En cuanto a la exposición a partículas de aire urbano, es bien sabido que algunas de éstas tales como DEP y Wood inician varias respuestas AhR [145, 161, 206]. Esto se explica por el hecho de que los potentes ligandos AhR tales como los HAP y las dioxinas se liberan de las partículas. La activación del AhR implica un aumento del metabolismo de xenobióticos, detectándose a menudo cambios en el equilibrio entre varias vías metabólicas y de desintoxicación [177]. Este tipo de cambios puede tener implicaciones importantes en las células, ya que los metabolitos más o menos reactivos son fundamentales en el inicio del cáncer, promoción y reacciones inflamatorias. Además, este receptor también tiene un papel muy importante en el desarrollo fisiológico de la enfermedad, implicaciones que van más allá del metabolismo específico de xenobióticos, incluidos los efectos sobre la proliferación, migración, y regulación inmunitaria [145]. Todos estos procesos pueden tener implicaciones importantes en el desarrollo del cáncer.

**4.2.6. Cambios epigenéticos.** La transcripción de genes se activa cuando específicos sitios de CpG se desmetilan y las histonas se acetilan y, a la inversa, silenciada cuando los emplazamientos están metilados y las histonas desacetiladas. Además, junto a los oncogenes, los supresores tumorales y miRNAs son los principales reguladores de señalización en el fenotipo de cáncer [207, 208].

Por lo tanto, las posibles implicaciones de los cambios epigenéticos producidos por la contaminación del aire deben explorarse claramente en sistemas *in vitro*, ya que los resultados pueden convertirse en importantes marcadores biológicos para estudios epidemiológicos en el futuro.

**4.2.7. Genotoxicidad.** Está bien documentado que diferentes tipos de partículas, sus extractos y componentes individuales tienen efectos genotóxicos en estudios en humanos y en animales tanto *in vivo* [209] como *in vitro*. Después de la exposición de las células en cultivo a diferentes tipos de PM, varios estudios han demostrado que las células pueden detenerse en varias partes del ciclo celular [160, 161, 210, 211]. En la mayoría de los casos, estos efectos se relacionan con daño en el ADN. Diversas formas de daño en el ADN se detectan tras la exposición al MP. Daños en el ADN incluyen roturas de una sola hilera del ADN, rotura en el alcalino-lábil, y varias formas de daño incluyendo guaninas oxidadas medidas en 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo Gua) y lesiones detectadas como formamidopirimidina ADN glicosilasa (fpg) [161, 205]. A menudo este tipo de daños se asocian con la formación de daños micronúcleos y cromosómicos. En línea con esto, los efectos positivos del DEP en los cromosomas y el intercambio de cromátidas hermanas se ha detectado en células V79 sin ningún sistema de activación adicional añadida [212]. Se informa que el extracto orgánico de PM<sub>2.5</sub> genera la rotura de ADN y la formación de micronúcleos usando células BEAS- como sistema modelo. Ensayo de varias fracciones con fpg en este sistema sugiere un posible papel del ROS y de los hidrocarburos alifáticos/clorados, los HAP/alquienos derivados y los nitro-PAH/cetonas/quinonas pueden ser importantes agentes causantes de los efectos genotóxicos [213]. Además, debe tenerse en cuenta que los productos orgánicos extraíbles de DEP (MOE) se sabe que disponen de una mayor capacidad que otros HAP cancerígenos individuales para generar daños oxidativos en el ADN en las células HepG2[214].

Mientras que muchos informes se centran en las rupturas de ADN y/o daño del ADN oxidativo con respecto al desarrollo del cáncer [209], otros vinculan el efecto genotóxico y cancerígeno inducido por el MP efecto de los HAP cancerígenos "clásicos" que dan lugar a los aductos de ADN, a menudo analizados mediante el posetiquetado 32P [214]. Estos HAP deben activarse metabólicamente, electrofílicos que se unen covalentemente al ADN. Se utilizan tanto las células acelulares como las diversas células *in vitro*. Los niveles de aducción están vinculados a los niveles de HAP en extractos, extractos fraccionados o compuestos simples de HAP testados por separado [214]. Los resultados de dichos estudios indican que la mayoría de los aductos de ADN detectados en células incubadas con la materia orgánica extraíble (MOE) del aire ambiente tienen su origen en las bajas concentraciones de HAP cancerígenos, lo que representa una parte muy baja de la masa total de la MOE (0,03-). 0.17%; [199]). En general, los voluminosos aductos de ADN se asocian más a menudo con una alta potencia para formar mutaciones genéticas, que se consideran de particular importancia para la fase inicial del desarrollo del cáncer.

Un punto importante en la evaluación del potencial genotóxico es el uso de un sistema de activación metabólica con capacidad suficiente para activar estos HAP cancerígenos. Ciertos tipos de células epiteliales pulmonares (por ejemplo, Clara y tipo II) *in vivo* tienen un nivel relativamente alto de enzimas CYP debido a la exposición a los ligandos AhR (varios HAP, dioxinas) y que se relaciona con las partículas de aire. En



consecuencia, varias publicaciones han mostrado aductos de ADN, rupturas de ADN y daño(s) oxidativo(s) del ADN después de la exposición a partículas del ambientales [215-218]. Así, las células epiteliales pulmonares tendrán in vivo una capacidad clara para activar varios compuestos cancerígenos, incluidos los HAP. Sin embargo, en contraste, las diversas líneas celulares epiteliales pulmonares, así como las células pulmonares primarias de animales de laboratorio utilizados in vitro tienen una capacidad mucho menor para activar dichos compuestos. Estas células son, por lo tanto, no siempre, la mejor opción a utilizar en los ensayos con los efectos genotóxicos de diversos tipos de partículas de aire ambientales. Algunas líneas celulares derivadas del hígado parecen tener una capacidad más interesante de activación metabólica HAP, algo más similar a la situación humana in vivo; aunque el perfil de enzimas metabólicas en el hígado es diferente si se compara con el pulmón. No obstante, estos modelos se considera que son mejores para la investigación in vitro del potencial genotóxico de las mezclas complejas que contienen HAP [214, 219]. Otro aspecto importante es el uso de un sistema de prueba que puede detectar el daño primario del ADN. Esto podría incluir técnicas como el postlabeling  $^{32}\text{P}$  para detectar los aductos de ADN más grandes y voluminosos. De cara a detectar y evaluar los componentes dañinos del ADN que causa aductos de ADN más pequeños y otras lesiones de ADN, el ensayo del cometa con o sin adición de fpg es una buena opción [220].

Aunque no está en uso actualmente, es posible probar la capacidad de las partículas y de sus extractos para transformar las células del epitelio in vitro, lo que supone un test tanto de "iniciación" como de "propiedades impulsoras" del tumor. En un ensayo de transformación usando células BALB/c 3T3, los DEPs demuestran que causan transformación morfológica [212]. Del mismo modo, se informa de que el DEP y dos compuestos relacionados, el 1-nitropireno (1-NP) y dibenzo(a,i)pireno (DBP), son capaces de transformar células epiteliales traqueales de rata [221]. Varios sistemas de cocultivo también añaden información importante al problema de un "modelo de activación metabólico relevante" cuando se prueban los efectos genotóxicos de PM in vitro. En un estudio reciente, se presentan los resultados que apoyan la noción que los metabolitos derivados del benzo[a]pireno (B[a]P) altamente reactivos se producen dentro del macrófago alveolar humano y que podrían transferirse a una línea celular epitelial de objetivo secundario [222]. Tales hallazgos tienen importantes implicaciones in vivo a la hora de explicar los posibles mecanismos implicado en el cáncer de pulmón inducido por el aire ambiental. Usando la capacidad de reparación del ADN in vitro, muchos aspectos importantes del papel de la reparación del ADN para mantener la estabilidad genética y prevenir la carcinogénesis puede ver luz [223]. Además, los estudios y análisis de los polimorfismos de los genes reparadores de ADN implicados en la reparación de la escisión de nucleótidos (NER) resultan ser biomarcadores útiles para identificar individuos susceptibles al daño de ADN resultantes de la exposición al aire ambiente [224]. También se analiza el nivel de proteínas involucradas en la respuesta del ADN como los niveles de proteína gamma-H2AX, p53, y p21 (WAF1) vinculándose a los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos por el MP. Lo más interesante es que se informa de que el PM del aire ambiente inhibe en gran medida la reparación de la escisión de nucleótidos (NER) por la luz ultravioleta (UV) y del benzo[a]pireno diol epóxido (BPDE) que conlleva daños en el ADN de las células pulmonares humanas. La MP aumenta tanto la mutagénesis espontánea como la inducida por los rayos UV, lo que

sugiere que la carcinogenicidad de las PM puede actuar a través de su efecto combinado en la supresión de la reparación del ADN y mejora de los errores de replicación del ADN [226].

## 5. Conclusiones

La contaminación atmosférica urbana consiste en una mezcla extremadamente compleja de agentes gaseosos y de partículas. La mayoría de los estudios publicados coinciden con la afirmación de que, aunque los contaminantes gaseosos, como el ozono o el SO<sub>2</sub>, juegan un papel importante, el elemento común de los efectos nocivos para la salud de la contaminación atmosférica urbana es el PM respirable[1, 88]. Muchos estudios con animales se han realizado para dilucidar los efectos de las PM en diferentes órganos, y en relación con diferentes enfermedades. Respecto a los efectos agudos, la mayoría de los estudios se han centrado en las enfermedades inflamatorias, y relativamente pocos estudios han incluido respuestas más específicas a enfermedades, tal vez con la excepción de estudios sobre respuestas relacionadas con las alergias. Por el contrario, más estudios sobre los efectos crónicos han aclarado los problemas relacionados procesos de enfermedades, tales como el daño al ADN, la destrucción del parénquima pulmonar, aumento del volumen de placa en las arterias, la fibrosis pulmonar, o formación de granuloma. Una mayor atención a las cuestiones más directas relacionadas con la enfermedad en modelos que se asemejan mucho al patrón de enfermedad humana mejoraría la utilidad de los modelos in vivo.

Dado que los modelos in vitro demuestran ser los que más útiles para estudiar las respuestas mecánicas, tales como los inicios de efectos inflamatorios o genotoxicidad, sería de interés para la interpretación de los resultados si los estudio in vivo pudieran también abarcar en mayor medida los aspectos mecanicistas, para descubrir una posible coherencia de los resultados con los estudios in vitro. Mientras la relación entre algunos extremos in vitro, especialmente en lo que se refiere a la genotoxicidad e indicadores de desarrollo y enfermedad del cáncer, han sido establecidos; con respecto a otras conclusiones, esta relación no se ha desarrollado completamente. Modelos in vitro mejorados que tratan de cubrir este campo deben aún desarrollarse más.

Los modelos in vitro han demostrado ser útiles en el estudio de la importancia en el tamaño de partículas y sus componentes. Por ejemplo, la fracción ultrafina de estas partículas muestra más toxicidad a concentraciones de masa iguales en comparación con las partículas más grandes, debido a su mayor reactividad, área de superficie y número de partículas sobre una base de masa. Además, una coherencia de ciertos efectos celulares in vitro y las respuestas en biopsias de voluntarios humanos se ha demostrado en la exposición a partículas de escape de diesel [194, 227]. Por otro lado, a veces se utilizan concentraciones muy altas en los modelos in vitro lo que sugiere cautela en la interpretación de los modelos in vitro y señala una vez más a la necesidad del desarrollo de más modelos.

La nanotecnología desarrolla productos con características y propiedades físicas y químicas diferentes, que también se utilizan en una variedad de áreas tales como el diagnóstico, imágenes, administración de medicamentos, las tecnologías de la información y la tecnología de la comunicación; el uso extensivo en los productos de

consumo e industriales apenas está comenzando a emerger [87]. Así, de cara a enfrentarse a esta variación del tipo de material y uso, actividad ...los estudios in vitro serán de ayuda [87].

El aumento del riesgo de enfermedades respiratorias y cardiovasculares requiere la realización de estudios toxicológicos adicionales y la implantación de medidas específicas que deben adoptarse en materia de medio ambiente y NP de ingeniería de nuevo desarrollo.