CONAMA 2026

Biosensor de contaminantes atmosféricos asociados al cambio climático

Edita: Fundación Conama

Año: 2026

Este documento está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.

Personas autoras de la presente comunicación técnica

Autor Principal de la comunicación: Dr. Eduardo Pinilla-Gil, Catedrático de Universidad, Departamento de Química Analítica, Universidad de Extremadura.

Otros Autores:

- Dr. Francisco de Asís Iñesta Vaquera, Profesor Permanente Laboral, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Universidad de Extremadura.
- Dr. Jaime Correa Bordes, Profesor Titular, Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura.
- Dr. Ángel Emilio Martínez de Alba, Profesor Permanente Laboral, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Universidad de Extremadura.
- Mohamed Boulerhcha Rahmani, Personal Científico Investigador, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Universidad de Extremadura.

Índice

1. Resumen 1
2. Introducción 2
3. Objetivos 8
4. Metodología 10
5. Resultados 15
6. Agradecimientos 18
7. Bibliografía 18

1. Resumen

El cambio climático se ha convertido en el mayor reto para la salud humana en el siglo XXI. Sus efectos influyen en parámetros de los que dependen los ecosistemas y la salud poblacional, tanto directa como indirectamente. Los principales efectos del cambio climático son el aumento de la temperatura global y el empeoramiento de la calidad del aire por la alteración atmosférica. En estas condiciones pueden aumentar los niveles de gases tóxicos como el ozono (O_3), mientras que los cambios en los patrones de viento pueden producir altas concentraciones localizadas de O_3 e incrementos de material particulado (PM). Este incremento de contaminantes atmosféricos intensifica las afecciones cardiorrespiratorias y el número de muertes durante las olas de calor. Desafortunadamente, las estimaciones epidemiológicas indican que el cambio climático continuará empeorando la calidad del aire en los próximos años debido a la persistencia de las emisiones que lo causan. En particular se prevé un aumento de los niveles de químicos precursores del O_3 (ciudades, masa forestal) y material particulado (transporte, advecciones de polvo sahariano). Por tanto, es necesario desarrollar tecnologías que mejoren la estimación de la calidad del aire y ayuden a implementar la estrategia necesaria para prevenir sus efectos sobre la salud. Las autoridades nacionales han desarrollado un sistema de alertas para reducir la exposición poblacional a contaminantes ligados al cambio climático (PM_{10} / O_3). Sin embargo, la infraestructura actual encargada de cuantificar las concentraciones de estos contaminantes carece de suficiente resolución espacial y no informa sobre su potencial tóxico. Esta deficiencia disminuye la efectividad de las medidas proyectadas, con el correspondiente impacto en salud y económico. Para solucionar este problema, nuestro proyecto desarrollará biosensores de bajo coste para evaluar la calidad del aire y su potencial tóxico en tiempo real y a escala local. Estos biosensores apoyan el concepto de ”Smart Cities” porque serán diseñados para desplegarse en entornos donde no hay estaciones fijas de monitorización de la calidad del aire, particularmente en núcleos urbanos. Por tanto, nuestros biosensores contribuirán a generar una administración municipal más interactiva y unos espacios públicos más seguros gracias a la gestión precisa (áreas afectadas, nivel de alarma, identificación de poblaciones vulnerables) de las alertas sanitarias debidas a los efectos del cambio climático sobre la calidad del aire.

2. Introducción

2.1. Influencia del cambio climático en la calidad del aire de Extremadura: aumento de O_3 y material particulado.

El cambio climático afecta a la calidad del aire a través de varios mecanismos. Estos mecanismos pueden ser directos: alteraciones en la temperatura (olas de calor), tendencias de precipitación (inundaciones, sequías) y/o movimientos atmosféricos; o indirectos: efectos en los procesos de generación, transporte, transformación y deposición de contaminantes atmosféricos. Esta combinación resulta en una alta variabilidad de la distribución espacial y temporal de las concentraciones de contaminantes atmosféricos, y en consecuencia de los efectos del cambio climático sobre los seres humanos y ecosistemas **(Afifa et al., 2024; Ebi & McGregor, 2008)**.

En general, los estudios que examinan las interacciones entre cambio climático, contaminación del aire y salud humana miden la concentración de dos contaminantes principales: ozono troposférico y material particulado (PM) en suspensión **(Nolte et al., 2018)**. Extremadura es particularmente vulnerable a estos dos contaminantes. El cambio climático genera un aumento de las concentraciones de ozono troposférico debido a incrementos en la radiación solar, temperaturas más cálidas, un aumento de las emisiones de NOx (precursores de O_3) y un aumento de compuestos orgánicos volátiles biogénicos **(Nolte et al., 2018; Dawson et al., 2007)**. Además, el ozono es relativamente estable y puede ser transportado desde sus puntos de emisión a otras regiones distantes donde también afecta a la calidad del aire. Según informes de la Agencia Europea del Medio Ambiente sobre la calidad del aire en Europa **(European Environment Agency, 2024)**, un 95% de la población europea ya está expuesta a niveles de O_3 superiores al valor objetivo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para protección de la salud. Las regiones del sur, y especialmente la cuenca mediterránea, son las zonas más expuestas a la contaminación por O_3 en Europa **(Achebak et al., 2024)**, donde las condiciones meteorológicas predominantes en temporadas cálidas del año, las características de su orografía y su vegetación, junto a una mayor incidencia solar, son favorables para su producción y acumulación. España, y en particular Extremadura, tienen un mayor riesgo de exposición a la contaminación por ozono debida al cambio climático **(Achebak et al., 2024)**. De hecho, en el documento generado por el Ministerio para la Transición Ecológica (MITECO), “Bases científicas para un Plan Nacional de Ozono”

(MITECO, 2025) se observa que Extremadura supera asiduamente los valores normativos de O_3 de protección a la salud de la OMS, con un número de superaciones anuales de 40 días/año, cuando el objetivo máximo es de 25 días/año. Además, también es más frecuente el número de días que se superan los valores en los que se debe informar a la población (180 μg m^{-3}), con ~4 dias/año **(European Environment Agency, 2024)**.

El cambio climático también está impulsando la expansión de la superficie mundial de superficie árida, el aumento de los episodios de sequía y mayor frecuencia de incendios forestales **(Querol et al., 2019a; Paniagua et al., 2019**). Estudios realizados en Extremadura prevén que las condiciones de aridez aumenten progresivamente y que nuestra región se convierta predominantemente en semiárida a mediados de este siglo. Por tanto, Extremadura presenta un mayor riesgo de incremento de concentración de PM debido al cambio climático **(Moral et al., 2023).** Además, Extremadura se sitúa entre las regiones afectadas por advecciones de polvo del Sáhara, un contribuyente estable a la concentración de partículas atmosféricas **(Millán-Martínez et al., 2021)**. Otros contribuyentes al aumento de PM incluyen las alteraciones en el movimiento atmosférico y las tendencias de precipitación debido al cambio climático o los cambios en la distribución del tamaño y química de las partículas en suspensión. Por ejemplo, el aumento de las temperaturas puede provocar un cambio en la distribución del tamaño de las partículas hacia las fracciones más pequeñas, provocando un incremento en la fracción inhalable de partículas y una mayor deposición en los pulmones **(Chang et al., 2023)**. Además, el incremento de temperatura impulsa la formación de componentes reactivos del PM, tales como aerosoles orgánicos secundarios (SOA) mediante la oxidación de compuestos orgánicos volátiles provenientes de las emisiones urbanas y la flora **(Offer et al., 2022)**.

2.2. Potencial tóxico del ozono y material particulado: estrés oxidativo y enfermedad cardiorrespiratoria.

Los estudios epidemiológicos demuestran que la exposición a ozono y material particulado tiene un impacto sobre la morbilidad y la mortalidad humanas con afectaciones en los aparatos respiratorio y cardiovascular (OMS, 2013). Entre el 40% y el 60% de las muertes debidas a la contaminación del aire se atribuyen a enfermedades cardiovasculares y respiratorias **(Chen et al., 2024)**. Además, estas afectaciones se producen tanto tras exposiciones episódicas (altas concentraciones en periodos cortos de tiempo) como crónicas

(niveles moderadamente altos a lo largo de periodos de tiempo prolongados). Durante las olas de calor se observan incrementos de las enfermedades cardiorrespiratorias debido a la combinación de mayor concentración de partículas y nivel de ozono. Las personas mayores de 65 años representan un grupo especialmente vulnerable en estas condiciones, pues tienen un mayor riesgo de hospitalización por infarto agudo de miocardio, arteriosclerosis coronaria y enfermedad cardíaca pulmonar cuando se exponen simultáneamente a altas temperaturas y ozono **(Koken et al., 2003)**. Este grupo vulnerable es especialmente relevante en la población de Extremadura debido al envejecimiento de su población **(Carnes et al., 2014)**.

Los efectos del O_3 en la salud se han estudiado con detalle debido su toxicidad sobre los seres humanos y los ecosistemas naturales **(Mustafa, 1990; Zhang et al., 2019).** El O_3 produce efectos tóxicos, particularmente en el pulmón, a corto plazo. El daño biológico producido por el O_3 se debe principalmente a su capacidad oxidativa de biomoléculas, ya sea por reacción directa o mediante la formación de radicales libres e intermediarios reactivos, entre otros **(Mustafa, 1990; Wright et al., 1990)**. El estrés oxidativo es también uno de los principales mecanismos de toxicidad de la PM **(Øvrevik, 2019)**. Muchos de los compuestos que forman estas partículas ambientales tienen propiedades prooxidantes, tales como las especies metálicas solubles, los compuestos orgánicos oxidados o los derivados de las reacciones de los óxidos de nitrógeno. La naturaleza prooxidante de estos contaminantes impulsa las reacciones de los radicales libres. Como consecuencia, la exposición a estos contaminantes da lugar a estrés oxidativo en el pulmón que, junto a los efectos de otros componentes, desencadena respuestas celulares como la afluencia de células inflamatorias al pulmón. Esta serie de eventos causan un extenso daño celular que desemboca en las patologías observadas a nivel poblacional **(Lodovici & Bigagli, 2011; Zheng et al., 2020; Miller, 2020)**.

Si bien el estrés oxidativo es uno de los principales tipos de daño molecular asociado a estos contaminantes atmosféricos asociados al cambio climático, aun no existen dispositivos que midan la capacidad oxidante de estos contaminantes en tiempo real, en entornos reales de exposición. Además, las estaciones de seguimiento de la calidad del aire solo miden la concentración de partículas (masa de PM / volumen de aire), lo que es insuficiente para estimar la capacidad oxidante atmosférica. Por tanto, se requieren nuevos dispositivos que puedan medir este potencial oxidativo para monitorizar eficazmente la calidad del aire.

2.3. Utilidad de los biosensores para estimar el potencial tóxico de los contaminantes atmosféricos.

Para desarrollar estrategias adecuadas de protección ambiental es necesario conocer cómo y cuándo los contaminantes atmosféricos afectan a la salud **(Querol et al., 2019b)**. Como hemos comentado, actualmente la determinación de los niveles atmosféricos de O_3 y PM se basa en mediciones estandarizadas y certificadas con equipos sofisticados que se instalan dentro de estaciones de referencia. Estas estaciones consisten en cabinas antivandálicas dotadas de aire acondicionado, ubicadas en puntos de especial interés y los equipos que incluyen cumplen con los requisitos de calidad de los datos establecidos en la Directiva Europea de Calidad del Aire (2024/2881). Sin embargo, estas estaciones conllevan algunos inconvenientes, como la falta de representatividad que se deriva de la muy limitada resolución espacial de los datos que proporcionan debido a su elevado coste de instalación y de mantenimiento, encontrándose a menudo alejadas de las principales poblaciones de un territorio. Esta limitación es especialmente relevante en compuestos relacionados con el PM, pues pueden tener una variabilidad espacial y temporal muy alta dentro de una ciudad o barrio **(Mansha et al., 2012)**. Además, los datos obtenidos de las mediciones individuales de cada contaminante no informan sobre el potencial tóxico global que se registra en un territorio determinado. Por ejemplo, actualmente se registra la concentración de sustancias prooxidantes como el O_3 o la concentración de PM, sin embargo, los datos obtenidos no informan sobre si la sinergia de ambos contaminantes y/o el efecto de otros parámetros atmosféricos (temperatura, diferencias en composición de partículas) pudiese agravar sus efectos tóxicos **(Daellenbach et al., 2020)**. Para contribuir a solucionar este problema, en este proyecto estamos desarrollando un dispositivo biosensor que pueda informar sobre el daño biológico debido a estrés oxidativo inducido por contaminación atmosférica, de forma descentralizada y con instrumentación portátil. Se espera que la información generada ofrezca una novedosa dimensión biológica en la medición de calidad del aire, complementando los registros actuales para gestionar de manera inteligente el sistema de alarmas asociadas a calidad del aire y el análisis de su impacto global sobre la salud poblacional **(Kuula et al., 2022).**

Los avances recientes en tecnologías de biosensores y la disponibilidad de dispositivos portátiles brindan nuevas oportunidades para la medición móvil y el establecimiento de redes de sensores fijos más densas en lugares de especial interés para las administraciones públicas y para otros grupos de interés. En particular, nuestro biosensor

miniaturizado y de bajo coste representaría una solución novedosa para la medición del potencial tóxico de contaminantes ambientales **(Justino et al., 2017**). La tecnología de biosensores está basada en herramientas biotecnológicas para el reconocimiento de analitos específicos, así como para la generación de señales analíticas, complementando a los detectores tradicionales. Por ejemplo, los biosensores se utilizan regularmente para estimar la presencia de elementos químicos contaminantes en muestras de aguas **(Martin-Yken, 2020; Podola et al., 2004).** Los biosensores emplean un sistema biológico (moléculas, macromoléculas o células procariotas o eucariotas) para detectar elementos y compuestos químicos, o para cuantificar efectos adversos de estas sustancias sobre sistemas celulares (p.ej. daño oxidativo). Los biosensores operan por conexión del detector con elementos tecnológicos transductores de la señal, que produce señales detectables, cuantificables y compartibles con redes informáticas **(Adeniran et al., 2015)**. Los biosensores presentan ciertas ventajas sobre los sensores físicos y químicos tradicionales, ya que son renovables, altamente selectivos, fáciles de fabricar y relativamente económicos. Los biosensores electroquímicos además tienen ventajas como la rapidez de la respuesta y la insensibilidad a interferencias de la matriz de muestras complejas **(Wahid et al., 2023)**.

Las levaduras se han utilizado extensamente para el desarrollo de biosensores ambientales **(Martin-Yken, 2020)**. Estos organismos eucariotas presentan ventajas importantes, incluyendo la capacidad para detectar y responder a una amplia variedad de estímulos ambientales mediante rutas bioquímicas de transducción de señales similares a las de los mamíferos. El uso de levaduras es ventajoso frente al uso de otros sistemas (p. ej. células humanas), porque son fáciles de obtener, son genéticamente homogéneas y de genoma definido. Además, no requieren pasos de diferenciación celular y no generan cuestiones bioéticas. También es destacable su alta viabilidad en condiciones reales y prolongadas de exposición. Por ejemplo, las células de mamífero crecen a una temperatura óptima de 37°C, frente a los 28°C de las levaduras. Por tanto, constituyen excelentes modelos para evaluar y cuantificar el efecto de sustancias contaminantes sobre sistemas biológicos **(Vopálenská et al., 2015)**. Además, pueden congelarse o deshidratarse para fines de almacenamiento y transporte. Estas ventajas han hecho que levaduras acopladas a transductores electrónicos se utilicen para detectar compuestos orgánicos biodegradables y toxinas **(Jarque et al., 2016).**

2.4. Desarrollo de biosensores basado en biomarcadores de potencial oxidativo atmosférico.

En este proyecto estamos desarrollando un novedoso biosensor que permitirá determinar el impacto de la capacidad oxidante atmosférica sobre los sistemas biológicos. En particular, utilizaremos una combinación de instrumentación de captación de partículas/gases atmosféricos (O_3 y PM_{10}) acoplado a levaduras que expresarán moléculas reporteras tras detectar daño oxidativo por exposición a esos contaminantes. Nuestro grupo de investigación multidisciplinar tiene una dilatada experiencia en el desarrollo de sensores portátiles para la medición de contaminantes atmosféricos **(Carretero-Peña et al., 2019; Rueda-Holgado et al., 2012; Palomo Marín et al., 2011)**, el estudio de los mecanismos de señalización celular en levaduras **(Campos et al., 2023; Gutiérrez-Escribano et al., 2012)** así como en el análisis toxicológico molecular de las respuestas celulares a contaminantes ambientales **(Inesta-Vaquera et al., 2023; Inesta-Vaquera et al., 2021)**. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación ha desarrollado sensores químicos para detectar la presencia de contaminantes como Hg, Pb o PM_{10} en muestras ambientales **(Carretero-Peña et al., 2019)**. Algunos de estos sensores están basados en mediciones voltamperométricas, que son particularmente adecuadas para aplicaciones de campo debido al uso de instrumentación simple, de pequeño tamaño, bajo costo y fácil de operar **(Rueda-Holgado et al., 2012)**. Desde la llegada de electrodos serigrafiados (fabricados con todo tipo de materiales de electrodo simples y modificados) y potenciostatos miniaturizados, se han descrito una variedad de protocolos y dispositivos analíticos orientados a mediciones ambientales. Nuestro grupo de investigación ha usado esta tecnología para la monitorización *in situ* de metales pesados (p.ej. cobre) en deposiciones atmosféricas muestreadas en zonas industriales. También hemos desarrollado sensores para medir concentraciones ambientales de mercurio.

En estos dispositivos se utilizó, entre otros sistemas, una estrategia en la que el p-aminofenilfosfato (PAPP) actúa como sustrato enzimático para generar p-aminofenol (PAP) por acción de la enzima fosfatasa alcalina. El PAP es fácilmente detectable mediante su corriente de oxidación en un electrodo de carbón vítreo, como el sistema FIA-EC **(Pinilla Gil et al., 1990**). Por otro lado, poseemos una amplia experiencia en el uso de sistemas celulares y animales “reporteros” para determinar los mecanismos de toxicidad de contaminantes ambientales **(Inesta-Vaquera et al., 2023; Inesta-Vaquera et al., 2022; Iñesta Vaquera et al., 2022)**. Mediante el uso de estas herramientas reporteras hemos estudiado los

mecanismos de toxicidad de un amplio rango de contaminantes ambientales, incluyendo arsénico inorgánico, $PM_{2.5}$, PM_{10} o compuestos como el bisfenil policlorinado **(Inesta-Vaquera et al., 2023; Inesta-Vaquera et al., 2022; Iñesta Vaquera et al., 2022)**. Estos reporteros se basan en la síntesis de proteínas que emiten señales de tipo fluorescente, cambios de color o de tipo electroquímico, por ejemplo, una corriente eléctrica (amperometría). A su vez, la síntesis de las proteínas reporteras está controlada por respuestas transcripcionales específicas a estrés por daño oxidativo, activación del sistema inmunitario o del metabolismo de xenobióticos. En particular, nuestros modelos reporteros de estrés oxidativo en mamíferos están basados en la activación de la vía de NRF2, que se encuentra conservada en levaduras por el similar mecanismo de activación y función de Yak1. Estas vías de señalización orquestan la defensa celular frente a daño oxidativo **(Kensler et al., 2007)**. Por tanto, la activación de estas vías de respuesta adaptativa puede servir como un biomarcador de exposición ambientales a agentes prooxidantes **(Inesta-Vaquera et al., 2021; Wang et al., 2006)**. Para el desarrollo del biosensor usaremos levaduras modificadas genéticamente que expresan, en respuesta a estrés oxidativo causado por exposición a O_3 y PM_{10}, una actividad enzimática detectable mediante voltamperometría (fosfatasa alcalina secretable, SEAP). Este dispositivo presenta la ventaja de un bajo coste de producción/análisis de resultados, la ausencia de consideraciones éticas en el manejo del componente biológico y su facilidad de integración en entornos urbanos. Además, podremos comparar el desempeño de este dispositivo con los datos obtenidos por redes de vigilancia de la calidad del aire como la que opera en Extremadura (red REPICA), con la que mantenemos relaciones de colaboración científico-técnica.

3. Objetivos

El objetivo general de esta propuesta es desarrollar un dispositivo biosensor que cuantifique el daño biológico producido por contaminantes atmosféricos asociados al cambio climático. En particular, este proyecto demostrará la utilidad de un nuevo biosensor de daño oxidativo generado por exposición a O_3 y PM_{10}. En el futuro, esta tecnología podría aplicarse para detectar otros contaminantes de interés que posean un mecanismo de acción similar. En particular, los objetivos específicos de este proyecto son:

- **Objetivo específico 1. Generar un sistema reportero de estrés oxidativo en levaduras.**

Este objetivo desarrollará el componente biológico del nuevo dispositivo. Modificaremos la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para que sintetice una molécula reportera de fácil detección tras la activación del factor de transcripción Yap1 por estrés oxidativo. Yap1 es el sensor intracelular específico de respuesta al estrés oxidativo en levaduras y promueve la síntesis de proteínas protectoras frente a este tipo de estrés celular. Los sistemas reporteros dependientes de Yap1 se utilizan a escala comercial para detectar contaminantes prooxidantes en muestras acuáticas.

- **Objetivo específico 2. Acoplar sistema reportero de estrés oxidativo con sistema de detección electroquímica**.

En este objetivo se desarrollará el método voltamperométrico necesario para detectar la actividad reportera SEAP utilizando sistemas miniaturizados, de bajo coste y portátiles. Además, se caracterizará genética y farmacológicamente el biosensor.

- **Objetivo específico 3. Generar dispositivo biosensor para detectar el potencial oxidativo de contaminantes atmosféricos.**

Este objetivo generará un dispositivo portable y de bajo coste que fusiona el biosensor encapsulado, el sistema de medida voltamperométrica y otros componentes para detectar de manera específica el potencial oxidativo de O_3 o PM_{10} atmosféricos. Para ello, acoplaremos un impactador húmedo (midget impinger) a una bomba de muestreo en dos configuraciones posibles. Una con un filtro para materia particulada PM_{10} y otra con un filtro antipartículas para permitir exclusivamente la entrada de gases. Esta configuración de componentes es similar a la de otros dispositivos utilizados en muestreos ambientales, asegurando que los resultados puedan ser comparados con datos obtenidos por sistemas oficiales de medida de calidad atmosférica.

4. Metodología

OE1. Generar un sistema reportero de estrés oxidativo en levaduras.

- OE 1.1. Establecer un reportero de estrés oxidativo en *S. cerevisiae* basado en la vía de respuesta a estrés oxidativo de Yap1.

Para establecer un sistema de detección de estrés oxidativo compatible con medidas voltamperométricas, partiremos de la cepa de *S. cerevisiae* tipo A y fondo genético S288C (ATCC:4040002). Se ha demostrado que estas células responden adecuadamente a estímulos de estrés oxidativo mediante la vía de Yap1. Sin embargo, se requiere optimizar la exposición a prooxidantes y su posterior detección con el plásmido p5XUAS-pTRX2-mC, que contiene el promotor génico *TRX2* y dos sitios de unión a Yap1 que controlan la expresión de la proteína fluorescente mCherry. Este plásmido está disponible en el repositorio público Addgene (número 124708). Como paso inicial, cultivos en suspensión de *S. cerevisiae* transformadas con este plásmido y en fase de crecimiento exponencial se expondrán a compuestos químicos con contrastada actividad prooxidante y siguiendo un sistema de dosis y tiempo respuesta. Algunos de estos compuestos son el peróxido de hidrógeno, 1,4-naftoquinona, diamida y ter-butilo hidroperóxido. A diferentes tiempos tras la exposición se medirán en alícuotas de estos cultivos la densidad óptica (600nm; indica viabilidad celular) en espectrofotómetro convencional (disponible en nuestro laboratorio) y fluorescencia (mCherry, ex. 587nm/ em. 610nm) mediante citometría de flujo (disponible en el servicio técnico de apoyo la biociencia, STAB; UEx). Como control de respuesta del sistema reportero, tras los tratamientos indicados anteriormente se medirá mediante citometría de flujo la presencia de moléculas prooxidantes en las células usando sondas fluorescentes activadas por estrés oxidativo. Estas sondas incluirán a DCFH-DA, HE, que pueden oxidarse por un amplio espectro de tipos de especies reactivas del oxígeno (ROS). En cada ensayo de activación del reportero mediante inductores de ROS, se calcularán los siguientes parámetros: rango dinámico de activación, definido como el grado de activación de la actividad reportera en presencia de la concentración más alta del agente inductor de ROS utilizada que no comprometa la viabilidad celular frente a señal basal; el límite de detección, concentración más baja de agente inductor de ROS necesaria para obtener una expresión relativa del reportero dos veces superior a la actividad basal; la sensibilidad del ensayo, cálculo del coeficiente de Hill.

- OE 1.2. Establecer un nuevo sistema reportero de estrés oxidativo en *S. cerevisiae* compatible con medidas voltamperométricas (p5XUAS-pTRX2-SEAP).

La proteína fosfatasa alcalina embriónica secretada (SEAP, por sus siglas en inglés) es ampliamente utilizada como molécula reportera en células humanas. Esto es debido a su actividad fosfatasa sobre sobre sustrato sintéticos, como el p-nitrofenil fosfato (PNPP) o el p-aminofenil fosfato (PAPP). Este último se transforma a p-aminofenol (PAP), un compuesto electroactivo fácilmente detectable mediante técnicas de voltamperometría (disponibles en nuestro laboratorio. Además, la proteína SEAP confiere una serie de ventajas experimentales: no requiere lisis celular para su detección; permite tiempos más largos de exposición ambiental; posee alta estabilidad térmica (hasta los 65 ºC). Adicionalmente, la enzima SEAP tiene resistencia al inhibidor L-homoarginina, lo que permite discriminar farmacológicamente las señales obtenidas con respecto a otras actividades fosfatasas que las células puedan poseer. En este proyecto insertaremos el gen que expresa SEAP bajo el control del promotor *5XUAS-pTRX2*, convirtiendo a la proteína SEAP en un biomarcador secretable de estrés oxidativo. La secuencia para la proteína SEAP se obtendrá del plásmido TRE-SEAP (Addgene, 210511). Mediante técnicas de biología molecular estándar, sustituiremos la proteína fluorescente mCherry del OE 1.1. por la secuencia SEAP. De esta manera, se generará el plásmido p5XUAS-pTRX2-SEAP, que se integrará posteriormente en el locus ARG5,6 del genoma de la levadura (zona menos compactada y que facilita expresión heteróloga). Además, debido a que la cepa S288C es prototrofa, incluiremos un marcador de selección de resistencia a antibióticos tipo kanamicina (KAN). Como control preliminar, hemos constatado que *S. cerevisiae* no posee actividad fosfatasa en su pared celular o secretable que pueda interferir con las medidas de la actividad SEAP.

- OE 1.3. Optimización de expresión del sistema reportero de estrés oxidativo *5XUAS-pTRX2-SEAP* en condiciones de exposición ambiental.

Finalmente, se estudiará la expresión de *SEAP* en aquellas condiciones de cultivo que pueden verse alteradas durante la exposición ambiental. Para ello, mediremos la síntesis de SEAP como en los apartados anteriores, pero teniendo en cuenta las siguientes variables: crecimiento exponencial o estacionario; estabilidad del sistema de detección de estrés redox a lo largo del tiempo (días) en cultivo; expresión del reportero en exposición crónica y baja concentración de contaminantes; rango de temperaturas que permiten la viabilidad del cultivo; efecto del flujo de aireación (rango 0.5 – 5 litros/min) sobre la viabilidad celular. Igualmente,

contemplaremos si otras variables, como son diferentes sustratos de crecimiento (p.ej. Al_2O_3), antibióticos (p.ej. bactericidas), pudiesen resultar beneficiosas en la adaptación de las levaduras a las condiciones reales de exposición atmosféricas.

OE2. Acoplar sistema reportero de estrés oxidativo con sistema de detección electroquímico.

- OE 2.1. Optimización de medidas amperométricas.

Nuestro método se basa en la capacidad de electrodos serigrafiados de carbono o de otros materiales (elementos de bajo coste, disponibles comercialmente a un precio aproximado de 2 € por unidad) para detectar las corrientes de oxidación del PAP. En primer lugar, utilizaremos fosfatasa alcalina recombinante (E.C. 3.1.3.1; Merck) para la puesta a punto del método. Para ello, en tubos tipo eppendorf se dispondrán cantidades conocidas de enzima y diferentes concentraciones (rango mM) del sustrato sintético PAPP. Tras 15 minutos (incubación estándar en ensayos de fosfatasa alcalina), se detectará la oxidación del PAP (potencial de aproximadamente 0,1 V vs Ag/AgCl) usando potenciostatos portátiles PalmSens y DropSens, disponibles en nuestro laboratorio. Priorizaremos el empleo de nuestro potenciostato PalmSens modelo Sensit Smart, del tamaño de un pendrive, y conectable a un teléfono tipo smartphone. En el teléfono se instala la aplicación necesaria para la operación del potenciostato, así como para la captura y gestión de las señales analíticas. Para asegurarnos que las condiciones de detección por amperometría son idóneas, se optimizarán diferentes variables, tales como la estabilidad de la señal amperométrica en diferentes soluciones tampón, temperatura y pH (p.ej. 2-etilamino etanol, carbonato amónico, ácido oxálico, carbonato amónico). Se optimizarán también la gestión y transmisión de los datos obtenidos por el terminal móvil.

- OE 2.2. Captación de señal voltamperométrica emitida por biosensor.

Una vez desarrollados tanto el componente biosensor (OE1) como el reactivo y elementos de detección (OE 2.1.), estudiaremos la expresión de SEAP en levaduras creciendo en suspensión y expuestas a compuestos químicos prooxidantes. Tras diferentes tiempos de incubación, volúmenes crecientes (20 – 200 µL) del cultivo del biosensor, o tras centrifugación para eliminar levaduras, se colocarán directamente en la superficie del electrodo. Alternativamente se estudiará también la colocación de la muestra en una zona próxima al electrodo desde donde se pueda producir la difusión del analito y en contacto con el medio

que contiene el sustrato de reacción. Se explorará la configuración óptima para conseguir maximizar la relación señal / ruido y minimizar el efecto de las posibles interferencias. Por ejemplo, tiempo de incubación en el electrodo o la ratio cultivo/volumen de reacción. De nuevo, será necesario asegurar una correcta gestión y transmisión de datos obtenidos por el terminal móvil.

- OE 2.3. Caracterización genética y farmacológica del nuevo biosensor de estrés oxidativo.

Para determinar la especificidad biológica de la señal recogida por nuestro detector, se utilizarán aproximaciones farmacológicas y genéticas. Para ello se incubará el biosensor con compuestos que incrementan las defensas celulares antioxidantes (tales como n-acetil cisteína o GS-etil éster) o que hagan a las células más sensibles al estrés oxidativo, como BSO (bajan niveles de GSH intracelulares). Tras la incubación con estos compuestos, el biosensor se expondrá a H_2O_2 y se medirá tanto la viabilidad (absorbancia) como la actividad SEAP (amperometría). Para confirmar que la señal detectada proviene de la fosfatasa inducible SEAP, se estudiaran las señales provenientes de levaduras control (no transformadas) o levaduras biosensor incubadas con el inhibidor de fosfatasa alcalina L-homoarginina, que no afecta a SEAP. Para obtener evidencia genética de que las señales obtenidas con el biosensor son debidas a estrés oxidativo, se reproducirá el biosensor *5XUAS-pTRX2-SEAP* en un fondo genético deficiente en *Yap1*. Para ello, mediante técnicas de Crispr-Cas9 se eliminará el gen *Yap1* del genoma celular. Se expondrán a H_2O_2 células biosensor de tipo salvaje o células biosensor *Yap1*-/- en condiciones previamente optimizadas, y se medirá la actividad fosfatasa por expresión de genes relacionados con la activación de Yap1 mediante amperometría.

OE 3. Generar dispositivo biosensor para detectar el potencial oxidativo de contaminantes atmosféricos.

- OE 3.1. Encapsulación de biosensor en el impactador para exposición a condiciones reales atmosféricas.

Utilizaremos impactadores estándar de bajo coste (midget impinger; disponibles en nuestro laboratorio) (Sigma, 20270-U) y que pueden contener hasta 25 mL de cultivo de biosensor. Este impactador tiene la ventaja de poder acoplarse a periféricos comerciales que permitirán construir un dispositivo de detección de la contaminación móvil, específico y

autónomo. Se utilizarán dos configuraciones diferentes. Por un lado, usaremos un cabezal de filtrado para partículas PM_{10} (MCV s.a. según norma UNE-EN12341:2015); Por otro lado, utilizaremos un filtro antipartículas para permitir exclusivamente el paso de gases, como el O_3. Para generar el flujo de aire necesario se utilizará una bomba unida al impactador y adecuada al caudal de operación en cada caso. En ambas configuraciones, el aire del sistema saldrá expulsado a través de un filtro HEPA convencional, lo que asegurará que ningún microorganismo pueda salir del dispositivo. En ambas configuraciones, el biosensor tendrá una exposición directa a la muestra captada por el cabezal correspondiente, facilitando el impacto directo del contaminante con el biosensor. Previo a la exposición con contaminantes en diferentes ambientes (controlados/ambientales), se estudiarán los parámetros de exposición y de configuración del dispositivo que pudiesen afectar a la viabilidad del biosensor o la síntesis basal de la SEAP durante las mediciones. El dispositivo se operará dentro de una campana de flujo laminar vertical para evitar contaminaciones y los parámetros a estudiar serán el volumen inicial de medio de cultivo, la concentración inicial de células y el flujo de entrada de aire al cultivo (utilizando difusores para corregir el caudal entorno a los 0.5 – 5 litros por minuto). Alícuotas del biosensor se extraerán tras diferentes tiempos (horas/días) de operación y se medirá la densidad óptica (crecimiento celular) y síntesis de SEAP mediante voltamperometría. Para estudiar el mantenimiento de las condiciones de asepsia del impactador, se operará unido al filtro de partículas o cabezal de PM_{10} en aire no filtrado de laboratorio. En caso de contaminación, se estudiarán diferentes combinaciones de antibióticos.

- OE 3.2. Exposición controlada de dispositivo biosensor encapsulado a O_3 y PM_{10} y prueba piloto de campo.

El biosensor encapsulado en midget impinger se expondrá en condiciones controladas de laboratorio a concentraciones conocidas de O_3 y PM_{10}. En primer lugar, se acoplará mediante tubos de teflón un equipo generador de ozono (2B Technologies, Modelo 714) a la entrada de aire con filtro antipartículas y tras ajustar el caudal de aire se expondrá el biosensor a concentraciones crecientes (25-250 µg m^{-3}) y durante diferentes tiempos (1-8 h). Nuestros datos preliminares han demostrado que este tipo de exposiciones genera estrés oxidativo en *S. cerevisiae*. Tras la exposición se medirá tanto la viabilidad celular como la actividad SEAP con la metodología descrita. Posteriormente, el biosensor se expondrá directamente a concentraciones crecientes de partículas tomadas del material de referencia certificado de

PM_{10} NIST SRM1648a (disponibles en nuestro laboratorio). De nuevo, se cuantificarán tras diferentes tiempos la viabilidad celular y la actividad SEAP. Si fuese necesario, como control a ambas exposiciones, utilizaremos compuestos químicos que generen estrés oxidativo según las optimizaciones realizadas en el OE1.

- OE 3.3. Bioequivalencia entre sistemas reporteros.

Los diferentes sistemas y/o modelos biológicos muestran discrepancias en su sensibilidad a exposiciones ambientales. Para establecer una equivalencia de sensibilidad entre nuestro biosensor y reporteros biológicos basado en células de mamífero, compararemos la activación de nuestro biosensor con la respuesta a estrés oxidativo del reportero celular humano MCF-AREc32. Este sistema reportero se ha utilizado ampliamente en nuestras investigaciones y en otros laboratorios. La línea celular MCF7-AREc32 contiene una enzima reportera (luciferasa) bajo la regulación del promotor reconocido por NRF2, uno de los principales sensores de estrés oxidativo en mamíferos y de funciones homólogas a Yak1 de levaduras. Se expondrán cultivos celulares de nuestro biosensor y MCF7-AREc32 en paralelo, en experimentos de dosis y tiempo respuesta, a compuestos químicos prooxidantes previamente caracterizados (OE1). Estos incluyen H_2O_2, y también contaminantes provenientes de partículas del diésel (3NFA) previamente caracterizados en nuestras publicaciones (Inesta-Vaquera et al., 2023). La expresión del reportero *NRF2* se medirá mediante ensayos luciferasa en luminómetro disponible del STAB mediante kits disponibles comercialmente (Promega).

5. Resultados

Objetivo específico 1. Actualmente se está llevando a cabo la reestructuración de los plásmidos que alojarán el inserto del gen reportero *SEAP*. Para ello se emplean técnicas de biología molecular, principalmente digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción y análisis de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en geles de agarosa.

Como paso previo al uso del plásmido reportero con *SEAP*, se empleó un sistema reportero análogo basado en GFP para validar que el plásmido responde transcripcionalmente al estímulo oxidativo, de modo que la expresión del gen reportero queda acoplada a la activación

de la vía de Yap1. Con este fin se realizó un ensayo preliminar en el que la cepa BY4741 (WT y Δyap1 (KO), ambas transformadas con el plásmido reportero GFP, se expusieron a 0,2 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La señal de fluorescencia de GFP se utilizó como medida de la inducción del promotor en respuesta al estrés oxidativo, con la cepa Δyap1 como control de dependencia de Yap1.

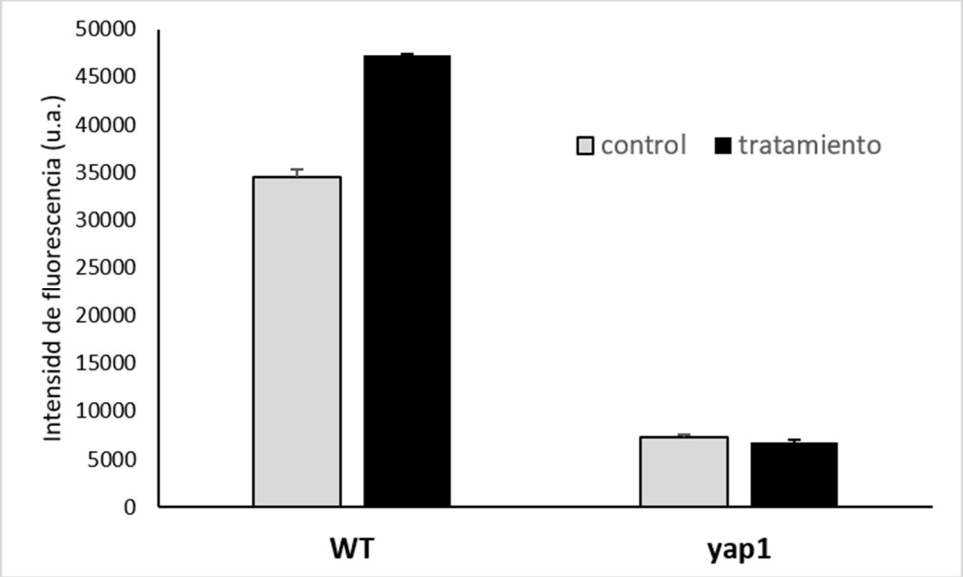


Figura 1. Activación de elemento reportero en S. cerevisiae. Análisis por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia de GFP (unidades arbitrarias) tras la exposición a peróxido de hidrógeno (0,2 mM, 1 hora, 30ºC) de la cepa BY4741 WT y BY4741 Δyap1 (yap1). Las gráficas corresponden a la media geométrica de dos ensayos biológicos independientes y las barras de error a la desviación estándar. Se analizaron 10000 células por cada ensayo.

La exposición a H_2O_2 0,2 mM provocó un aumento de la fluorescencia en el WT. En BY4741 WT la intensidad de fluorescencia aumentó aproximadamente 1,5 veces respecto al control (de ~34.000 a ~47.000). Por el contrario, la cepa BY4741 Δyap1 mostró una fluorescencia baja y sin cambios tras el tratamiento (~6.000), lo que indica que la inducción del reportero depende en gran parte de Yap1. Nuestras primeras experiencias en el fondo genético W303wt indican que esta cepa posee un mayor rango dinámico en la activación del reportero por exposición a H_2O_2 (3.5 veces; resultados preliminares)..

En todo caso, una vez realizado más réplicas del mismo ensayo, estos resultados indican preliminarmente que el plásmido responde al estrés oxidativo de forma dependiente

de Yap1, lo que valida provisionalmente que el sistema GFP como control de funcionamiento y respalda el paso al plásmido con el gen reportero SEAP. De todas maneras, más ensayos con este mismo plásmido con H2O2, dan resultados similares.

Objetivo específico 2. En esta fase se están optimizando y calibrando los parámetros voltamperométricos del sistema de detección. Este trabajo incluye en primer lugar el manejo de las celdas electroquímicas y los electrodos. Por una parte, se está operando con configuraciones de análisis cronoamperométrico por inyección en flujo (FIA) con bomba de HPLC, inyector Rheodyne con bucle de 20 microlitros, y celdas voltamperométricas de flujo perpendicular (wall-jet) y de capa fina (thin layer), habiéndose obtenido mejores resultados con la configuración de capa fina. Por otra parte, se está explorando el rendimiento de configuraciones hidrodinámicas por agitación mecánica en celdas de pozo para electrodos impresos, midiendo igualmente señales cronoamperométricas. Se trabaja también en la optimización de la composición de la fase líquida para la reacción enzimática y para las medidas amperométricas, operándose con etil-amino etanol (EAE) 0,1 M de pH 9,0 como medio óptimo. Se está ensayando el comportamiento amperométrico de distintas concentraciones de PAP (*p*-aminofenol), producto cuya detección permite medir la actividad del reportero *SEAP*. Se estima un límite de detección del orden de 1 micromolar o ligeramente inferior, que debería ser suficiente para la monitorización de la reacción enzimática en las condiciones reales de operación del biosensor. Debido a problemas de degradación del PAP por el oxígeno del aire, se está explorando el p-nitrofenol como analito alternativo, generado a partir de la acción enzimática sobre el p-nitrofenilfosfato **(Fanjul-Bolado et al., 2006)**. Los resultados obtenidos se están analizando e interpretando con el fin de establecer un protocolo definitivo para la ejecución de este objetivo.

Objetivo específico 3. Este objetivo se encuentra pendiente de inicio, por lo que todavía no se dispone de resultados. Su desarrollo está previsto una vez consolidados los avances de los objetivos 1 y 2.

6. Agradecimientos

Este proyecto está financiado por la Junta de Extremadura (Consejería de Educación, Ciencia y Formación Profesional) dentro del programa de actuaciones orientadas al desarrollo y mejora de las capacidades científicas y tecnológicas de los Grupos de Investigación de Extremadura pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación, a través de la línea 2 para proyectos de investigación (código de proyecto IB24068).

La actividad ha sido cofinanciada al 85% por la Unión Europea, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, y la Junta de Extremadura. Autoridad de Gestión: Ministerio de Hacienda.

7. Bibliografía

Achebak, H., Garatachea, R., Pay, M. T., Jorba, O., Guevara, M., Pérez García-Pando, C., & Ballester, J. (2024). Geographic sources of ozone air pollution and mortality burden in Europe. *Nature Medicine, 30*(6), 1732–1738. https://doi.org/10.1038/s41591-024-02976-x

Adeniran, A., Sherer, M., & Tyo, K. E. J. (2015). Yeast-based biosensors: Design and applications. FEMS Yeast Research, 15(1), 1–15. https://doi.org/10.1111/1567-1364.12203

Afifa, Arshad, K., Hussain, N., Ashraf, M. H., & Saleem, M. Z. (2024). Air pollution and climate change as grand challenges to sustainability. Science of the Total Environment, 928, Article 172370. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172370

Campos, A., Ramos, F., Iglesias, L., Delgado, C., Merino, E., Esperilla-Muñoz, A., Correa-Bordes, J., & Clemente-Blanco, A. (2023). Cdc14 phosphatase counteracts Cdk-dependent Dna2 phosphorylation to inhibit resection during recombinational DNA repair. Nature Communications, 14(1), Article 2738. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38417-5

Carnes, B. A., Staats, D., & Willcox, B. J. (2014). Impact of climate change on elder health. The Journals of Gerontology: Series A, 69(9), 1087–1091. https://doi.org/10.1093/gerona/glt159

Carretero-Peña, S., Calvo Blázquez, L., & Pinilla-Gil, E. (2019). Estimation of PM10 levels and sources in air quality networks by digital analysis of smartphone camera

images taken from samples deposited on filters. Sensors, 19(21), Article 4791. https://doi.org/10.3390/s19214791

Chang, J. H., Lee, Y. L., Chang, L. T., Chang, T. Y., Hsiao, T. C., Chung, K. F., Ho, K. F., Kuo, H. P., Lee, K. Y., Chuang, K. J., & Chuang, H. C. (2023). Climate change, air quality, and respiratory health: A focus on particle deposition in the lungs. Annals of Medicine, 55(2), Article 2264881. https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2264881

Chen, Z.-Y., Petetin, H., Méndez Turrubiates, R. F., Achebak, H., Pérez García-Pando, C., & Ballester, J. (2024). Population exposure to multiple air pollutants and its compound episodes in Europe. Nature Communications, 15(1), Article 2094. https://doi.org/10.1038/s41467-024-46103-3

Daellenbach, K. R., Uzu, G., Jiang, J., Cassagnes, L.-E., Leni, Z., Vlachou, A., Stefenelli, G., Canonaco, F., Weber, S., Segers, A., Kuenen, J. J. P., Schaap, M., Favez, O., Albinet, A., Aksoyoglu, S., Dommen, J., Baltensperger, U., Geiser, M., El Haddad, I., . . . Prévôt, A. S. H. (2020). Sources of particulate-matter air pollution and its oxidative potential in Europe. Nature, 587(7834), 414–419. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2902-8

Dawson, J. P., Adams, P. J., & Pandis, S. N. (2007). Sensitivity of ozone to summertime climate in the eastern USA: A modeling case study. *Atmospheric Environment, 41*(7), 1494–1511. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.10.033

Ebi, K. L., & McGregor, G. (2008). Climate change, tropospheric ozone and particulate matter, and health impacts. *Environmental Health Perspectives, 116*(11), 1449–1455. https://doi.org/10.1289/ehp.11463

European Environment Agency. (2024). Europe's air quality status 2024 (Briefing No. 06/2024). https://doi.org/10.2800/5970

Fanjul-Bolado, P., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2006). Flow screen-printed amperometric detection of p-nitrophenol in alkaline phosphatase-based assays. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385, 1202–1208. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0367-8

Gutiérrez-Escribano, P., Zeidler, U., Suárez, M. B., Bachellier-Bassi, S., Clemente-Blanco, A., Bonhomme, J., Vázquez de Aldana, C. R., d'Enfert, C., & Correa-Bordes, J. (2012). The NDR/LATS kinase Cbk1 controls the activity of the

transcriptional regulator Bcr1 during biofilm formation in Candida albicans. PLoS Pathogens, 8(5), Article e1002683. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002683

Inesta-Vaquera, F., Miyashita, L., Grigg, J., Henderson, C. J., & Wolf, C. R. (2023). Defining the in vivo mechanism of air pollutant toxicity using murine stress response biomarkers. Science of the Total Environment, 888, Article 164211. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164211

Inesta-Vaquera, F., Navasumrit, P., Henderson, C. J., Frangova, T. G., Honda, T., Dinkova-Kostova, A. T., Ruchirawat, M., & Wolf, C. R. (2021). Application of the in vivo oxidative stress reporter Hmox1 as mechanistic biomarker of arsenic toxicity. Environmental Pollution, 270, Article 116053. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116053

Inesta-Vaquera, F., Weiland, F., Henderson, C. J., & Wolf, C. R. (2022). In vivo stress reporters as early biomarkers of the cellular changes associated with progeria. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 26(21), 5463–5472. https://doi.org/10.1111/jcmm.17574

Iñesta Vaquera, F., Ferro, F., McMahon, M., Henderson, C. J., & Wolf, C. R. (2022). Potential of in vivo stress reporter models to reduce animal use and provide mechanistic insights in toxicity studies. F1000Research, 11, Article 1164. https://doi.org/10.12688/f1000research.123077.1

Jarque, S., Bittner, M., Blaha, L., & Hilscherova, K. (2016). Yeast biosensors for detection of environmental pollutants: Current state and limitations. Trends in Biotechnology, 34(5), 408–419. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.007

Justino, C. I. L., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Recent progress in biosensors for environmental monitoring: A review. Sensors, 17(12), Article 2918. https://doi.org/10.3390/s17122918

Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47, 89–116. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046

Koken, P. J. M., Piver, W. T., Ye, F., Elixhauser, A., Olsen, L. M., & Portier, C. J. (2003). Temperature, air pollution, and hospitalization for cardiovascular diseases among elderly people in Denver. *Environmental Health Perspectives, 111*(10), 1312–1317. https://doi.org/10.1289/ehp.5957

Kuula, J., Timonen, H., Niemi, J. V., Manninen, H. E., Rönkkö, T., Hussein, T., Fung, P. L., Tarkoma, S., Laakso, M., Saukko, E., Ovaska, A. J. M., Kulmala, M., Karppinen, A., Johansson, L., & Petäjä, T. (2022). Opinion: Insights into updating Ambient Air Quality Directive 2008/50/EC. Atmospheric Chemistry and Physics, 22(7), 4801–4808. https://doi.org/10.5194/acp-22-4801-2022

Lodovici, M., & Bigagli, E. (2011). Oxidative stress and air pollution exposure. Journal of Toxicology, 2011, Article 487074. https://doi.org/10.1155/2011/487074

Mansha, M., Ghauri, B., Rahman, S., & Amman, A. (2012). Characterization and source apportionment of ambient air particulate matter (PM2.5) in Karachi. Science of the Total Environment, 425, 176–183. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.056

Martin-Yken, H. (2020). Yeast-based biosensors: Current applications and new developments. Biosensors, 10(5), Article 51. https://doi.org/10.3390/bios10050051

Millán-Martínez, M., Sánchez-Rodas, D., Sánchez de la Campa, A. M., & de la Rosa, J. (2021). Contribution of anthropogenic and natural sources in PM10 during North African dust events in Southern Europe. *Environmental Pollution, 290*, Article 118065. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118065

Miller, M. R. (2020). Oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. Free Radical Biology and Medicine, 151, 69–87. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.004

MITECO (2025). Bases científicas para un Plan Nacional de Ozono. https://libreria.miteco.gob.es/libro/bases-cientificas-para-un-plan-nacional-de-ozono_3390/

Moral, F. J., Aguirado, C., Alberdi, V., Paniagua, L. L., García-Martín, A., & Rebollo, F. J. (2023). Future scenarios for aridity under conditions of global climate change in Extremadura, southwestern Spain. *Land, 12*(3), Article 536. https://doi.org/10.3390/land12030536

Mustafa, M. G. (1990). Biochemical basis of ozone toxicity. Free Radical Biology and Medicine, 9(3), 245–265. https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90035-H

Nolte, C. G., Spero, T. L., Bowden, J. H., Mallard, M. S., & Dolwick, P. D. (2018). The potential effects of climate change on air quality across the conterminous US at 2030 under three Representative Concentration Pathways. *Atmospheric*

Chemistry and Physics, 18(20), 15471–15489. https://doi.org/10.5194/acp-18-15471-2018

Offer, S., Hartner, E., Di Bucchianico, S., Bisig, C., Bauer, S., Pantzke, J., Zimmermann, E. J., Cao, X., Binder, S., Kuhn, E., Huber, A., Jeong, S., Käfer, U., Martens, P., Mesceriakovas, A., Bendl, J., Brejcha, R., Buchholz, A., Gat, D., . . . Zimmermann, R. (2022). Effect of atmospheric aging on soot particle toxicity in lung cell models at the air–liquid interface: Differential toxicological impacts of biogenic and anthropogenic secondary organic aerosols (SOAs). *Environmental Health Perspectives, 130*(2), Article 027003. https://doi.org/10.1289/EHP9413

Øvrevik, J. (2019). Oxidative potential versus biological effects: A review on the relevance of cell-free/abiotic assays as predictors of toxicity from airborne particulate matter. International Journal of Molecular Sciences, 20(19), Article 4772. https://doi.org/10.3390/ijms20194772

Palomo Marín, M. R., Pinilla Gil, E., Calvo Blázquez, L., & Capelo-Martínez, J. L. (2011). Determination of trace and major elemental profiles in street dust samples by fast miniaturized ultrasonic probe extraction and ICP-MS. Talanta, 84(3), 840–845. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.012

Paniagua, L. L., García-Martín, A., Moral, F. J., & Rebollo, F. J. (2019). Aridity in the Iberian Peninsula (1960–2017): Distribution, tendencies, and changes. *Theoretical and Applied Climatology, 138*(1–2), 811–830. https://doi.org/10.1007/s00704-019-02866-0

Pinilla Gil, E., Tang, H. T., Halsall, H. B., Heineman, W. R., & Sánchez Misiego, A. (1990). Competitive heterogeneous enzyme immunoassay for theophylline by flow-injection analysis with electrochemical detection of p-aminophenol. Clinical Chemistry, 36(4), 662–665. https://doi.org/10.1093/clinchem/36.4.662

Podola, B., Nowack, E. C. M., & Melkonian, M. (2004). The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. Biosensors and Bioelectronics, 19(10), 1253–1260. https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.11.015

Querol, X., Pérez, N., Reche, C., Ealo, M., Ripoll, A., Tur, J., Pandolfi, M., Pey, J., Salvador, P., Moreno, T., & Alastuey, A. (2019a). African dust and air quality over Spain: Is it only dust that matters? Science of the Total Environment, 686, 737–752. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.349

Querol, X., Tobías, A., Pérez, N., Karanasiou, A., Amato, F., Stafoggia, M., Pérez García-Pando, C., Ginoux, P., Forastiere, F., Gumy, S., Mudu, P., & Alastuey, A. (2019b). Monitoring the impact of desert dust outbreaks for air quality for health studies. Environment International, 130, Article 104867. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.061

Rueda-Holgado, F., Bernalte, E., Palomo-Marín, M. R., Calvo-Blázquez, L., Cereceda-Balic, F., & Pinilla-Gil, E. (2012). Miniaturized voltammetric stripping on screen printed gold electrodes for field determination of copper in atmospheric deposition. Talanta, 101, 435–439. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.054

Vopálenská, I., Váchová, L., & Palková, Z. (2015). New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells. Biosensors and Bioelectronics, 72, 160–167. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.006

Wahid, E., Ocheja, O. B., Marsili, E., Guaragnella, C., & Guaragnella, N. (2023). Biological and technical challenges for implementation of yeast-based biosensors. Microbial Biotechnology, 16(1), 54–66. https://doi.org/10.1111/1751-7915.14183

Wang, X. J., Hayes, J. D., & Wolf, C. R. (2006). Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of Nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. Cancer Research, 66(22), 10983–10994. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2298

Wright, E. S., Dziedzic, D., & Wheeler, C. S. (1990). Cellular, biochemical and functional effects of ozone: New research and perspectives on ozone health effects. Toxicology Letters, 51(2), 125–145. https://doi.org/10.1016/0378-4274(90)90206-2

Zhang, J. J., Wei, Y., & Fang, Z. (2019). Ozone pollution: A major health hazard worldwide. Frontiers in Immunology, 10, Article 2518. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02518

Zheng, F., Gonçalves, F. M., Abiko, Y., Li, H., Kumagai, Y., & Aschner, M. (2020). Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. Redox Biology, 34, Article 101475. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475