

17 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**GENOTOXICIDAD PRODUCIDA POR
DIFERENTES FRACCIONES DE EXTRACTOS
ORGANICOS DE AEROPARTICULAS DE LA
CIUDAD DE MEXICO EN
*Drosophila melanogaster***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

M. en C. Alfredo Delgado Rodríguez

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Villalobos Pietrini,
Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

MÉXICO D.F.

MAYO, 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

Resumen	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Contaminación Atmosférica	4
1.2 Exposición a compuestos químicos	7
1.3 Bioensayos	11
1.3.1 <i>Samonella typhimurium</i>	13
1.3.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.4 Biotransformación	18
1.4.1 Aspectos generales del citocromo P-450	20
1.4.2 Actividad del citocromo P-450 en insectos	22
1.5 Problema	25
1.5.1 Calidad del aire en la ZMCM	25
1.5.2 Definición de los sitios de estudio	25
1.5.3 Definición de los objetivos	26
2. MATERIALES Y METODOS	27
2.1 Monitoreo de las aeropartículas	27
2.1.1 Muestreadores y Filtros	27
2.1.2 Cuantificación de la masa de partículas	28
2.2 Extractos orgánicos	28
2.2.1 Fraccionamiento secuencial y análisis químico	28
2.2.3 Cálculo de la materia orgánica extraída y manejo de las muestras	30
2.3 Ensayo de mutagenicidad empleando <i>Salmonella typhimurium</i>	30
2.4 <i>Drosophila melanogaster</i>	31
2.4.1 Medio de cultivo para <i>Drosophila melanogaster</i>	31
2.4.2 Líneas de <i>Drosophila</i>	32
2.4.3 Cruzas	33
2.4.4 Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1 Análisis del comportamiento de las aeropartículas en 1993	38
3.2 Contaminantes reportados en 1993	40
3.3 Materia Orgánica Extraída	44
3.4 Mutagenicidad y genotoxicidad	48
3.4.1 <i>Salmonella typhimurium</i>	48
3.4.2 Prueba de mutación y recombinación somáticas	51
3.5 Análisis químico	62
4. CONCLUSIONES	68
5. REFERENCIAS	70

Resumen

La contaminación del aire ha sido objeto de especial atención, ésta representa un problema grave que afecta la salud de gran cantidad de personas. Entre los contaminantes de mayor interés se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), ya que están ampliamente distribuidos en el ambiente y pueden reaccionar con otros agentes químicos para formar compuestos secundarios. Una cantidad importante de ellos ha sido asociada con la formación de tumores malignos, por lo que es evidente la necesidad de relacionar la presencia de los HAP y algunos de sus derivados, con sus efectos biológicos.

Las aeropartículas son uno de los tres contaminantes más importantes en la Ciudad de México, cuando éstas son inhaladas los contaminantes orgánicos asociados a ellas pueden incorporarse al torrente sanguíneo y alcanzar órganos blanco, afectando a nivel del ADN tanto a células somáticas como a germinales.

En el presente trabajo se analizó la genotoxicidad de los compuestos orgánicos asociados a las aeropartículas mediante el ensayo de inducción de revertantes en *Salmonella typhimurium* y la prueba de mutación y recombinación somáticas en las alas de *Drosophila melanogaster*.

Se evaluó la genotoxicidad de compuestos orgánicos asociados a partículas suspendidas totales (PST) y partículas iguales o menores de 10 μm (PM10) del Pedregal de San Ángel, en 1993, mediante el fraccionamiento secuencial en Soxhlet con disolventes de polaridad creciente, ciclohexano, diclorometano y acetona, reuniendo los extractos en época de secas y de lluvias. En todos los casos se manejó la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* sin y con activación metabólica y en el caso de *Drosophila melanogaster*, se realizaron dos cruzamientos, uno estándar y otro que involucró bioactivación elevada.

Mediante el empleo de cromatografía de gases y de espectrometría de masas, se determinó la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) presentes en los extractos orgánicos obtenidos de las PST y PM10 del área de estudio.

Los resultados de mutagenicidad mostraron la diferencia en la composición química de los tres extractos, la mayor genotoxicidad se observó en época de secas con los extractos más polares y en PST. Además, fue clara la acción de compuestos

promutagénicos en ciclohexano, mientras que el efecto fue más elevado en los extractos de diclorometano y acetona.

Los promedios aritméticos anuales de la concentración y sus errores estándar para PST fueron $109 \pm 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y para PM10 $58 \pm 5 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Las cantidades de ambos tipos de partículas fueron mayores en la temporada de secas teniendo así correlación inversamente proporcional con la humedad relativa.

Del análisis químico, se identificaron diez hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los de mayor concentración fueron benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno y fenantreno. La cantidad total anual de HAP fue mayor en PM10, pero las diferencias no fueron significativas. Por el contrario, en las PST se observó más en secas que en lluvias. Sin embargo, entre las temporadas de ambos tipos de partículas, no hubo diferencias significativas.

Probablemente la distinta constitución de las partículas fue la causa de la variación en la recuperación de los compuestos orgánicos adsorbidos a ellas. En general, se obtuvo mayor número y cantidad de HAP en el extracto de ciclohexano, seguido de diclorometano y de acetona. Los resultados obtenidos con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* con y sin la fracción metabólica S9 y con las cruas estándar y de bioactivación elevada de *Drosophila melanogaster*, mostraron mutagenicidad debida tanto a compuestos de acción directa como indirecta (promutágenos), al mismo tiempo que evidenciaron mayor potencia mutagénica de la materia orgánica asociada a las PST en los extractos más polares.

Se evidenció que el bioensayo de *Drosophila melanogaster*, es importante como parte del análisis biológico de los efectos de contaminantes, sobre todo por la necesidad de contar con datos en eucariontes y por la importancia que tiene la determinación de un espectro de genotoxicidad más amplio que el detectado por *Salmonella*.

1. INTRODUCCIÓN

Generalmente al tratar temas relativos al ambiente se piensa en agua, suelo o aire, de hecho, el estudio y la generación de estrategias para medir y controlar la contaminación se enfoca a cada uno de estos. Sin embargo, la realidad es que el ambiente es uno, de ahí que la alteración de cualquiera de estos tres medios tiene consecuencias en los otros dos. En este sentido la contaminación del aire es de sumo interés, los contaminantes presentes en las áreas urbanas e industriales pueden encontrarse en concentraciones muy altas, debido principalmente a la gran población y a las actividades industriales localizadas en zonas relativamente pequeñas, lo que incrementa la posibilidad de que éstos se precipiten en el agua y en el suelo. Aunado a esto, la gran cantidad de personas que están expuestas de manera crónica, hace evidente la necesidad de establecer las posibles consecuencias generadas por la exposición a estos compuestos químicos, en el ser humano y en los organismos vivos en general.

Para efectos de este trabajo se entenderá por contaminante a cualquier sustancia que se encuentre en el ambiente en cantidad suficiente para producir algún efecto nocivo.

1.1 Contaminación Atmosférica

Los contaminantes del aire se pueden agrupar según sus características físicas y su origen. La primera los divide en gases y partículas. Los gases incluyen principalmente dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), hidrocarburos (HC ó $\text{C}_x\text{H}_x\text{O}$), óxidos de nitrógeno (NO_x), ozono (O_3) y óxidos de azufre (SO_x).

Las partículas pueden estar en forma de polvos, humos y vapores. Los polvos son partículas sólidas que se desprenden del proceso físico o mecánico del manejo de materiales o bien de la erosión natural. Los humos son partículas que se originan cuando un sólido es volatilizado por su exposición a altas temperaturas y luego se condensa por la presencia de aire frío, también se incluyen las partículas sólidas que resultan de la combustión incompleta de materiales formados por carbón. Las nieblas son partículas líquidas que provienen de la condensación de los vapores y pueden originarse también por reacciones químicas. En cualquier caso, los tamaños de las

partículas varían según su naturaleza y la actividad de la que se desprenden (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Tamaños relativos de las partículas contaminantes del aire

Contaminante	Tamaño (μm)
Polvos de fundición	1 - 1,000
Insecticidas	0.5 - 10
Cloruro de amonio	0.1 - 1.0
Humos de óxido de zinc	0.01 - 0.4
Niebla de ácido sulfúrico	0.5 - 20
Humo de aceites	0.04 - 1.0
Humo de cigarro	0.01 - 0.4
Cenizas	1 - 1,000
Polen	8 - 150
Aerosoles	0.005 - 50
Niebla	1 - 40

La otra forma de identificar a los contaminantes del aire es por su origen, en este caso, se les clasifica como primarios: que pueden ser naturales (polvos, vegetación, brisa, niebla) o antropogénicos (humo de cigarro, emisiones vehiculares e industriales) y secundarios, que se generan a partir de los primarios por reacciones atmosféricas. En la tabla 1.2 se presentan algunos ejemplos simplificados de las reacciones que se pueden dar entre los contaminantes primarios y los secundarios en la atmósfera (Hughes *et al.* 1980).

Tabla 1.2. Reacciones que se pueden llegar a dar en la atmósfera entre contaminantes primarios y secundarios

NO ₂	+	Luz	→	NO	+	O
O	+	O ₂	→	O ₃		
O ₃	+	NO	→	NO ₂	+	O ₂
O	+	HC	→	HCO		
HCO	+	O ₂	→	HCO ₃		
HCO ₃	+	HC	→	Aldehídos, Cetonas, etc.		
HCO ₃	+	NO	→	HCO ₂	+	NO ₂
HCO ₃	+	O ₂	→	O ₃	+	HCO ₂
HCO _x	+	NO ₂	→	Nitratos de peroxiacetilo		

Aproximadamente el 90% de los contaminantes del aire son naturales, mientras que el 10% restante proviene de actividades antropogénicas, sin embargo, con la aparición de nuevas tecnologías se han incorporado a la atmósfera sustancias

cada vez más activas que permanecen en mayores concentraciones en las áreas industriales y urbanas. Las fuentes que dan origen a estos contaminantes se pueden dividir en dos grandes categorías: móviles y estacionarias, las primeras se relacionan con medios de transporte (carros, camiones, trenes, aviones), mientras que las segundas se refieren a actividades industriales y domésticas. En su conjunto los contaminantes que se emiten al ambiente provienen de la combustión interna de gasolinas y otros derivados del petróleo, generación de energía, refinamiento del petróleo, actividad metal mecánica, procesos químicos, evaporación de disolventes y pinturas, incineración de basura, extracción y purificación de metales. De todas estas se desprenden principalmente monóxido y dióxido de carbono, óxidos de azufre, hidrocarburos, óxidos de nitrógeno y partículas sólidas y líquidas (Moncmanová *et al.* 1993).

Uno de los grupos de contaminantes más importantes en cuanto a la carcinogénesis es el de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Grimmer (1983) los considera como peligrosos ya que se distribuyen ampliamente en la atmósfera y se ha demostrado que son capaces de inducir cáncer en varias especies animales. Sin embargo, no todos los HAPs a los que está expuesto el hombre han sido estudiados a fondo, a pesar de que la actividad biológica de estos puede variar sustancialmente con ligeros cambios en su estructura molecular y, además, reaccionan con otros contaminantes como los óxidos de nitrógeno que están presentes también en la combustión incompleta de los derivados del petróleo, lo que en algunos casos los hace más peligrosos para los organismos (Pitts *et al.* 1978, Rosenkranz *et al.* 1980).

Se calcula que en el mundo se descargan anualmente a la atmósfera 3 millones de toneladas de contaminantes como resultado de las actividades antropogénicas (Tong y Karasek 1984, Carey 1986) y aproximadamente 1000 de éstas corresponden a HAPs. El problema es más evidente en las áreas industriales ya que el volumen puede ser hasta 10,000 veces mayor que el observado en las ciudades (Haugen *et al.* 1988).

Dado lo anterior se aprecia que debido a la diversidad, a la cantidad y a la naturaleza de los contaminantes del aire, se pueden formar mezclas extraordinariamente complejas en las que se llegan a producir reacciones sinérgicas

o antagónicas, que influyen en la actividad biológica de la mezcla total (Alink *et al.* 1983), por lo que es importante realizar estudios sobre los compuestos existentes en el ambiente. Además, de establecer pruebas de los daños a los que los organismos están expuestos en estos ambientes contaminados.

1.2 Exposición a compuestos químicos asociados a las aeropartículas

Los contaminantes ambientales están relacionados con gran cantidad de enfermedades y alteraciones a la salud, a la vida vegetal y a los animales. En este sentido se incluyen efectos sintomáticos agudos y crónicos.

La contaminación del aire daña principalmente la piel, los ojos, el tracto respiratorio y los pulmones. Al aspirar compuestos que se encuentran en el aire, aunque el daño primario sucede en el tracto respiratorio y pulmones puede darse en cualquier parte del organismo debido a que tras la inhalación los compuestos químicos se incorporan al sistema circulatorio a través de los pulmones. Algunas de las enfermedades causadas o agravadas por la contaminación del aire son: asbestosis, asma, bronquitis, enfisema y cáncer de pulmón.

Algunos autores clasifican estos contaminantes en respiratorios, sistémicos, y de daño específico (Christie 1996), en la tabla 1.3 se muestran características y ejemplos de cada caso.

En cuanto a la relación que existe entre la inhalación de los contaminantes en forma de gas o bien asociados a las aeropartículas y los efectos en la salud, los individuos más sensibles son quienes presentan algún trastorno respiratorio, los menores de edad, la gente propensa a adquirir asma, neumonía, deficiencias respiratorias y cardiovasculares y las personas de la tercera edad. En diferentes estudios en los que se evaluó la posible asociación entre la concentración de PST y PM10 con el índice de mortalidad diaria se notó el aumento de este así como la cantidad de hospitalizaciones por neumonía y deficiencias en la función pulmonar, identificando como factor relativo de riesgo el incremento de las aeropartículas entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Schwartz 1994a,b, Hitzfeld *et al.* 1997). Sin embargo, las consecuencias de la exposición a estos contaminantes no solamente se expresan como irritación de los epitelios del sistema respiratorio. Se sabe que la simple presencia de los HAPs es ya un factor de riesgo en cuanto a carcinogenicidad y/o

mutagenicidad, por lo que a la vez que los organismos son afectados al nivel fisiológico, también es muy posible que sufran cambios de tipo genético. Lo que implica dos niveles, el germinal en cuyo caso los efectos se expresarán en las generaciones futuras y el somático en el que el organismo expuesto sufre las consecuencias de esta exposición, la cual se hace evidente por la aceleración de procesos de envejecimiento celular y cáncer. Algunos autores han estimado que entre 70 y 90% del cáncer en humanos y en animales es debido a contaminantes ambientales y que estos son la causa principal de la producción de defectos genéticos en el nacimiento, enfermedades del corazón y cataratas (Ames 1979, Tokiwa y Ohnishi 1986).

Tabla 1.3. Clasificación de los contaminantes del aire según sus efectos en la salud

	Subcategoría	Ejemplos	Efectos
Respiratorios	Irritantes	<ul style="list-style-type: none"> • Óxidos de azufre • Óxidos de nitrógeno • Ozono 	Irritantes pulmonares y de la mucosa del tracto respiratorio
	Polvos	<ul style="list-style-type: none"> • Cuarzos • Sílice • Asbestos 	Afectan el tejido pulmonar intersticial
	Asfixiantes	<ul style="list-style-type: none"> • Monóxido de carbono 	Interfiere con la capacidad de la sangre para transferir oxígeno
Sistémicos		<ul style="list-style-type: none"> • Metales pesados • Hidrocarburos clorados • Organofosfatos 	Dañan sistemas específicos: <ul style="list-style-type: none"> • Nervioso • Digestivo y • Circulatorio
Daño específico	Alergenos	<ul style="list-style-type: none"> • Formaldehído • Tiocianato 	Afectan piel, pulmones y tracto respiratorio
	Carcinógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Cromo • Asbestos 	Cáncer en pulmones, piel y otras áreas del organismo
	Mutágenos	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrocarburos aromáticos • Aminas aromáticas • Metales pesados • Insecticidas 	Mutaciones en ADN de gónadas, pulmón, piel y otras áreas del organismo

La exposición de los individuos está relacionada con la manera en que pueden ingresar al organismo, dependiendo principalmente de la naturaleza del compuesto y del medio en el que se encuentre (agua, suelo o aire), pudiendo abarcar más de una ruta de ingreso, que son básicamente contacto dérmico, inhalación e ingestión. En

estos tres casos la sustancia deberá atravesar diversas membranas biológicas antes de llegar al torrente sanguíneo, si bien siempre que se absorbe una sustancia por estómago, intestino o la parte superior del recto, esta deberá pasar por el hígado. De otra manera deberá circular en el torrente sanguíneo hasta que alcance el pulmón, u otro órgano blanco (Fig. 1.1). También pueden ser almacenados en tejidos grasos y hueso o excretarse por orina y bilis en caso de ser muy hidrofílicos. Si el agente en cuestión es lipofílico, entonces sufrirá una serie de transformaciones que terminarán en la activación, desactivación o en la reactivación de moléculas (Fig. 1.2), generando así especies reactivas que pueden interaccionar con macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas. Si la molécula blanco es un sitio irrelevante en cuanto a su función en la célula, no se observarán efectos tóxicos o genotóxicos. Sin embargo, cuando sus blancos son el ADN y/o las proteínas funcionales, entonces se puede reconocer el efecto de estos compuestos en el organismo.

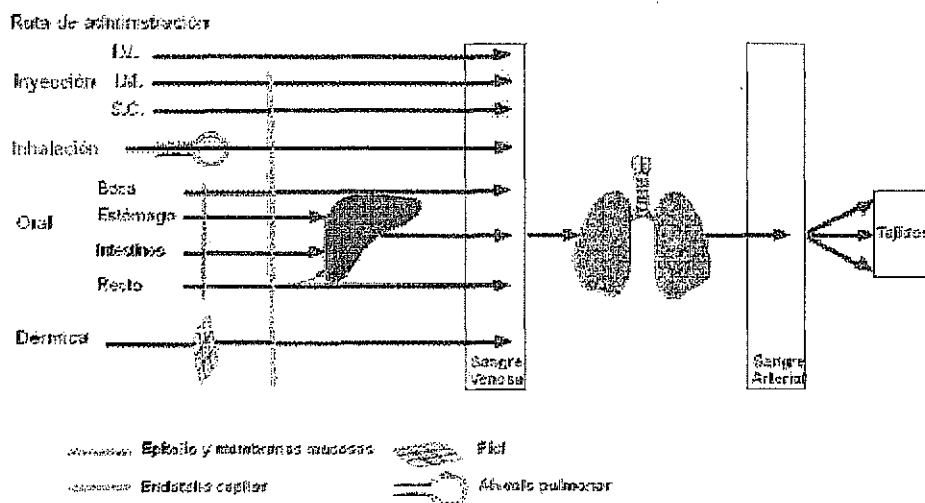


Fig. 1.1. Rutas de ingreso de las sustancias químicas al organismo (Tomado de Fichtl 1999)

En el caso de las aeropartículas, estas se encuentran suspendidas en el ambiente formando parte de los aerosoles atmosféricos, varían en tamaño y en cantidad, en razón de la actividad urbana, industrial o agrícola debido, como se mencionó anteriormente, a que pueden ser originadas por procesos naturales como la erosión, diseminación de polen, brisa y rocío y en otros casos ser el resultado de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

actividades humanas, emisiones vehiculares, procesos industriales, etc. Su tamaño varía según su origen y el material o compuestos de los que estén conformadas, aspectos que también alteran de manera significativa el efecto tóxico que pudieran tener.

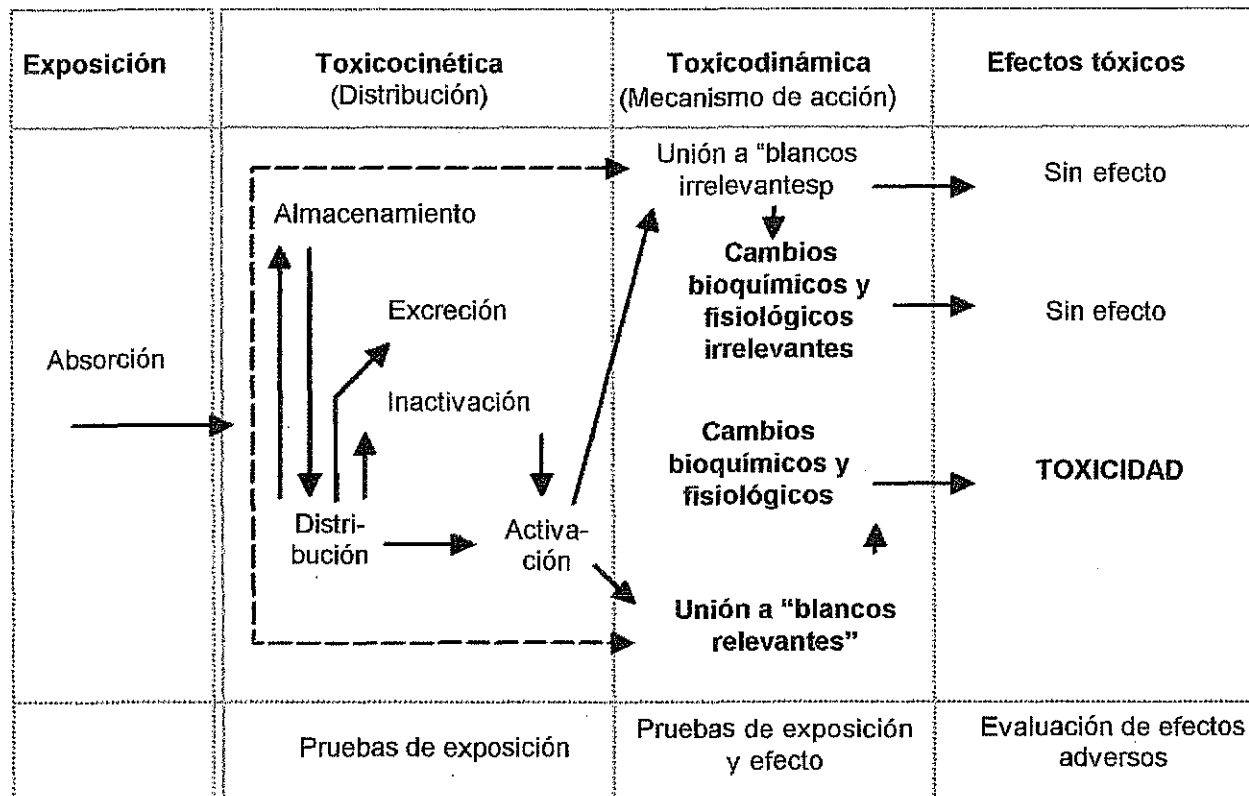


Fig. 1.2. Destino y reacciones de las sustancias en los organismos y pruebas para determinar exposición y efectos

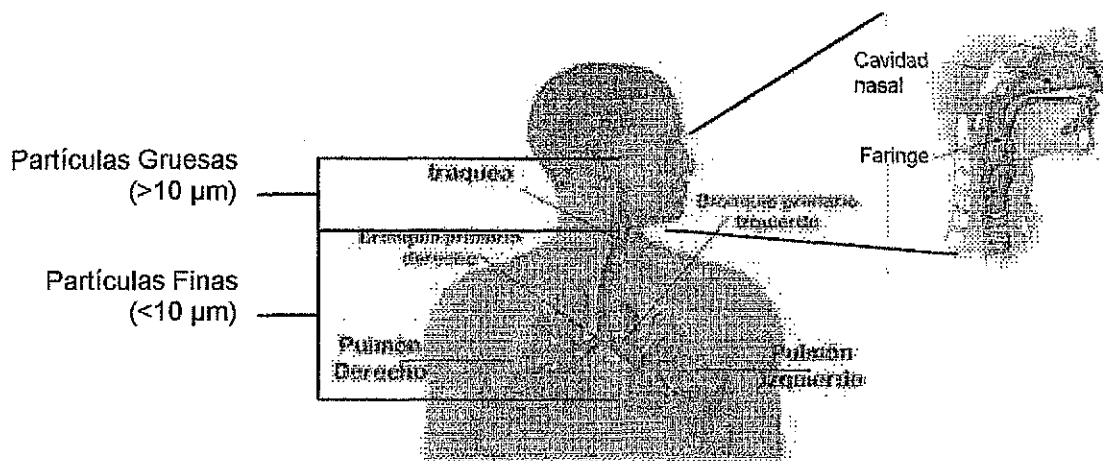


Fig. 1.3. Depositación de las aeropartículas en el tracto respiratorio del ser humano

De las rutas de entrada al organismo, mencionadas anteriormente, las partículas suspendidas ingresan en primer lugar por inhalación y en segundo término por ingestión. Una vez que la partícula se ha introducido al organismo queda en diferentes niveles del tracto respiratorio, según su tamaño (diámetro aerodinámico) (Fig. 1.3), siendo las de menor tamaño ($<10 \mu\text{m}$) las que llegan hasta bronquios y bronquiolos (Chrisp y Fisher 1980), mientras que las más grandes ($>10 \mu\text{m}$) permanecen en vías superiores, fosas nasales, laringe y faringe (Breyse y Swift 1990). Debido a esto, a las primeras se les considera como fracción respirable y a las segundas como inhalable. Aquellas partículas de menor tamaño se mantienen por más tiempo en la atmósfera, aproximadamente 100 h, se depositan más eficientemente en pulmón y son eliminadas con mayor dificultad (Esmen y Corn 1971). Por estas razones las células del aparato respiratorio tendrán mayor probabilidad de estar expuestas directamente durante largos periodos a los mutágenos que están asociados o que forman parte de esas partículas. Dichos compuestos pueden ser gradualmente removidos y subsecuentemente transportados a través de la membrana alveolar al torrente circulatorio y así otros tejidos sensibles quedan expuestos.

Respecto a las aeropartículas más grandes, son eliminadas más fácilmente y en menor tiempo, tanto por el aumento del flujo de aire al respirar o al inhalar (Hileman 1981, Bowes y Swift 1989), como por desprendimiento de las mucosas, lo que en ambos casos, lleva a la ingestión del material depositado en las vías superiores. En este caso, los compuestos asociados pueden ser solubilizados en el intestino y absorbidos, llegando también a otros órganos blanco (Chrisp y Fisher 1980).

1.3 Bioensayos

Actualmente, el monitoreo ambiental se realiza mediante el análisis químico de algunos contaminantes considerados como indicadores (O_3 , CO , N_xO_x , partículas suspendidas y SO_2) y su relación con factores climatológicos, con lo que se establece la calidad del aire. Sin embargo, aún cuando estas estrategias aportan elementos importantes para definir programas y políticas para el control y

mejoramiento del ambiente, la realidad es que únicamente se está evaluando una porción muy pequeña de los agentes químicos presentes y por más exactitud que se tenga en las mediciones, éstas no reflejan la realidad de la reactividad biológica de las mezclas complejas de los sitios evaluados. El resultado es que no se cuenta con datos que permitan establecer relaciones con los factores que impactan en la salud, sobre todo aquellos que participan en la incidencia de malformaciones, enfermedades congénitas, mutaciones y cáncer (Butterworth 1994).

En este sentido, el biomonitoreo toma importancia y juega un papel relevante en la evaluación de la calidad ambiental, ya que permite el estudio de las mezclas complejas con relación a la toxicidad y a la genotoxicidad de los contaminantes presentes en el ambiente.

Alrededor de 1960, Alexander Hollander estableció con claridad la necesidad de determinar los efectos de los mutágenos ambientales en la integridad del genoma humano. En ese momento se empleaban esquemas de prueba mediante el análisis *in vivo* de los daños provocados en las células germinales, básicamente mediante el uso de la prueba de mutaciones letales dominantes en roedores y la de letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* (Brusick 1999).

En 1970, Ames y colaboradores desarrollaron un nuevo sistema de prueba mediante el empleo de *Salmonella*, con el que se han evaluado gran cantidad de compuestos químicos (Ames *et al.* 1973). Al cabo del tiempo, el interés por conocer los efectos que producen los contaminantes y las mezclas de estos en el ADN, ha permitido el crecimiento de lo que actualmente se conoce como "genética toxicológica".

Casi al mismo tiempo en 1972, en un reporte de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (National Research Council 1972), se concluyó que el material orgánico policíclico (MOP), asociado a las partículas respirables, era un potente inductor de cáncer en animales de laboratorio, por lo que se generaron nuevas inquietudes en cuanto a la posibilidad de determinar la naturaleza de los contaminantes responsables.

La necesidad de conocer mejor los compuestos químicos responsables de la carcinogenicidad, el contar con sistemas de prueba que permitían establecer la mutagenicidad en poco tiempo y la relación de los efectos mutagénicos con la

inducción de cáncer, han abierto hasta nuestros días nuevas perspectivas de estudio sobre la reactividad biológica de las mezclas de contaminantes ambientales.

En los siguientes apartados se presentan las características del ensayo de incorporación en caja de *Salmonella typhimurium* y la prueba de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila melanogaster*, los dos bioensayos que se emplearon en este trabajo para evaluar la genotoxicidad producida por los compuestos orgánicos asociados a las aeropartículas.

1.3.1 *Salmonella typhimurium*

Este bioensayo es uno de los más socorridos debido a que es rápido, sencillo, relativamente barato y sobre todo muy sensible, cuyos resultados son de gran utilidad en el estudio de la mutagenicidad de compuestos químicamente puros y en la evaluación de muestras ambientales (Ames *et al.* 1973, 1975, McCann *et al.* 1975, Maron y Ames 1983).

En la actualidad se cuenta con diversas cepas de *Salmonella typhimurium* que son auxótrofas para histidina (*his*⁻). Las primeras que se usaron para evaluar extractos de diesel y MOP en la década de los 70 fueron la TA1535, que responde ante compuestos químicos que inducen sustitución de pares de bases, además de las TA1537 y TA1538, cuya característica es la identificación de mutágenos que provocan corrimiento del marco de lectura.

En 1983, Ames y colaboradores reportaron nuevas líneas con sensibilidades significativamente mayores, las cuales se siguen empleando hasta nuestros días (Maron y Ames 1983). De éstas, la TA100 cuyo origen es la 1535 a la cual se le incorporó el plásmido pKM101, reconoce mecanismos de mutación por sustitución de pares de bases, mientras que la TA98 proviene de la TA1538 a la que se le incorporó el mismo plásmido, por lo que ahora es mucho más sensible a mutágenos cuya acción se da por corrimiento del marco de lectura, entre los que se encuentran los mono- y dinitro-HAP y los HAP. Por esto, las cepas TA98 y TA100 han sido las más usadas en la evaluación de mutágenos, en la tabla 1.4 se resumen sus características (Durston y Ames 1974, Kier *et al.* 1974, Ames *et al.* 1975, McCann *et al.* 1975, McCann y Ames 1976, Waters *et al.* 1978). Sin embargo, es la TA98 la que

ha sido más utilizada en programas de monitoreo (Zeiger *et al.* 1985, De Marini *et al.* 1993) y para la evaluación de mezclas complejas (De Marini 1991, Houk 1992).

Tabla 1.4. Mecanismos de acción de las cepas de *Salmonella typhimurium*, TA98 y TA100

Cepa	Enzima	Mutación	Descripción	Mecanismo de acción
TA98	Histidinol deshidrogenasa	<i>hisD3052</i>	Mutación obtenida por la eliminación de una base	Corrimiento del marco de lectura
TA100	Pirrofosforilasa	<i>hisG46</i>	Mutante: GGG ccc Silvestre: GAG CTC	Substitución de pares de bases

El bioensayo se basa en el manejo de cepas mutantes que son auxótrofas para histidina, por lo que requieren de ésta en el medio de cultivo para crecer. El efecto producido por algún mutágeno en sitios específicos del ADN de la bacteria puede generar retromutaciones, que harán que el fenotipo revierta a su forma silvestre, lo que hace aparecer colonias en el medio de cultivo carente de histidina. En el caso de la TA100 el alelo que revierte es el *hisG46* y en la TA98 el *hisD3052*. En la figura 1.4 se muestra el diagrama del procedimiento para la determinación de mutagenicidad por compuestos de acción directa e indirecta.

Si bien la efectividad de este sistema está más que demostrada y tiene una serie de ventajas intrínsecas en cuanto a la posibilidad de identificar mutágenos de diversa índole, es claro que se trata de un procarionto y que únicamente se considera el efecto de mutágenos que pueden provocar inserción, delección o pérdida de pares de bases. Al tomar en cuenta que la inducción de procesos de carcinogénesis, envejecimiento y alteraciones metabólicas, son el resultado de alteraciones mucho más complejas, entre las que se puede mencionar la pérdida total o parcial de cromosomas y la recombinación somática, es evidente la necesidad de llevar a cabo estudios en eucariotes, de ser posible *in vivo* que permitan verificar un espectro más amplio de eventos genéticos (Kilbey 1978, Brusick 1988).

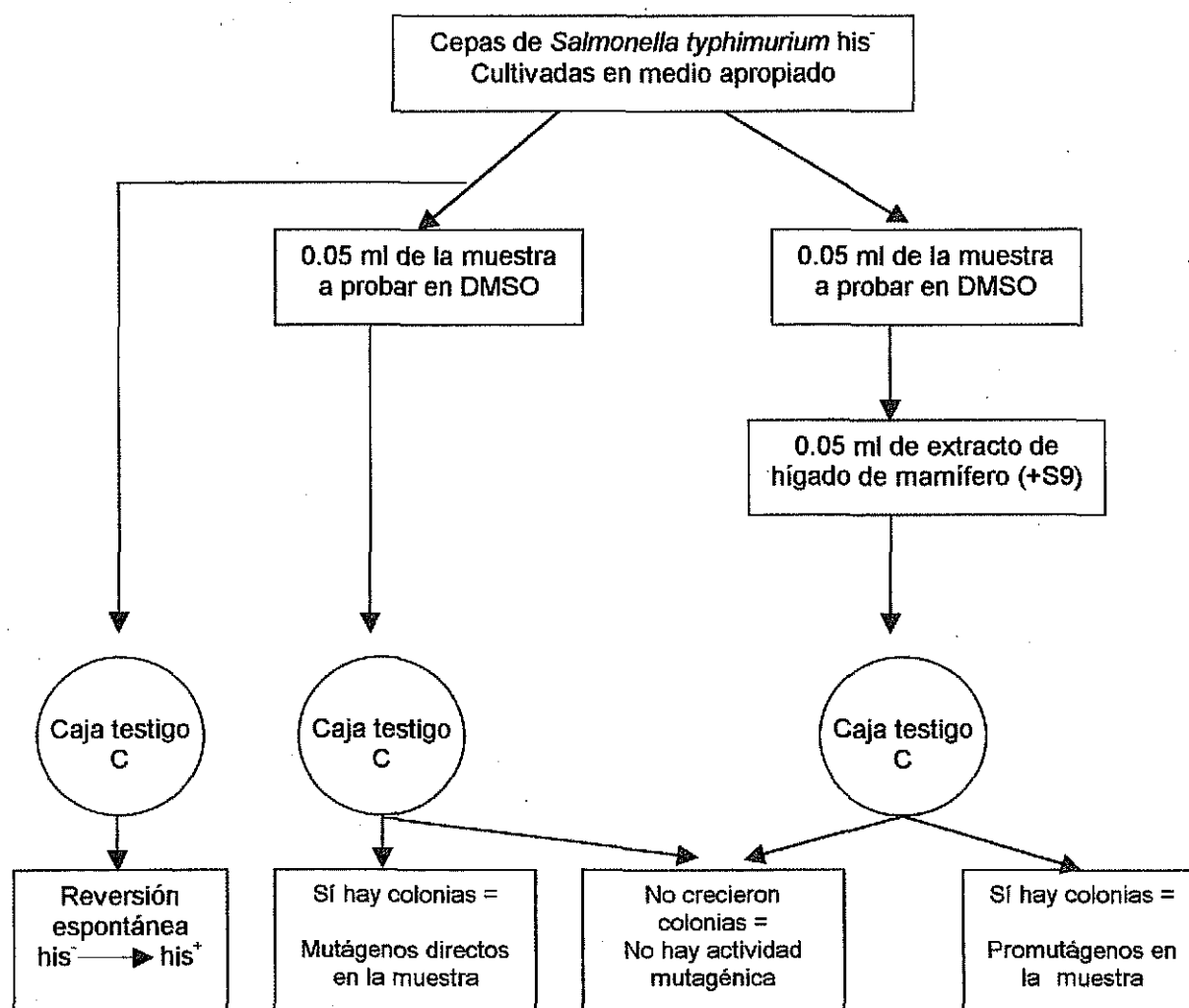


Figura 1.4. Diagrama del procedimiento estándar de la prueba de Ames con *Salmonella typhimurium* (modificado de Finlaysson-Pitts y Pitts 2000)

1.3.2 *Drosophila melanogaster*

El uso de insectos para monitorear daño genético inducido por agentes químicos, se remonta a más de 50 años. Específicamente, *Drosophila* ha sido usado ampliamente para investigar procesos de mutagénesis e identificar carcinógenos. Durante los últimos 12 años, se han realizado experimentos con este organismo para el análisis de las relaciones de estructura-actividad de compuestos genotóxicos.

Tal vez una de las principales ventajas con las que se ha contado a la fecha, es que se conoce bastante bien su genoma, por lo que es factible seleccionar

diferentes alelos de genes reporteros y arreglos cromosómicos, lo que permite diseñar cruzamientos específicos para evaluar una gran gama de daño genotóxico (Tabla 1.5).

Tabla 1.5 Ensayos genéticos en *Drosophila*

Daño genético	Número de Generaciones	Tipo de daño al ADN
<i>Pruebas con células germinales masculinas</i>		
Mutaciones letales recesivas ligadas al sexo	2	Sustituciones de base, corrimiento del marco de lectura, deleciones, pequeñas aberraciones
Mutaciones letales recesivas autosómicas	3	Sustituciones de base, corrimiento del marco de lectura, deleciones, pequeñas aberraciones
Mutaciones visibles en un locus seleccionado	1-2	sustituciones de base, corrimiento del marco de lectura deleciones, pequeñas aberraciones
Translocaciones heredables	2	Aberraciones cromosómicas recíprocas
Aberración cromosómica; pérdida parcial o total de los cromosomas X ó Y	1	Aberración cromosómica, intercambio de cromátidas hermanas
Mutación letal dominante	1	Aberración cromosómica no viable
Aneuploidia	1	Aberración cromosómica, no disyunción
<i>Pruebas con células somáticas</i>		
Pérdida de heterocigocidad por recombinación (y mutaciones)	1	Recombinación de homólogos y no-homólogos, reconversión génica, deleción, aberración cromosómica, no-disyunción, mutación
Mutación somática, inserción o pérdida de un fragmento de ADN	1	Mutación, aberración cromosómica, recombinación
Reparación del ADN	1	Daño al ADN por excisión y/o por reparación posterior a la replicación

Además de esto y de ser un organismo eucarioto, reúne características importantes como presentar un ciclo de vida corto (10 días a 25 ± 1 ° C y 60% de humedad). Es capaz de activar o inactivar a las sustancias extrañas que le son administradas (Baars *et al.* 1980, Clark 1982, Hällström *et al.* 1984, 1987). Su cultivo y manejo son simples, requieren bajos costos para su mantenimiento y se puede tener una gran cantidad de organismos en espacios reducidos.

Se han desarrollado métodos que se denominan pruebas de mutación y recombinación somáticas (SMART) y que detectan actividad genotóxica de agentes químicos que inducen diferentes tipos de mutaciones puntuales, deleciones,

translocaciones no balanceadas, recombinación mitótica y pérdida cromosómica y no-disyunción (Graf *et al.* 1984, Vogel *et al.* 1985, Würgler y Vogel 1986, Graf y Singer 1989, Graf y Van Schaik 1991, Vogel *et al.* 1999). En la Tabla 1.6 se presentan los diferentes ensayos que se pueden realizar empleando células somáticas en *Drosophila*, de los cuales los que cuentan con una base de datos amplia y lo suficientemente consistente para evaluar su certidumbre en genética toxicológica son los que emplean los marcadores *mwh* y *flr*³ para los fenotipos de pelos múltiples y en forma de flama en las alas y el marcador *w/w*⁺ para el fenotipo blanco/rojo en los ojos (Vogel *et al.* 1999).

Tabla 1.6 Ensayos para daño al ADN en células somáticas de *Drosophila*

Daño genético	Tejido o células blanco	Sexo	Marcadores genéticos y localización	Principios básicos
Pérdida de heterocigocidad por recombinación y mutación	Tricomas del ala	Macho o hembra	<i>Multiple wing hair</i> , <i>mwh/3-0.0</i> ; <i>flare</i> , <i>flr/3-39.0</i>	<i>mwh +/+ flr</i> ³ pérdida de (trans) heterocigocidad, expresión de genes recesivos <i>mwh</i> , <i>flr</i> ³
	Omatidias	Hembra	<i>white</i> , <i>w/1-1.5</i>	<i>w/w</i> ⁺ ; pérdida de heterocigocidad, expresión del marcador recesivo <i>w</i>
Mutación somática, inserción o pérdida de fragmentos de ADN	Omatidias	Macho o hembra	Cuadruplicación de <i>white-ivory</i> , <i>w/[Dp(1:1:1</i> <i>1)]/1-1.5</i>	Pérdida de 2.9-kb de fragmentos duplicados, reversión de <i>w</i> a <i>w</i> ⁺
	Omatidias	Macho	<i>white</i> , <i>w/1-1.5</i> ; <i>zeste</i> , <i>z/1-1.0</i>	Interacción entre <i>z</i> y <i>w</i> ; Inserción o pérdida de inserción en el locus <i>w</i> ; cambios de <i>z</i> a silvestre y viceversa
Reparación de ADN	Somático	Macho o hembra	<i>mei9</i> ⁹ / <i>1-6.6</i> ; <i>mei41</i> ^{D5} / <i>1-54.2</i>	Uso de deficientes para recombinación meiótica, reparación por excisión y post-replicación, comparación de índices de sobrevivencia de [Rec macho: Rec ⁺ hembra] con [Rec ⁺ macho: Rec ⁺ hembra]

Con el objeto de incrementar la sensibilidad de *Drosophila melanogaster* a la actividad de los promutágenos por la vía del citocromo P450 que interviene en el metabolismo, Frölich y Würgler (1989) construyeron dos nuevas líneas que incluyen a los cromosomas uno y dos de la línea Oregón R(R) resistente al DDT (Dapkus y

Merrell 1977), la cual se caracteriza por tener niveles elevados de citocromo P450 (Hällström y Blanck 1985).

Si bien la genética toxicológica se había avocado al estudio de mutaciones y aberraciones cromosómicas, debido a que estas son importantes para evaluar la integridad del genoma, actualmente se ha despertado interés por la recombinación somática, la conversión y la amplificación génica y la no-disyunción, debido a la relación que tienen con la pérdida de la heterocigocidad. Puesto que esta lleva a la pérdida de alelos dominantes que operan como genes supresores de oncogenes, resultando en la expresión del gen recesivo, lo que puede facilitar los procesos carcinogénicos en cualquiera de sus etapas, situación que se ha observado en retinoblastoma, tumor de Wilm, riñón, colon, cerebro, mama, pulmón (Fearon y Vogelstein 1990, Marshall 1991, Hoffmann 1994, Guzmán-Rincón y Graf 1995).

Lo anterior permite establecer de manera clara la necesidad de incluir en estudios sobre los efectos de los contaminantes ambientales, bioensayos que además de la mutagenicidad, permitan evaluar también la inducción de recombinación somática, aspecto que en este caso, al emplear a *Drosophila*, es enriquecido por el hecho de que la exposición se realiza *in vivo*.

Aunado a esto, en estudios recientes se ha demostrado que la prueba en las alas de *Drosophila*, permite el análisis adecuado de los efectos de extractos de aeropartículas y de HAP's y sus nitroderivados, como elementos importantes al evaluar su presencia en el ambiente (Graf y Singer 1989, Delgado *et al.* 1995, Delgado *et al.* 1999).

1.4 Biotransformación

Factores ambientales como la dieta y la exposición a compuestos químicos presentes en las emisiones vehiculares, en los desechos industriales y en el humo de los cigarrillos, contribuyen a más del 65% del cáncer en humanos (Doll y Peto 1981, Ames *et al.* 1987). Sin embargo, para que muchos de estos contaminantes y en general cualquier otro agente xenobiótico pueda ser nocivo, se requiere que sean transformados o metabolizados. Con base en esto, los compuestos genotóxicos pueden ser divididos en aquellos de acción directa, cuyo efecto es debido a la interacción del compuesto *per se* con el ADN y no necesitan de activación metabólica

y por otro lado, existe gran cantidad de compuestos que requieren ser metabolizados antes de generar alguna mutación o alteración al material hereditario o bien de convertirse en agentes tóxicos para la célula por lo que se les denomina indirectos. Ejemplos de algunas clases de mutágenos indirectos o promutágenos son las siguientes:

- Hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos (7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, benzo(a)pireno)
- Aminas aromáticas (2-acetilaminofluoreno)
- Nitrosaminas (dietilnitrosamina)
- Algunos hidrocarburos clorados (cloruro de vinilo)
- Productos naturales (heliotrina, aflatoxina B₁)

Los agentes genotóxicos de tipo indirecto, comprenden un gran universo de sustancias estructuralmente diversas, por lo que la susceptibilidad a un grupo de promutágenos no implica necesariamente, que exista para otro grupo de compuestos. Además, se debe considerar que una sola estructura química en la que varía un sólo radical (ejemplo el metilo), modifica considerablemente sus efectos a nivel biológico, debido a las diferentes rutas metabólicas en las que puede participar. La mayoría de los promutágenos son de naturaleza lipofílica a pH fisiológico, por lo que para ser excretados deben ser transformados metabólicamente en moléculas hidrofílicas. Esta biotransformación es un proceso que lleva varias etapas o pasos y resulta en la formación de agentes genotóxicos capaces de formar aductos con el ADN.

El metabolismo de los compuestos químicos en el organismo, puede ser dividido en dos fases o tipos de reacción (Fase I y Fase II). La primera involucra la oxidación, la hidrólisis o la reducción de los agentes xenobióticos y es catalizada predominantemente por citocromos P450 (CYP) y por flavin-monooxigenasas (FMO). Las reacciones de la fase II llevan a cabo la conjugación del compuesto o de los metabolitos generados a partir de este en la primera fase. Esta conjugación se da con radicales acetilo, glucouronilo, metilos, aminoácidos y grupos sulfato, dando

como resultado la formación de glucourónidos y sulfatos por la acción de las enzimas: glutatión S-transferasa, uridín difosfato glucouroniltransferasa, sulfotransferasa, N-aciltransferasa y N,O-acetiltransferasa.

Estas reacciones son en realidad estrategias de desintoxicación, sin embargo, estos mismos procesos llegan a constituir especies químicas muy electrofílicas, en una o en las dos fases dependiendo de la naturaleza química y por lo tanto del metabolismo al que están sujetos los compuestos xenobióticos. Una vez generada la especie reaccionante, esta se puede unir a macromoléculas como ADN y proteínas. Gran cantidad de datos indican que las diferencias en los procesos metabólicos que sufre una molécula en las fases I y II, es crucial para determinar las especies químicas y la sensibilidad tisular e individual (Thorgeirsson *et al.* 1983, Devereux *et al.* 1986, Nebert y Weber 1990, Czerwinski *et al.* 1991).

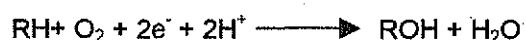
1.4.1 Aspectos generales del citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP450) son hemoproteínas ligadas a membranas (Omura y Sato 1964) que se encuentran presentes en organismos de todos los reinos. De acuerdo con su relación evolutiva, estos comprenden una superfamilia que consiste al menos de 36 familias de genes. Hasta finales de 1992, se habían caracterizado 221 genes CYP450 (Nelson *et al.* 1993). Citocromos P450 con una secuencia peptídica <40 % pertenecen a diferentes familias. Mientras que todos los miembros de una familia que comparten >59 % de coincidencia en su estructura primaria hacen una subfamilia. Basándose en estas definiciones arbitrarias, en 1989 se introdujo un sistema general de nomenclatura para los genes CYP450 (Nebert *et al.* 1989). Los genes individuales se denominan con el prefijo *CYP* (Cytochrome *P*-450) seguido por un numeral arábigo que designa la familia de genes, una letra mayúscula que denota la subfamilia y otro numeral arábigo que representa el número de gen.

Se puede asumir que todos los genes CYP450 son descendientes de un gen ancestral que inicialmente se duplicó y posteriormente se dieron otros eventos, como la conversión génica entre genes que divergían gradualmente, acompañado de eventos adicionales como mutaciones, duplicaciones y deleciones (González y Nebert 1990). Estos procesos evolutivos no sólo están documentados por secuencias

alineadas de péptidos, sino que pueden seguirse también a nivel genómico, en el cual se han observado coincidencias entre intrones y exones en genes CYP450 relacionados en una familia. Ejemplo de esto es la coincidencia observada entre CYP6A2 de *Drosophila melanogaster* y un conjunto de genes 6A estrechamente relacionados de la *Musca domestica*.

Aunque los genes CYP450 están representados en los organismos superiores constituyendo subfamilias únicas que abarcan gran cantidad de ellos, pueden tener muy distintas especificidades por su sustrato, aún cuando mantienen un alto porcentaje de similitud en su secuencia. La pequeña substitución, aparentemente conservadora, de un sólo aminoácido, puede resultar en un cambio drástico en la especificidad por su sustrato (Lindberg y Negishi 1989). Los sustratos de P450 pueden ser compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, aminas biogénicas, prostaglandinas, leucotrienos y vitaminas, al mismo tiempo que agentes xenobióticos como metabolitos provenientes de la dieta, drogas o contaminantes ambientales. Las modificaciones de estos sustratos son catalizadas por enzimas por una de las siguientes reacciones: hidroxilación alifática, hidroxilación aromática, epoxidación de alquenos, O-desalquilaciones, N-hidroxilaciones, N-desalquilaciones o deshalogenación oxidante. La estequiometría de estas reacciones puede ser generalizada como una fórmula redox:



En esta representación simplificada de la reacción no se aprecia que en realidad son tres enzimas diferentes las que están involucradas y que conforman el sistema microsómico de monooxigenasas. La reacción completa se da en un ciclo catalítico que consiste de una secuencia de reacciones parciales y se liga con otros ciclos. Estos pasos se pueden resumir de la siguiente forma: el sustrato RH se asocia con el CYP450, que recibe el primer electrón de la flavoproteína NADPH-citocromo P450 oxidorreductasa (OR) y el segundo electrón tanto por otra OR, como por el citocromo b5. En el proceso de esta reacción, el oxígeno molecular forma un radical intermedio para la oxidación final del sustrato con la liberación de una molécula de agua.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se sabe que ciertos sustratos después de esta transformación se comportan como metabolitos reactivos que atacan, debido a que son electrofílicos, macromoléculas nucleofílicas como el ADN y en menor proporción también ARN, proteínas y lípidos. Otros sustratos deben sufrir conjugaciones por enzimas de la fase II y en algunos casos éstos están sujetos a modificaciones subsecuentes por enzimas de la fase I antes de ser totalmente metabolizados.

1.4.2 Actividad del citocromo P450 en insectos

La importancia que tiene el metabolismo en la determinación de los efectos provocados por los contaminantes presentes en el ambiente y el haber empleado a *Drosophila melanogaster* como bioensayo por contar con actividad metabólica *in vivo*, dependiente del P450, para la determinación de la existencia de compuestos orgánicos de acción indirecta, obliga a la revisión de algunos aspectos o tópicos relacionados con la actividad de estos citocromos en el grupo de los insectos.

Debe considerarse que estos organismos son más antiguos que los mamíferos en términos de evolución, representan más de la mitad de todas las especies de eucariotos vivos descritas en el planeta y por lo tanto deben haber desarrollado estrategias de sobrevivencia en nichos ecológicos restringidos. Esto se debe tomar en cuenta cuando se analiza la literatura ya que aún cuando los reportes sobre el tema son numerosos, son más bien estudios aislados de diferentes organismos (Feyereisen 1993). Estas observaciones pueden por lo tanto no ser extrapoladas de una especie a otra y tienen más bien características fragmentarias al no haberse estudiado en una sola especie de insecto. Se presentan a continuación seis aspectos de análisis sobre los P450 en los insectos.

(i) Cuatro especies de *Drosophila* fueron descritas como endémicas del desierto de Sonora y utilizan tejido necrótico de cactus o suelo húmedo por exudado de las raíces como sustrato para la reproducción. Cada una aprovecha diferente especie de cactus como hospedero primario con distinto contenido de aleloquímicos (alcaloides de isoquinolina, triterpen glicósidos o esteroides poco usuales). La sobrevivencia de las cuatro especies de *Drosophila* depende de la desintoxicación, mediada por el CYP450, de las sustancias de defensa de cada uno de los cactus (alcaloides y esteroides) (Frank y Fogleman 1992). Los autores pudieron demostrar que un

inhibidor específico del CYP 450 (piperonil butóxido), evitó la reproducción de las especies de *Drosophila* en sus sustratos específicos en cultivo e inhibió el catabolismo de los aleloquímicos *in vitro*.

(ii) Una situación similar de planta hospedera, fue encontrada para orugas de *Papilio polyxenes*. Furanocoumarinas como la xantotoxina (8-metoxisoralena) indujeron actividad CYP6B1 responsable de su propio catabolismo en esta oruga. Esto le permite alimentarse exclusivamente con plantas de las familias Apiceae y Rutaceae, familias de plantas que son muy tóxicas para la generalidad de los insectos herbívoros.

(iii) La síntesis y el catabolismo de la hormona para la muda de los insectos, 20-hidroxiecdisona, es catalizada por una variedad de diferentes CYP450 (Lehmann y Koolman 1986, Ashburner 1989, Feyereisen 1993). Además han sido descritas cuatro actividades enzimáticas que hidroxilan el colesterol en secuencia de C25, C22 y C20. Dependiendo del organismo estudiado, las actividades enzimáticas son microsómicas y/o mitocondriales y han sido detectadas en diferentes tejidos como las glándulas protorácicas, las células foliculares de los ovarios, los túbulos de Malpighio (órganos comparables al riñón), los cuerpos grasos, el intestino y los discos imagales.

(iv) Los insectos se localizan entre ellos para el acoplamiento, aún a grandes distancias, gracias a sus órganos quimiosensores, que perciben la más pequeña concentración de feromonas. Éstas son en general sustancias lipofílicas. En la *Musca domestica*, son una mezcla de alquenos C23, compuestos oxigenados y largas cadenas de metil alcanos y en algunos escarabajos, están restringidos a sólo tres monoterpenos. Se observó que la conversión de dichos precursores en los potentes atrayentes sexuales por una simple modificación, es catalizada por el complejo microsómico P450 en la mosca doméstica (Ahmad *et al.* 1987) y hay muestras de actividad similar en otras especies (Brattsten 1979, White *et al.* 1979, Hunt y Smirle 1988).

(v) Cuando fueron estudiadas las actividades metabólicas de líneas de *Drosophila melanogaster* resistentes a insecticidas, con respecto a xenobióticos, se hizo evidente un espectro muy diverso de enzimas del CYP450. Se llevó a cabo la desintoxicación de insecticidas como DDT, paratión, malatión o hexaclorobenceno.

Se detectaron también otras reacciones como p-nitroanisol O-desmetilación, bifenil 3-hidroxilación, 7-etoxic cumarina O-desetilación y metabolización de cloruro de vinilo y dimetilnitrosamina (Hällström y Blanck 1985, Houpt *et al.* 1988). Finalmente se encontró que varios de los CYP450 se podían inducir con fenobarbital y otros se sobre expresaron constitutivamente cuando se afectaron algunos genes control de los cromosomas 2 y 3 (Hällström y Blanck 1985, Houpt *et al.* 1988, Waters y Nix 1988).

(vi) Desde que se reconoció que las líneas de *Drosophila melanogaster* resistentes a insecticidas presentaban una elevada expresión de diferentes CYP450 (Hällström 1986, Zijlstra *et al.* 1987), una de estas cepas, *OR(R)*, fue evaluada en la prueba de mutación y recombinación somáticas para mejorar el metabolismo de los compuestos genotóxicos. Se demostró que incrementó significativamente la sensibilidad de SMART debido a su bioactivación elevada (Frölich y Würigler 1989, Graf y van Schaik 1991) y al mismo tiempo se amplió la determinación de compuestos genotóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas aromáticas (Frölich y Würigler 1990) que habían sido detectados pobremente con *Drosophila*.

1.5 Problema

1.5.1 Calidad del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)

Como parte del programa integral contra la contaminación atmosférica (PICCA) se estableció, mediante la realización de un inventario de las emisiones generadas por fuentes fijas y móviles, que el 4.4 % de las emisiones totales (4,356,391 toneladas/año) provenían de la industria y los establecimientos comerciales, el 77 % era generado por las diversas formas de transporte y el resto por la degradación ecológica. En un nuevo inventario se estimó que en 1994 las emisiones atmosféricas fueron de 4,009,629 toneladas/año, correspondiendo a la industria y a los servicios el 12.9 % del volumen total, en tanto que el transporte generó el 75.5 % y el porcentaje restante los suelos y la vegetación.

El Sistema de Monitoreo Atmosférico en la ZMCM (Fig. 1.5) está integrado en la actualidad por dos redes: Una manual, con 19 estaciones para el muestreo y determinación de PST, así como cinco para monitorear PM10 y formaldehído y otra automática, conformada por 32 estaciones de monitoreo, 19 estaciones micrometeorológicas, una torre meteorológica, un radar acústico y una ecosonda.

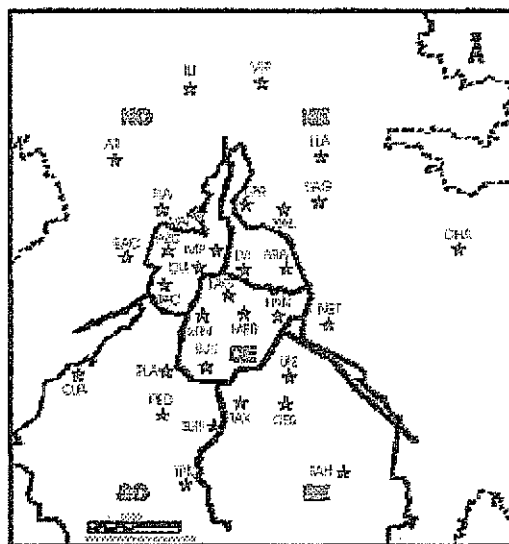
Gran parte de la contaminación en la ZMCM se debe al consumo de combustibles (diesel, gas, gasolina y gasóleo) en el transporte, la industria, los servicios y la generación de electricidad. Su consumo promedio de 1992 a 1995 fue de 43.4 millones de litros diarios.

1.5.2 Definición del sitio de estudio

Se seleccionó la estación del Pedregal de San Ángel al suroeste de la Ciudad de México y se trabajó con los filtros aportados por la red manual de monitoreo atmosférico de la ZMCM, durante 1993.

El mayor aporte de contaminantes se da en este sitio por la presencia de fuerte carga vehicular, con horarios picos muy marcados por la mañana y por la tarde.

RED AUTOMÁTICA DE MONITOREO ATMOSFÉRICO



SIMBOLOGIA

—	LMITE DE LA ZONIFICACION
---	LMITE DE LA ZONA METROPOLITANA
----	LMITE DE LA CEE DE MEXICO
*	ESTACION DE MONITOREO

VALLEJO	VAL	LA VELA	LEI	INGUENSES	MIN
TACUBA	TAC	SAN AGUSTIN	SAG	SANTA URSULA	SUR
EMERACATLAN	EAC	XALCAYOTC	XAL	PEDREGAL	PED
AZCAPOTZALCO	AAC	ARAGON	ARA	FLAJEROS	FLA
TOLNEPANELA	TIA	NETZAHUALCOYOTL	NEE	CURUMALPA	CUA
IMF	IMP	VILLA DE LAS FLORES	VIF	TILFAN	TFN
CHILAHUAC	CHI	CHAPINCO	CHA	CERRO DE LA ESTRELLA	CES
TULTEPEC	TIT	TACUNILLA	TAC	UAMETAPALAPA	UET
ATZAPAPAN	ATP	MERCED	MER	TANGUENA	TGX
LOS LAURELES	LIA	HANABATE	HAN	TILAPUAC	TAH
LA PRESA	LPR	BENITO JUÁREZ	BUM		

Figura 1.5. Distribución del sistema de monitoreo atmosférico de la ZMCM

1.5.3 Definición de los objetivos

Se analizó el efecto genotóxico producido por extractos orgánicos obtenidos por fraccionamiento secuencial, de muestreos realizados en 1993 y se buscó la relación existente entre el efecto biológico mediante el análisis de la potencia mutagénica y del comportamiento de los principales contaminantes examinados por la red automática de monitoreo ambiental (RAMA) en la ZMCM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Monitoreo de las aeropartículas

2.1.1 Muestreadores y Filtros

Para capturar las partículas suspendidas en el aire, se utilizaron filtros de fibra de vidrio A/E de 20.3 cm x 25.4 cm (Gelman Sciences), que se expusieron al ambiente durante 24 horas cada seis días, de enero a diciembre de 1993 en muestreadores Andersen de altos volúmenes para PM10 (HVPM10) que incluyen partículas de 10 μm o menos de diámetro aerodinámico y de PST (HVPST) que colectan partículas suspendidas totales (Fig. 2.1), calibrados con un flujo aproximado de 1.13 m^3/min ($\pm 10\%$).

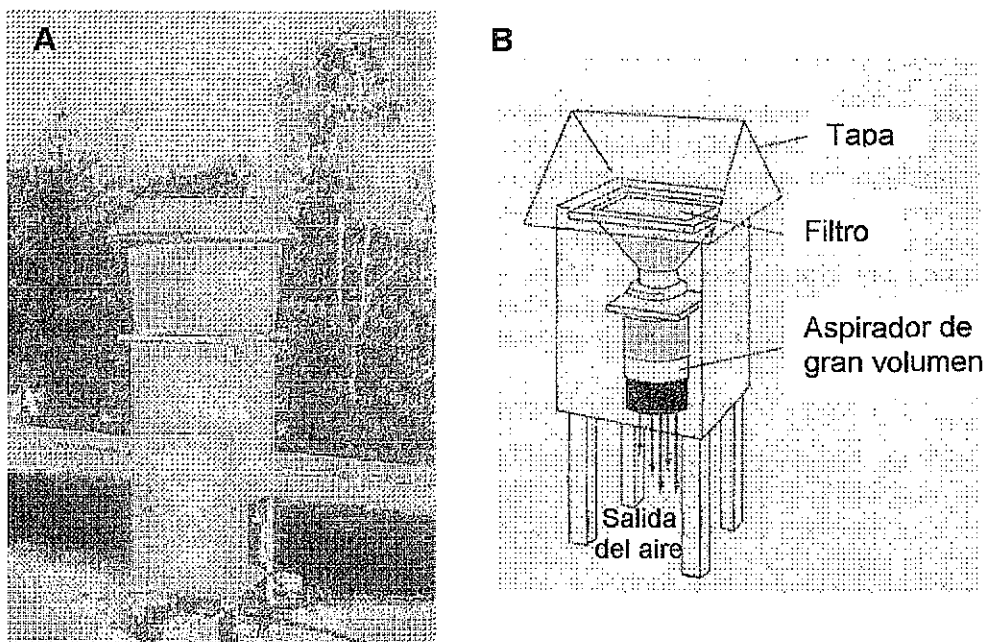


Fig. 2.1. Muestreadores de grandes volúmenes de aire. A) Foto de un colector PM10. B) Esquema de un equipo PST, en el que se muestran las partes funcionales del mismo

2.1.2 Cuantificación de la masa de partículas

Para la medición, los filtros se acondicionaron y se pesaron antes y después de su exposición al ambiente según la norma oficial mexicana NOM-035-ECOL-1993, en la cual se establece que la temperatura ambiental controlada tiene que ser entre 15 y 30 \pm 3 °C de variación durante el período de equilibrio, que debe ser al menos de 24 h, con humedad relativa en un nivel menor del 50 \pm 5 %. Las condiciones específicas que se manejaron en este trabajo fueron: 20 °C y 45 % de humedad relativa. La diferencia entre los pesos final e inicial del filtro, dividido entre el volumen de aire muestreado, dio la concentración de partículas en $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

2.2 Extractos orgánicos

2.2.2 Fraccionamiento secuencial y análisis químico

La extracción de la fracción orgánica de las aeropartículas se llevó a cabo con equipos Soxhlet, empleando el siguiente procedimiento secuencial (Daisey *et al.* 1979): 180 ml con ciclohexano (CH), 180 ml con diclorometano (DCM) y 180 ml con acetona (ACE) (Baker, grado HPLC), durante 8 horas cada uno y con tres a cuatro ciclos por hora, este procedimiento se hizo en un laboratorio equipado con luz amarilla para evitar la foto descomposición de los analitos (Grimmer 1983, Lee y Schuetzle 1983). Posteriormente los extractos se concentraron en un aparato Kuderna-Danish hasta obtener aproximadamente de 1 a 2 ml y se resuspendieron en 1.5 ml con su respectivo disolvente.

Este procedimiento permitió obtener tres fracciones conformadas por distintos componentes químicos, con ciclohexano compuestos no-polares, con diclorometano los medianamente polares y con acetona los polares.

Una vez extraído el material orgánico de los filtros, se tomaron alícuotas de cada extracto conteniendo volúmenes equivalentes de aire muestreado, para componer muestras mayores que permitieron realizar los ensayos de mutagenicidad, así como los estudios analíticos y la obtención de la masa de material orgánico extraído (MOE) en cada mezcla.

Para componer estas muestras se siguieron dos criterios; el primero considerando dos periodos a lo largo del año, correspondiendo las temporadas de secas y de lluvias, de tal forma que quedaron agrupados en dos muestras finales, cada una con tres fracciones distintas. El segundo se empleó para corroborar el anterior y se basó en la cantidad de material particulado reportado por la RAMA para PM10, según la cual, el análisis del comportamiento de la contaminación por aeropartículas durante el año a estudiar permitió corroborar los dos periodos para preparar las muestras a evaluar, según la presencia o ausencia de lluvia (Atherholt *et al.* 1984).

A continuación, de los extractos mensuales se tomaron las alícuotas correspondientes para hacer un acumulado de enero a mayo, noviembre y diciembre (temporada de secas) y de junio a octubre (temporada de lluvias), de manera que las mezclas tanto de PM10 como de PST fueron aforadas a un 1 ml. La cantidad equivalente en aire muestreado fue de 400 m³ para la primera temporada y de 480 m³ para la segunda, datos que se tomaron en cuenta para el cálculo de las concentraciones empleadas en cada bioensayo.

El análisis de los HAP se hizo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan-GCQ con trampa iónica, utilizando una columna capilar al 5 %-fenil-95 %-polidimetilsiloxano, de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de película (SUPELCO). La rampa de temperatura comenzó con una isoterma de 10 min a 60 °C, posteriormente un incremento de 5 °C/min hasta 310 °C durante 9 min. La inyección fue sin división (splitless) durante 1 min, manteniendo la temperatura del inyector, de la línea de transferencia y de la fuente iónica en 250, 310 y 150 °C respectivamente. Y el gas de acarreo fue helio de alta pureza (INFRA) a una velocidad de 40 cm/s y un flujo en la columna de 1.18 ml/min.

La identificación de los HAP presentes en los extractos de los tres disolventes de las muestras de PM10 y PST tanto de secas como de lluvias, se hizo mediante el monitoreo del ión selectivo y por comparación de los tiempos de retención absolutos a una mezcla de 17 HAP y relativos a tres estándares internos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,- octahidroantraceno, tetrafeniletieno y n-octacosano) obtenidos directamente de los cromatogramas. La cuantificación se llevó a cabo por comparación directa del área bajo

la curva del ión seleccionado con el promedio de las del estándar correspondiente, este valor se obtuvo de las inyecciones hechas por triplicado para cada HAP.

2.2.3 Cálculo de la materia orgánica extraída y manejo de las muestras

Debido a la importancia que tiene el material orgánico particulado por su relación con la inducción de cáncer y de mutaciones, se evaluó la MOE de cada temporada colocando 150 μl de la muestra compuesta sobre un portaobjetos excavado y pesado, se evaporó el disolvente y se volvió a pesar. La diferencia de los dos pesos, dividida entre el volumen de aire colectado representó la concentración en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MOE. Para cuantificar la pérdida por evaporación, fueron empleados tres extractos orgánicos de polvo urbano certificado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología con clave SRM 1649a. Del aforo a 1 ml, se tomaron tres alícuotas de 150 μl , se llevaron a sequedad y se les determinó la MOE. Posteriormente, se reconstituyeron con diclorometano al mismo volumen, se homogeneizaron en vórtex, se evaporó el disolvente y se volvieron a pesar. El porcentaje promedio de pérdida de la MOE que representó la evaporación del diclorometano fue del 4.05 %.

Esto permite comparar los efectos obtenidos en los ensayos de genotoxicidad, con la cantidad de MOE de cada una de las dos épocas del año (secas y lluvias).

Para los bioensayos se tomaron dos alícuotas; una para el ensayo con *Drosophila*, y la segunda para la prueba de Ames, estas se evaporaron y se resuspendieron respectivamente en etanol + tween 80 al 3 % y en dimetilsulfóxido.

2.3 Ensayo de mutagenicidad empleando *Salmonella typhimurium*

Este bioensayo se basa en el empleo de cepas mutantes auxótrofas para histidina, por lo que requieren de la presencia de ésta en el medio de cultivo para crecer. El efecto producido por algún mutágeno en sitios específicos del ADN de la bacteria puede generar retromutaciones, que harán que el fenotipo revierta a su forma silvestre, protótrofa, por lo que éstas pueden formar colonias en el medio de cultivo carente de histidina.

Para los tratamientos, el disolvente se evaporó hasta sequedad y la muestra se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO). Cada extracto fue analizado en tres diluciones equivalentes a m^3 muestreados por caja (5, 10 y 15).

El procedimiento fue el estándar de incorporación en caja (Maron y Ames 1983). La cepa que se empleó fue la TA98, que puede detectar mutaciones por corrimiento del marco de lectura. La cual ha demostrado ser la más adecuada para ensayos en los que se incluye la fracción microsómica S9 de hígado de mamífero y ha resultado ser más sensible a los compuestos presentes en muestras de aeropartículas que la cepa TA100 (Van Houdt *et al.* 1987, Villalobos-Pietrini *et al.* 1995). La fracción microsómica S9 que se empleó fue de la empresa Mol-Tox. A 0.1 ml de la solución a probar se le agregó 0.1 ml de suspensión de bacterias cultivadas durante toda la noche anterior. Para determinar la mutagenicidad inducida por compuestos de acción indirecta o promutágenos se adicionaron 0.5 ml de la fracción S9. Todo esto se llevó a tubos conteniendo agar blando a 45 °C y se sembró en cajas de Petri que se incubaron durante 48 h a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se contaron las colonias bacterianas que revertieron por caja.

La cantidad de revertantes por caja fue comparada por análisis de varianza y posteriormente se hizo la regresión lineal para obtener la potencia mutagénica (Maron y Ames 1983, McCann *et al.* 1988, Piegorsch y Hoel 1988, Krewski *et al.* 1992).

2.4 *Drosophila melanogaster*

2.4.1 Medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*

En la elaboración del medio de cultivo para el mantenimiento de las cepas se utilizaron gomas naturales (carrageninas). Los ingredientes se añadieron en las siguientes cantidades: agua 1250 ml, Gelamix 7.6 g, Liangel 2.4 g, azúcar 70 g, harina de maíz 112 g, levadura de cerveza seca 55 g, nipagín simple (fungicida) 0.4 g, ácido propiónico (bactericida) 4 ml.

Se mezclaron en seco las gomas y el azúcar y se disolvieron en 870 ml de agua. Aparte y en otros 380 ml se incorporaron la harina y la levadura. Se calentaron las gomas hasta ebullición, añadiendo después aproximadamente 0.4 g de nipagín simple y agregando posteriormente los 380 ml restantes. Se cocinó todo algunos minutos, se retiró del fuego y se le adicionó el ácido propiónico. Se sirvió en frascos secos y limpios.

2.4.2 Líneas de *Drosophila*

Se emplearon tres líneas progenitoras para la realización de la prueba:

1. *mwh/mwh*
2. *flr³/In(3LR)TM3, y⁺ ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e, Bd^S*
3. *ORR1/ORR1; ORR2/ORR2; flr³/In(3LR)TM3, y⁺ ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e, Bd^S*

mwh: "pelos múltiples", se encuentra en el cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa y se distingue fenotípicamente porque en las alas del adulto en lugar de un tricoma por célula, correspondiente al fenotipo silvestre, se presentan de dos a cinco, como se muestra en la figura 2.2 (Lindsley y Zimm 1992).

flr³/TM3, Bd^S: *flr³*: "flama", está a 39 unidades de mapa sobre el cromosoma 3, aparece fenotípicamente como tricomas de forma irregular en el tórax, el abdomen y las alas, figura 2.2 (García-Bellido y Dapena 1974, Lindsley y Zimm 1992). Como en condición homocigótica es letal, se requiere para el mantenimiento de la línea que lo porta la presencia de un cromosoma balanceador, el *TM3, Bd^S*, que tiene una inversión pericéntrica que abarca gran parte del cromosoma 3 y que además posee el marcador dominante "Serratia" (*Bd^S*), lo que permite reconocer fácilmente a los individuos que llevan la inversión, ya que éstos muestran las alas con bordes discontinuos. Como "Serratia" es en condición homocigótica una mutación letal, en cada generación sólo se recobran individuos heterocigóticos tanto para *flr³* como para *Bd^S*.

ORR1 y *ORR2*: son el primero y el segundo cromosomas de la línea Oregón R(R), misma que es resistente al insecticida DDT y que muestra elevada actividad metabólica en lo que a reacciones dependientes del complejo microsómico P-450 se refiere (Frölich y Würigler 1989). Este incremento en su capacidad metabólica se debe principalmente al gen *R1*, ubicado en el cromosoma 2 a 64.5 unidades de mapa; por lo tanto, lo que se hizo fue la sustitución de los cromosomas 1 y 2 de las líneas originales *mwh/mwh* y *flr³/TM3, Bd^S*, por los de la línea Oregón R(R).

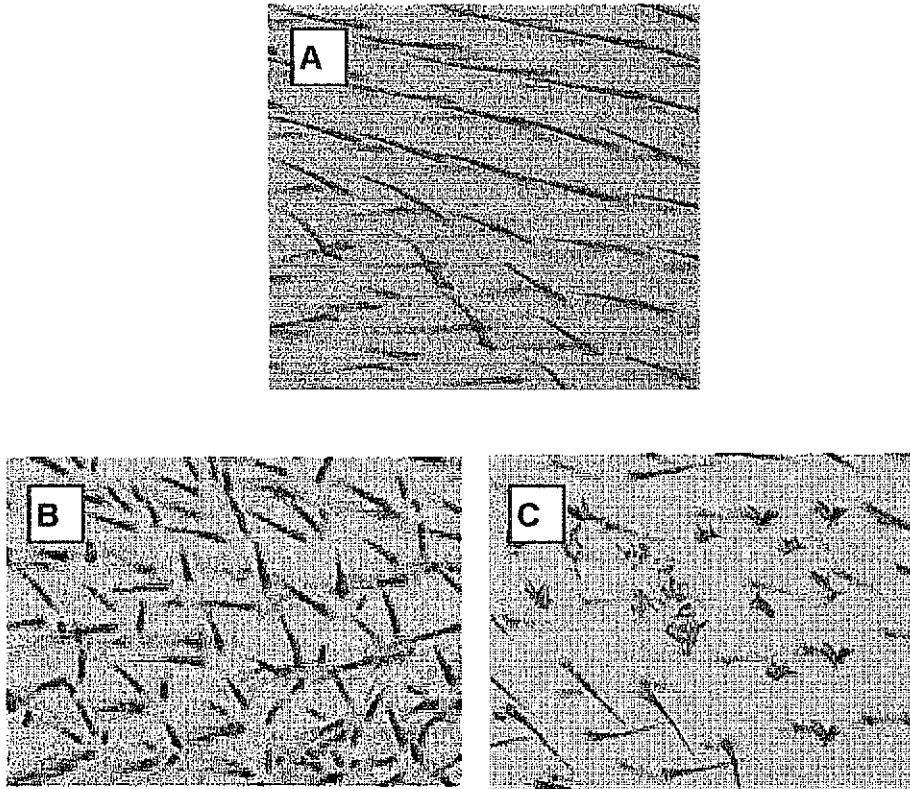


Figura 2.2. Cutícula del ala de *Drosophila melanogaster*, mostrando tricomas con fenotipo silvestre (A), *mwh* (B) y *flr³* (C) con un aumento de 400x

2.4.3 Cruzas

Se realizaron dos cruzas de la siguiente manera:

Hembras de la línea *flr³/TM3, Bd^S* con machos de la línea *mwh/mwh*, a la que se hace referencia con la sigla E por ser la craza estándar.

Hembras de la línea *ORR;flr³/TM3, Bd^S* con machos de la línea *mwh/mwh*, misma que se designará con las siglas BE por poseer el marcador *Ri* de bioactivación elevada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4.4 Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)

Entre las ventajas que ofrece la prueba están la de requerir únicamente de una generación de moscas para la obtención de resultados. En la figura 2.3 se presenta el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, que se completa en 10 días a 25° C y que consiste en: huevo (1 día), larva en el primer estadio (1 día), larva en el segundo estadio (1 día), larva en el tercer estadio (2 días), prepupa (4 h) y pupa (4.5 días); en un espacio reducido se tienen muchos individuos, el medio de cultivo se elabora fácilmente y su costo no es excesivo.

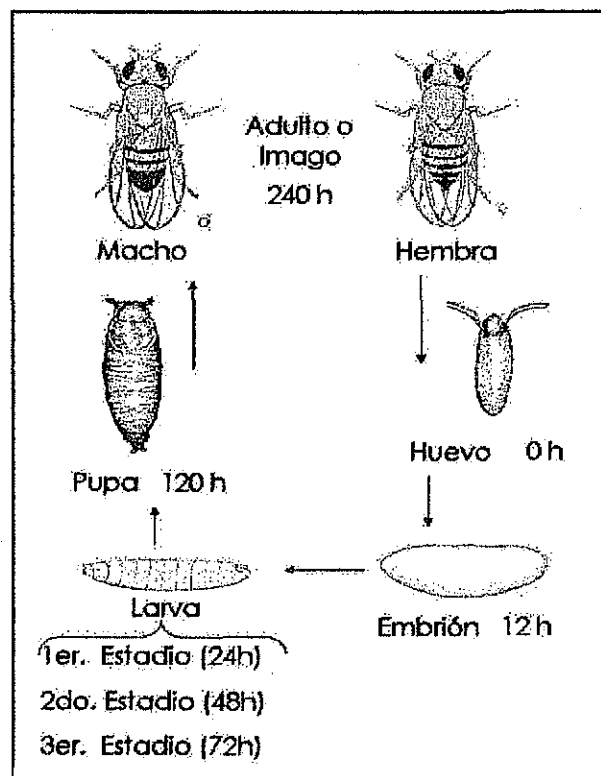


Figura 2.3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El bioensayo se basa en el uso de organismos heterocigóticos para mutaciones recesivas en células somáticas de los discos imagales, de tal forma que la pérdida del alelo dominante en algún momento del desarrollo permite la expresión del recesivo, que se muestra fenotípicamente como una mancha sobre la cutícula del adulto (Graf *et al.* 1984). En la figura 2.4 aparecen los diferentes discos imagales presentes en el estadio larvario y que darán origen a algunas estructuras en el adulto (antenas, ojos, patas, alas).

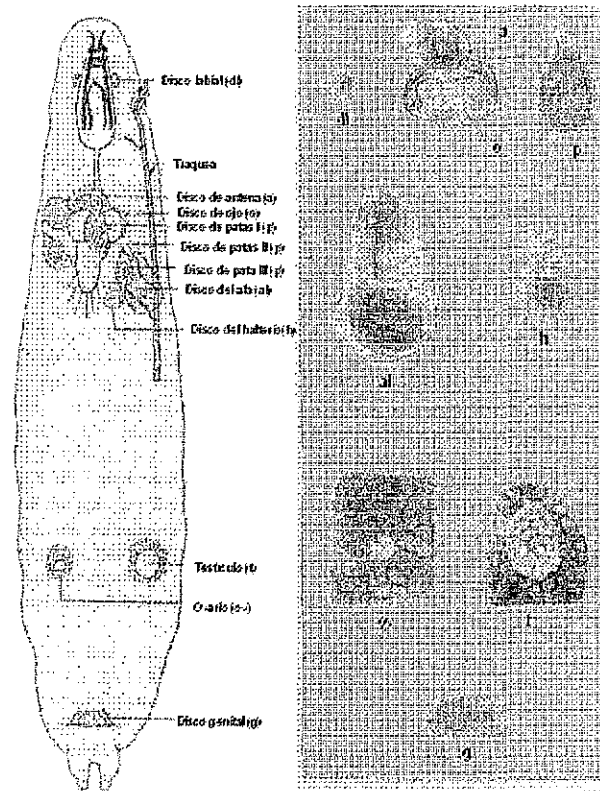


Fig. 2.4. Localización e identificación de los discos imagales en la larva madura (modificado de Bodenstern 1950)

Con SMART es posible reconocer si la acción de los agentes químicos sucede en el momento del tratamiento o bien si el efecto acontece después del mismo, ya que el tamaño de las manchas observadas depende del tiempo en el que se induce el clon, de tal modo que si ocurre tempranamente presentará mayor tamaño que si se produce hacia el final de éste. Aunque en este sentido las observaciones se deben tomar con precaución ya que algunos eventos como la no-disyunción, pueden causar cierto retardo o bien inhibir el crecimiento del clon y por lo tanto se estarán recuperando clones pequeños aún cuando se hayan inducido a temprana edad. Esto se dificulta debido a la posibilidad del tejido por recuperar la cantidad de células que deben completar el área afectada por incremento en el número de divisiones de las células aledañas a la dañada. Las manchas en las células de las alas pueden deberse a mutación, recombinación, delección o no-disyunción (Fig. 2.5) (Graf *et al.* 1983).

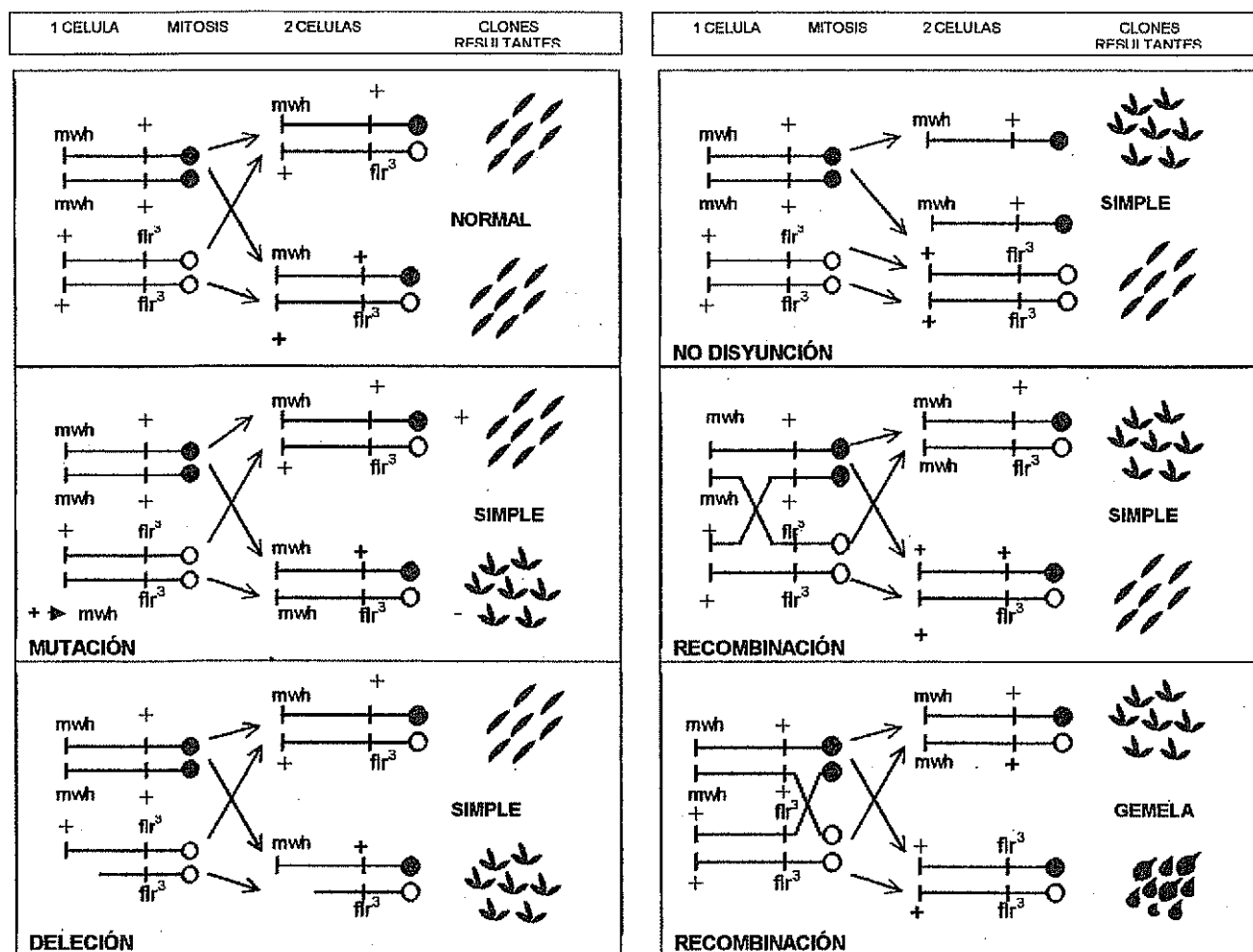


Fig. 2.5. Eventos genotóxicos que pueden dar como resultado la expresión de manchas simples y gemelas en las alas de *Drosophila melanogaster* (tomado de Graf et al. 1984)

Se colectaron huevos durante 8 h en frascos con una base sólida de gomas (5% p/v) cubierta con una capa de aproximadamente 5 mm de una pasta espesa de levadura activa, enriquecida con azúcar. Antes de colocar a los adultos para la oviposición se dejó secar la superficie de la pasta tapando la boca del frasco con gasa. Para obtener las larvas, el frasco se lavó con agua corriente y se filtró con una coladera de gasa fina de nylon para capturar a los organismos (Magnusson y Ramel 1990) y se pusieron en tubos homeopáticos conteniendo 1.5 g de medio instantáneo y 5 ml de la solución a probar.

Cuando los adultos emergieron, se fijaron en alcohol al 70%, para posteriormente montar las alas en preparaciones permanentes como lo indican Graf *et al.* (1984). Se analizó la región distal de cada ala con un microscopio óptico en aumento de 400x y se registró cada mancha de la siguiente manera:

- a. Sección del ala: A, B, C', C, D', D y E (García-Bellido y Merriam 1971).
- b. Cantidad de células: manchas pequeñas (1 a 2) y grandes (3 ó más).
- c. Fenotipo: sencilla (*mwh* ó *flr*) o gemela (*mwh* y *flr* en zonas adyacentes).

El análisis estadístico se hizo según Frei y Würgler (1988), mediante la prueba de X^2 de proporciones con la corrección de Yates y con el programa de cómputo SMART versión P.C. de Würgler y Frei (comunicación personal). Para considerar si el resultado es: positivo, positivo débil, negativo o indeciso, se empleó el procedimiento múltiple de Shelby y Olson (1981) y Frei y Würgler (1988), en donde se compararon las frecuencias inducidas de los grupos tratados con las de los testigos, tanto bajo la hipótesis nula que considera que las frecuencias observadas en los grupos testigo no difieren de las de los tratados, como ante la hipótesis alternativa en que la frecuencia inducida en los tratados es "m" veces más alta que la hallada en el testigo. Debido a la aparición espontánea de manchas pequeñas con un solo fenotipo, se trataron estadísticamente por separado las diversas clases de manchas obtenidas (pequeñas sencillas, grandes sencillas y gemelas) y fue con base en esta diferencia, que a la aparición de cada tipo se le asignó un número "m" determinado, siendo de 2 para las manchas pequeñas sencillas, por ser las más comunes, y de 5 para las manchas grandes sencillas y las gemelas, que se dan con menos frecuencia (Frei y Würgler 1988). Para comparar los resultados entre los distintos tratamientos de *Drosophila melanogaster*, se calculó la frecuencia de producción de clones *mwh* por 10^5 células, ajustando este valor con el del testigo, para lo cual, la cantidad de clones *mwh* se dividió por la de alas y por las células que conforman el área que se analizó y que corresponde aproximadamente a 24,400 (García-Bellido y Merriam 1971). Para corregirlo con el testigo, se restó la frecuencia de este último a la del grupo tratado, lo que permitió la comparación entre tratamientos con distintas frecuencias en el testigo (e. g. cruza E contra BE).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis del comportamiento de las aeropartículas en 1993

En la figura 3.1 se presenta el comportamiento mensual durante 1993 obtenido del análisis de la masa de las partículas PM10 y PST, colectadas en la estación del Pedregal de San Ángel de la Red Manual de Monitoreo Atmosférico. Las medias aritméticas anuales y las desviaciones estándar fueron $110 \pm 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $59 \pm 6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para PST y PM10, respectivamente. En ambos casos se rebasaron los límites máximos anuales aritméticos señalados por las Normas Oficiales Mexicanas NOM-024-SSA1-1993 y NOM-025-SSA1-1993, que establecen $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para PM10 y PST, respectivamente, publicadas en el Diario Oficial de la Federación del 23 de diciembre de 1994. Sin embargo, ni las PST ni las PM10 rebasaron los límites permitidos para 24 h, mismos que corresponden a $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para PST y $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para PM10.

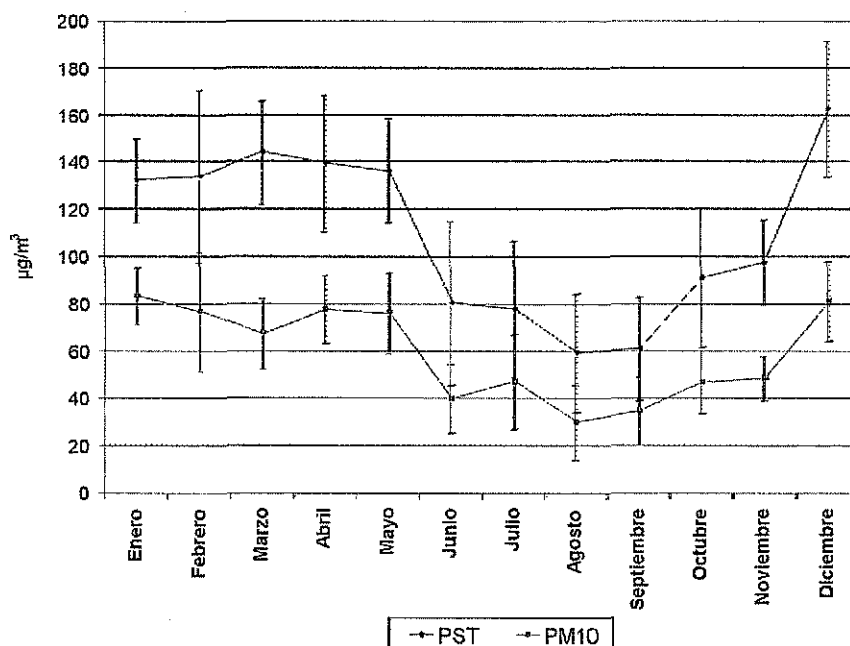


Figura 3.1. Promedio mensual de la concentración de partículas colectada en 1993 en la estación de monitoreo del Pedregal de San Ángel, en la Ciudad de México. PST= partículas suspendidas totales. PM10= partículas $\leq 10\mu\text{m}$

Como se esperaba, a lo largo del año la mayor concentración de aeropartículas fue de PST en comparación con PM10. Al mismo tiempo y con base en la masa de partículas suspendidas se pudieron determinar dos periodos o épocas, correspondiendo estos a las temporadas de secas y de lluvias. El primero abarcó los meses de enero a mayo e incluyó los dos últimos, noviembre y diciembre, mientras que el de lluvias comprendió los meses de junio a octubre. Los resultados de la media aritmética y el error estándar del promedio para las PST fueron de $135 \pm 6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en secas y de $74 \pm 4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en lluvias, mientras que para PM10 fue de $73 \pm 3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en secas y de $40 \pm 2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en lluvias. Con la prueba "F" de Fisher se determinaron las varianzas de la concentración por temporada de PST y de PM10 que fueron similares ($p < 0.05$) y mediante "t" de student se demostró que existe diferencia significativa de los promedios de ambas temporadas entre los dos tipos de partículas con una $p < 0.001$. Con esto se corroboró la ubicación correcta de los meses en una u otra temporada para ambos tamaños de partículas. Siendo el agua de lluvia un depurador de la atmósfera, la concentración de aeropartículas presentes en el ambiente disminuyó aún cuando el efecto fue más evidente en las PST que en las PM10. Debido a que las primeras son las que contuvieron elementos de mayor diámetro aerodinámico y por lo tanto la lluvia las arrastró con mayor facilidad (Finlayson-Pitts y Pitts 2000).

En un estudio realizado en 1989 por Villalobos *et al.* (1995), en la temporada de secas del área suroeste de la Zona Metropolitana, se encontró que el 47.7 % de PST estaba constituido por PM10, esta relación concuerda con las observaciones de Rodes y Evans (1985), cuyo rango osciló entre el 38.1 % y el 57.7 % en ocho sitios de los Estados Unidos de América y por Brook *et al.* (1997) con un promedio del 56 ± 24 % en catorce ciudades de Canadá entre 1986 y 1994. Los resultados hallados en este trabajo muestran una relación PM10/PST en las temporadas de secas de 53.1 ± 2.5 % y en lluvias de 53.7 ± 2.0 %, siendo el promedio anual de 53.4 ± 1.6 %. Houck *et al.* (1989), establecieron que una relación PM10/PST de ≈ 50 %, indica que las principales fuentes de emisión de las PM10 son la tierra, el pavimento y los materiales para la construcción. Mientras que una relación de ≈ 95 %, se señala que

proviene de fuentes de combustión cercanas al sitio de monitoreo (Ahuja *et al.* 1989, Houck *et al.* 1989).

Con respecto a la relación descrita para 1989 por Villalobos *et al.* (1995), se notó que aumentó en 5.7 ± 1.6 % lo que implica que el origen de las aeropartículas se modificó entre 1989 y 1993, probablemente debido a la cantidad de vehículos automotores, a la intensidad del tránsito en la zona y al crecimiento urbano.

3.2 Contaminantes reportados en 1993

Los contaminantes y las variables meteorológicas reportadas por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico durante 1993 se resumen en la Tabla 3.1. Considerando la importancia de las interacciones de los distintos tipos de contaminantes, se graficaron los promedios mensuales de los valores máximos diarios obtenidos de febrero a diciembre de 1993, con el fin de mostrar las relaciones que se dan entre éstas y con la humedad relativa. Debido a la calibración de los equipos automáticos, faltaron datos para ser estimados como representativos del mes, por lo que los valores correspondientes a enero no se graficaron.

Tabla 3.1. Contaminantes, abreviaturas y unidades de medida reportados por la RAMA

Variables	Abreviaturas	Unidades de medición
Monóxido de carbono	CO	ppm
Bióxido de azufre	SO ₂	ppm
Ozono	O ₃	ppm
Bióxido de nitrógeno	NO ₂	ppm
Temperatura	TEMP	°C
Humedad relativa	HR	%

En la figura 3.2 se presentan las concentraciones de NO_x, NO₂ y SO₂, en la 3.3 se muestran los datos de O₃ y en la 3.4 la concentración de CO. En todos los casos se grafica en el eje secundario la humedad relativa promedio mensual.

Lo mismo que sucedió con las aeropartículas (PST y PM10), se observó una relación inversa entre la humedad relativa y la concentración de NO_2 , NO_x , CO , misma que fue menos notoria en los casos de O_3 y SO_2 .

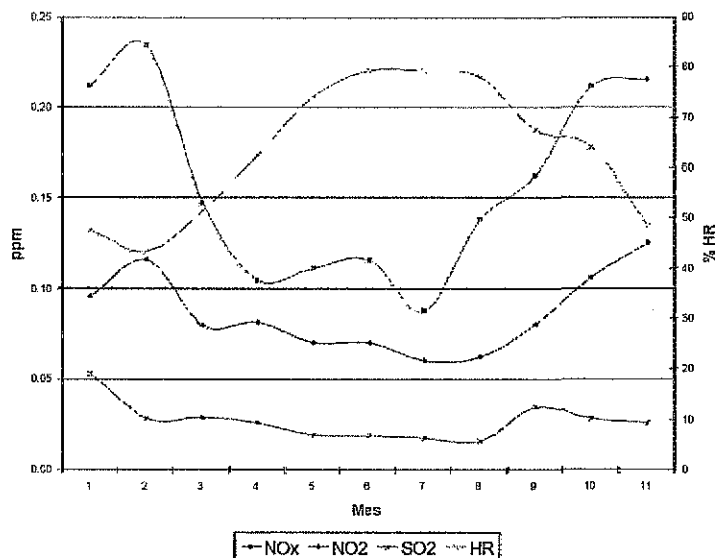


Figura 3.2. Comportamiento promedio mensual de los datos máximos horarios reportados para NO_x , NO_2 , SO_2 y HR, por la RAMA en 1993, para el Pedregal de San Ángel

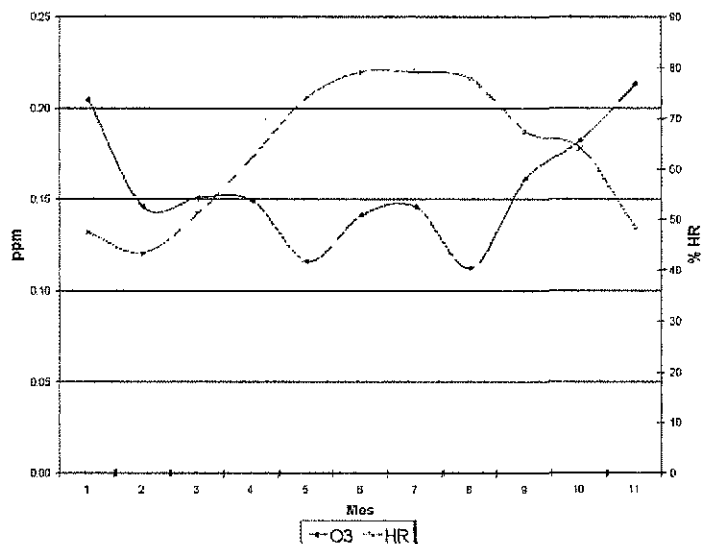


Figura 3.3. Comportamiento promedio mensual de los datos máximos horarios reportados para O_3 y HR, por la RAMA en 1993, para el Pedregal de San Ángel

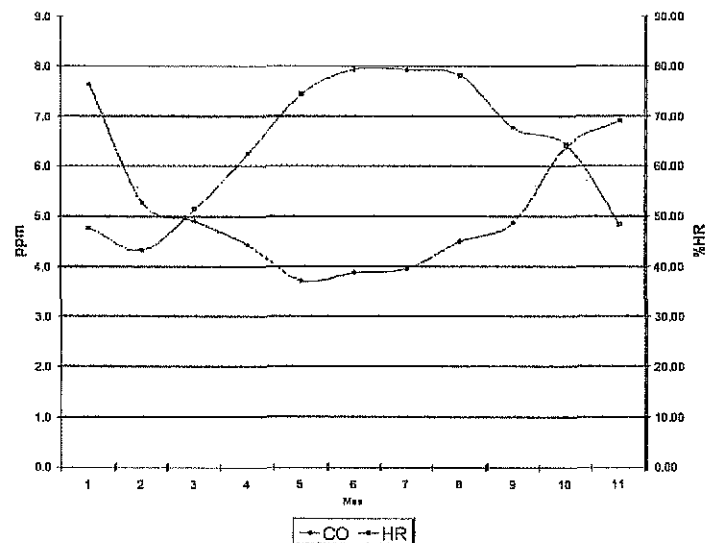


Figura 3.4. Comportamiento promedio mensual de los datos máximos horarios reportados para CO, y HR, por la RAMA en 1993, para el Pedregal de San Ángel

Para entender mejor las figuras anteriores, se presentan los valores establecidos por las normas de la calidad del aire en la Tabla 3.2, con ello se puede tener una idea de la calidad durante 1993, para esta zona de la Ciudad de México.

Tabla 3.2. Normas de la calidad del aire

CONTAMINANTE	NORMA	NORMA ANUAL
MONÓXIDO DE CARBONO (CO)	NOM-021-SSA1-1993 11 ppm como promedio móvil de 8 horas ($12595 \mu\text{g}/\text{m}^3$), a partir de 1995 y 13 ($14887 \mu\text{g}/\text{m}^3$) como promedio móvil de 8 horas hasta 1994.	
OZONO (O_3)	NOM-020-SSA1-1993 0.11 ppm como promedio de una hora ($216 \mu\text{g}/\text{m}^3$).	
BIOXIDO DE NITROGENO (NO_2)	NOM-023-SSA1-1993 0.21 ppm como promedio de una hora ($395 \mu\text{g}/\text{m}^3$).	
BIOXIDO DE AZUFRE (SO_2)	NOM-022-SSA1-1993 0.13 ppm como promedio móvil de 24 horas ($341 \mu\text{g}/\text{m}^3$).	$79 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como media aritmética anual.
PARTICULAS SUSPENDIDAS TOTALES (PST)	NOM-024-SSA1-1993 $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como muestreo de 24 horas a partir de enero de 1995 y $275 \mu\text{g}/\text{m}^3$ hasta diciembre de 1994.	$75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como media aritmética anual.
PARTICULAS SUSPENDIDAS FRACCION RESPIRABLE (PM10)	NOM-025-SSA1-1993 $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio móvil de 24 horas a partir de enero de 1995 y $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como muestreo de 24 horas hasta diciembre de 1994.	$50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como media aritmética anual.
PLOMO (Pb)	NOM-026-SSA1-1993 $1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio trimestral.	

De los resultados del monitoreo ambiental en el Pedregal de San Ángel, se puede observar que el único contaminante que rebasó la norma correspondiente en los datos horarios fue el ozono en 250 días del año, la mayor parte de estos corresponden a la temporada de secas. Aún cuando las aeropartículas rebasaron la media aritmética anual, estas nunca superaron el valor máximo diario, aspecto que se refleja en la figura 3.1.

Al revisar los periodos en los que se dieron las dos concentraciones máximas de cada uno de los contaminantes en la zona del Pedregal de San Ángel, se observó que los valores correspondieron siempre a la época de secas, desde finales de octubre, hasta mediados de febrero.

Se buscó la correlación entre los diferentes tipos de contaminantes y los parámetros meteorológicos reportados por la RAMA, con la concentración de PST y PM10, sin embargo, el único parámetro que correlacionó positivamente fue la humedad relativa y entre las mismas partículas. El coeficiente de correlación anual de los promedios mensuales entre la concentración de las PST y de las PM10 fue de 0.924 ($p < 0.001$), mientras que el porcentaje de humedad relativa presentó una correlación inversamente proporcional tanto con las PST ($r = -0.828$, $p < 0.001$) como con las PM10 ($r = -0.749$, $p < 0.01$). El promedio anual de la humedad relativa fue de 43.2 ± 4 %, con 56.3 ± 3.9 % en la temporada de lluvias y 33.8 ± 2.9 % en la de secas.

La correlación inversa del porcentaje de la humedad relativa fue mayor con PST que con PM10, lo que sugiere que las primeras al estar rodeadas de vapor de agua incrementan su diámetro más fácilmente y, por consiguiente, su precipitación ocurre con mayor frecuencia. La composición de la partícula y la humedad relativa, en presencia de especies iónicas como sulfatos, nitratos y cloruros, aumentan tanto la masa como el diámetro promedio de las partículas del aerosol debido a sus propiedades higroscópicas (Koutrakis *et al.* 1989). Aunque McMurry *et al.* (1996) mostraron que en áreas urbanas éstas tienden a ser menos higroscópicas por las cadenas aglomeradas de carbón, lo que puede explicar que la baja adsorción de agua en las PM10 sea atribuida a su alto contenido de materia orgánica extraída (MOE), limitando el crecimiento y disminuyendo las posibilidades de precipitación.

3.3 Materia Orgánica Extraída

De los compuestos presentes en el ambiente que conforman la materia orgánica, los orgánicos policíclicos son los contaminantes que por su gran reactividad biológica generan más inquietud y preocupación entre los órganos gubernamentales y los grupos de investigación. Por ello se les considera como contaminantes prioritarios, reflejado en los lineamientos de la OCDE, la Unión Europea y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA).

Dada la importancia que tiene la determinación de este tipo de material orgánico presente en el ambiente y de las interacciones que involucra su presencia para la formación y su adsorción a las aeropartículas, se consideró relevante el incluir un breve análisis para determinar la cantidad extraída de la materia orgánica asociada a las aeropartículas. Aún cuando en el caso de la EPA el término hace referencia a compuestos policíclicos, en este trabajo se determinó el total de la materia orgánica, en la cual se incluyeron compuestos alifáticos.

Una vez obtenidas las fracciones, cada extracto se concentró y una de las alícuotas se empleó para el análisis de la masa de MOE. Los resultados se muestran en la tabla 3.3 y en la figura 3.5. Se puede observar que al sumar la MOE de las diferentes fracciones, la mayor cantidad corresponde a la época de secas para cada tipo de partícula. Este comportamiento se repite al analizar los resultados para cada uno de los extractos, lo que concuerda con lo esperado con relación a la masa de partículas colectadas.

Lo que más llama la atención es el hecho de que aparentemente en PM10 se obtuvo más materia orgánica que en PST, sobre todo en época de lluvias, lo que se puede observar tanto en los acumulados, como en cada uno de los extractos.

El hecho de que la MOE total no tenga una relación evidente con la concentración de partículas en el ambiente, esto es, PM10 vs. PST (Fig. 3.1), hace considerar que los compuestos orgánicos asociados a estas aeropartículas, se comportan de manera diferente en los meses correspondientes a la época de secas con respecto a los de la época de lluvias, probablemente influido principalmente por el incremento de la humedad en el ambiente y la presencia de lluvias. Estas últimas modifican además de la química atmosférica, el comportamiento de las emisiones y la acumulación de estas en periodos cortos y en sitios específicos, debido al

incremento de tráfico vehicular, propiciado por encharcamientos, inundaciones y accidentes como consecuencia de aguaceros y mal funcionamiento de los drenajes. El efecto que esto tiene en el tipo y la reactividad de los compuestos orgánicos se discutirá más adelante, al analizar la mutagenicidad recobrada y los HAPs identificados.

Tabla 3.3. Materia orgánica extraída ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) con los tres disolventes en temporadas de secas y de lluvias, de muestreos PM10 y PST del Pedregal de San Ángel en 1993

	PM10 SECAS	PM10 LLUVIAS	PST SECAS	PST LLUVIAS
CICLOHEXANO	31.19	27.48	63.34	17.21
DICLOROMETANO	84.10	23.26	23.85	13.40
ACETONA	67.03	33.37	94.71	23.91
TOTAL	182.32	84.11	181.90	54.52

Es importante hacer notar que al comparar lo obtenido en ciclohexano y diclorometano con los extractos de acetona, se observó en estos últimos la mayor cantidad de MOE para PM10 lluvias y PST lluvias y secas. Tomando en cuenta las características de los disolventes empleados, se puede establecer que la mayor parte de los contaminantes asociados a las aeropartículas colectadas en este estudio son de tipo polar y en menor proporción se encuentran los medianamente polares y los no-polares, entre estos dos últimos se esperaría encontrar a los HAP.

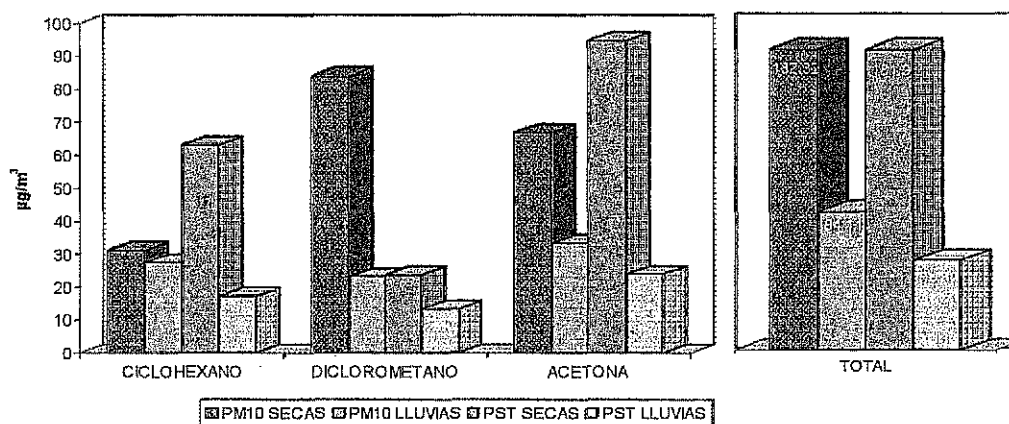


Figura 3.5. MOE de los muestreos de PM10 y PST en épocas de lluvias y de secas en 1993

El principal mecanismo de formación del material orgánico policíclico, que incluye a los HAP, ocurre durante la quema de combustibles fósiles. Un segundo mecanismo que explica su presencia ambiental es la volatilización de compuestos con bajo peso molecular. Evidentemente, el mayor aporte lo da el primero de estos dos procesos, por la quema de gas natural, gasolina, diesel y combustóleo en que están involucradas actividades como servicios, emisiones domésticas, vehiculares e industriales. Sin embargo, al estar en presencia de otros contaminantes, pueden reaccionar modificando así su polaridad.

Aún cuando se esperaría encontrar mayor MOE en PST por la masa colectada, parece que la aportación de MOE, es muy similar al comparar PST con PM10, al menos en época de secas, sea porque el origen esté en partículas muy pequeñas formadas por hidrocarburos o bien asociadas con una gran cantidad de compuestos orgánicos. Sin embargo, en época de lluvias, es en PM10 donde se reporta mayor cantidad de MOE, con respecto a PST. Si esto es cierto, implica que la lluvia no afecta a las partículas que aportan más MOE en forma directa, situación que sumada al aumento de humedad en el ambiente hace que los componentes químicos de estas partículas puedan incluirse en una amplia gama de reacciones, modificando de manera importante su actividad biológica. Esto implica que la menor cantidad de MOE y de partículas suspendidas en época de lluvias, no reduce en sí el riesgo por exposición a estos contaminantes.

Por lo anterior se calculó el promedio anual del porcentaje de la MOE con respecto al peso de las partículas de acuerdo con el tipo de disolvente empleado y corregido por el procedimiento de sequedad (Fig. 3.6). Lo que permitió corroborar el comportamiento de la MOE en cada uno de los extractos, independientemente de la época, encontrándose que de mayor a menor la MOE obtenida fue: ACE ($8.1 \pm 1.3\%$) > CH ($5.6 \pm 0.9\%$) > DCM ($4.2 \pm 1.4\%$) en las PST y DCM ($17.4 \pm 4.5\%$) > ACE ($13.7 \pm 2.0\%$) > CH ($11.8 \pm 2.9\%$) en las PM10. Los valores obtenidos para PM10, son similares a los observados por De Martinis *et al.* (1999), que con la secuencia DCM y ACE extrajeron 20.3% y 10.2% de MOE, respectivamente. El mayor porcentaje de MOE con acetona en las PST posiblemente se logró debido a que se extrajeron también compuestos polares como sulfatos y nitratos (Salazar y Bravo 1986, Miranda

et al. 1992). En los resultados de Daisey *et al.* (1979) estos últimos compuestos representaron el 23% de la masa extraída.

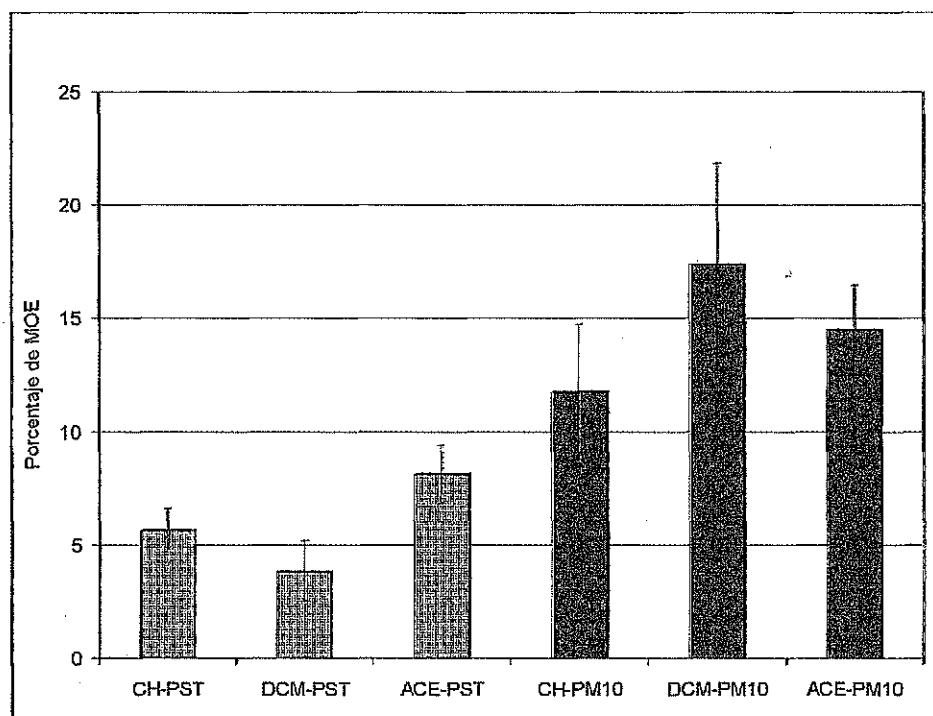


Figura 3.6. Porcentaje de MOE obtenido con ciclohexano (CH), diclorometano (DCM) y acetona (ACE), de las PST y PM10 de los muestreos realizados en la estación del Pedregal de San Ángel durante 1993

De las figuras 3.5 y 3.6 se desprende que en PST el comportamiento anual es similar al observado en cada una de las épocas. En PM10, es claro que el promedio anual está muy influenciado por la MOE de época de secas, en la que el diclorometano y luego la acetona son los que extrajeron mayor cantidad de compuestos orgánicos en comparación con el ciclohexano. Esto da una idea clara de la diferencia que se puede encontrar en épocas distintas del año en cuanto a la naturaleza de los contaminantes. Aún cuando se trate del mismo tipo de partículas, lo que refuerza aún más la necesidad de acompañar los estudios de calidad ambiental con ensayos biológicos que permitan definir el efecto de estas diferencias entre épocas, sitios y tipos de material particulado.

3.4 Mutagenicidad y genotoxicidad

3.4.1 *Salmonella typhimurium*

Se empleó el procedimiento estándar de incorporación en caja con la cepa TA98 con y sin fracción microsómica S9 de hígado de rata. Cada ensayo incluyó de dos a tres réplicas por tratamiento y cada ejercicio se hizo por duplicado. Para la determinación del potencial mutagénico, se emplearon tres concentraciones equivalentes a 5, 10 y 15 m³ de aire muestreado por caja, además del grupo testigo. Una vez hechos los conteos de colonias bacterianas revertantes, se verificó que cada uno de los grupos de datos correlacionara con una recta y se hizo el cálculo de la potencia mutagénica en cada caso (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Resultados obtenidos de la exposición de la cepa TA98 con S9 y sin S9 a tres extractos orgánicos secuenciales de PST y PM10 de las temporadas de secas y lluvias durante 1993

	Ciclohexano							
	- S9				+ S9			
	PM10		PST		PM10		PST	
Concentración	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias
0	21.93	14.75	31.35	24.46	24.86	16.37	28.29	28.67
5	26.06	18.45	41.30	31.29	33.23	21.84	47.09	36.37
10	30.19	22.16	51.25	38.13	41.59	27.31	65.89	44.07
15	34.32	25.86	61.20	44.96	49.95	32.78	84.70	51.76
Potencia rev/m ³	0.83	0.74	1.99	1.37	1.67	1.09	3.76	1.54
	Diclorometano							
	- S9				+ S9			
	PM10		PST		PM10		PST	
Concentración	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias
0	24.75	15.93	24.73	30.48	33.10	16.37	32.45	29.44
5	28.95	14.33	31.93	33.62	33.34	19.67	41.28	36.73
10	33.15	15.50	39.12	36.77	33.58	22.96	50.10	44.03
15	37.35	14.50	46.31	39.91	33.82	26.26	58.93	51.33
Potencia rev/m ³	0.84	0.00	1.44	0.63	0.05	0.66	1.77	1.46
	Acetona							
	- S9				+ S9			
	PM10		PST		PM10		PST	
Concentración	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias
0	22.16	16.70	25.62	33.00	30.18	19.12	35.42	37.13
5	45.63	20.38	41.20	52.80	42.13	23.87	54.75	57.94
10	69.10	24.07	56.78	72.60	54.07	28.63	74.07	78.74
15	92.57	27.75	72.37	92.41	66.02	33.38	93.40	99.55
Potencia rev/m ³	4.69	0.74	3.12	3.96	2.39	0.95	3.87	4.16

El ensayo mostró que el extracto con mayor potencia mutagénica fue el de acetona, seguido por el de ciclohexano y el de diclorometano, tanto para la época de secas como para la de lluvias, en ambos tipos de material particulado e independientemente de la presencia de activación metabólica (Fig. 3.7).

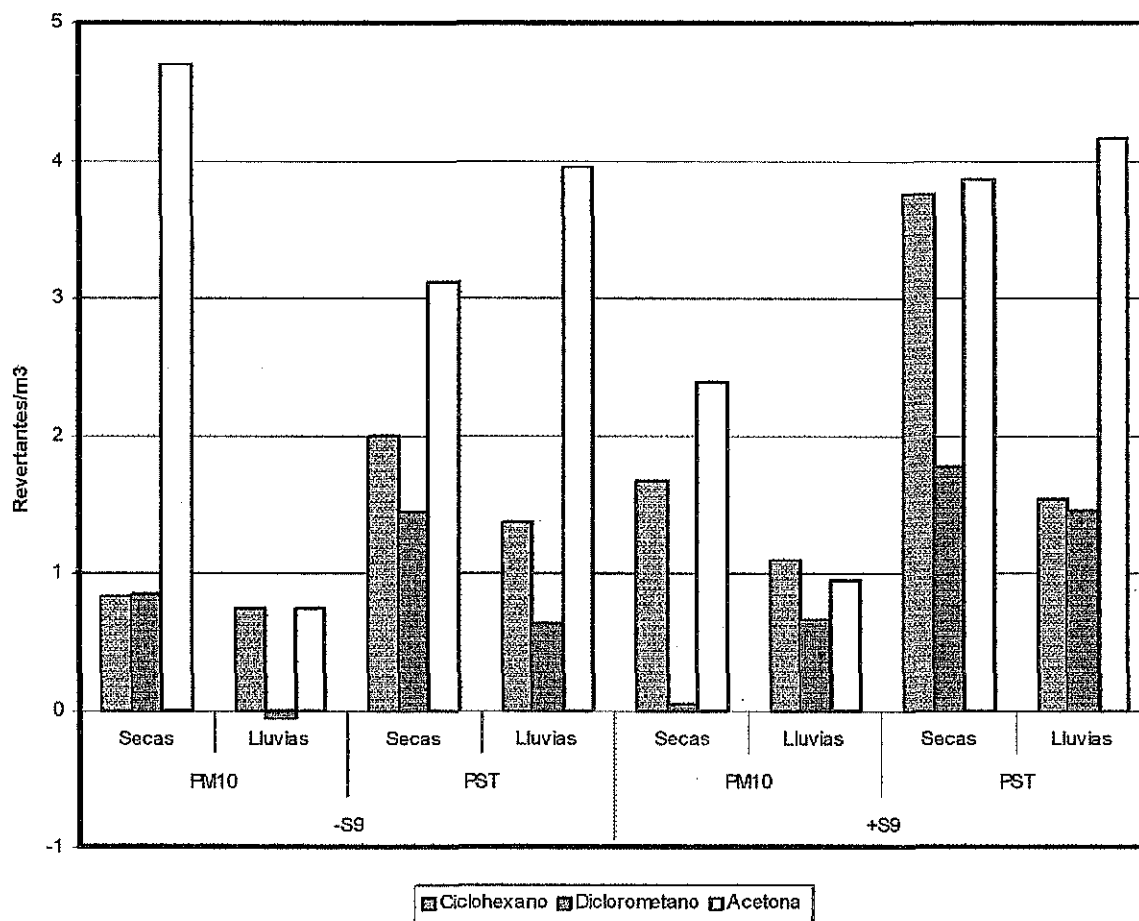


Figura 3.7. Representación de las potencias mutagénicas, obtenidas con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, con extractos orgánicos de aeropartículas PM10 y PST del Pedregal de San Ángel

Con la idea de identificar de forma objetiva las relaciones entre los diferentes extractos, se empleó la prueba de t de Student para comparar las potencias mutagénicas. La primera comparación se realizó con la idea de confrontar los resultados tomando como base la época del año (secas y lluvias), con lo cual no se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las épocas en el caso de

ciclohexano, con o sin la presencia de la fracción microsómica S9. Con diclorometano sí hubo diferencias ($p < 0.001$) en PM10 entre ambas temporadas, sin S9 y con S9, lo que no se observó con PST. Con los extractos de acetona, sólo hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) con PM10 cuando se empleó la fracción S9. Es interesante que en los extractos en los que se determinaron estadísticamente diferencias significativas, fueron los de la temporada de secas los de mayor potencia mutagénica, en comparación con los de lluvias. En cuyo caso la única muestra con la que se reportó lo contrario, fue la obtenida con diclorometano a partir de PM10, cuando se añadió S9. Esto concuerda con las observaciones de Flessel *et al.* (1991), Matsumoto *et al.* (1998) y Nielsen *et al.* (1999) quienes notaron que a mayor masa de partículas más elevada es la mutagenicidad, situación que además es coincidente con la MOE para los tres disolventes (Fig. 3.5). La mayor concentración de materia orgánica corresponde a la época de secas, lo que coincide además con lo reportado por Delgado *et al.* (1999), empleando a *Drosophila melanogaster* como bioensayo.

Debido a la importancia que tiene la bioactivación de los contaminantes ambientales para la evaluación de riesgos, se compararon las pendientes resultantes de los tratamientos según se aplicó o no la fracción S9 de hígado de rata.

Al realizar este proceso la única respuesta que demostró ser distinta al emplear bioactivación (+S9), correspondió al extracto de PM10 de lluvias obtenido con DCM ($p < 0.05$). Aún cuando no se pudieron encontrar diferencias entre los tratamientos con y sin S9, sí se puede observar en la figura 3.7, una tendencia al incremento de la potencia mutagénica cuando se adicionó la S9. Esta es más consistente en el caso del ciclohexano, lo que coincide con la naturaleza de los compuestos químicos que se esperaba recuperar en esta fracción, lo que implica la presencia de promutágenos.

El comportamiento observado, sobre todo en el caso de los extractos de acetona, indica la presencia tanto de compuestos de acción directa como de promutágenos (CX y DCM) durante 1993 en la atmósfera del suroeste de la Ciudad de México. La presencia de otros compuestos orgánicos además de derivados de los HAP, su concentración y su polaridad, las variaciones ambientales según la época del año y factores como humedad y precipitación, son algunos elementos que influyen de manera determinante en la efectividad mutagénica de los compuestos

asociados a las aeropartículas, lo que se ha demostrado en diversas ocasiones (Atkinson y Aschmann 1988, Barale *et al.* 1994).

El origen de las aeropartículas, como se mencionó en la introducción, es uno de los aspectos más importantes cuando se trata de determinar el impacto que estas tienen en los ambientes urbanos, rurales e industriales, ya que según su tamaño y naturaleza podrán reaccionar, asociarse, permanecer o ser eliminadas de la atmósfera. Esto lleva al interés por examinar las diferencias entre los resultados obtenidos con PM10 y PST.

Las potencias mutagénicas entre los extractos orgánicos de PST y PM10 obtenidos con ciclohexano, fueron significativamente diferentes en la temporada de secas ($p < 0.05$) y de lluvias ($p < 0.05$) sin S9 y sólo en la segunda ($p < 0.05$) con S9. Con diclorometano, las potencias mutagénicas fueron significativas con y sin S9 sólo en la temporada de lluvias ($p < 0.01$ y $p < 0.001$). Un comportamiento similar se presentó con los extractos de acetona, donde sólo en la temporada de lluvias hubo diferencias significativas a $p < 0.05$ tanto con como sin S9. Nuevamente, se observa consistencia con relación a la concentración de partículas y la mutagenicidad inducida. Puesto que fue con PST con el que se obtuvieron mayores valores en cuanto a potencias mutagénicas se refiere y al mismo tiempo se nota que la mayoría de las diferencias se observaron en el caso de los extractos de la época de lluvias.

3.4.2 Prueba de mutación y recombinación somáticas

Con el fin de establecer la genotoxicidad de los extractos de PM10 y de PST, en cada una de las fracciones, se compusieron muestras por cada temporada con base en el volumen de aire que pasó a través de los filtros, tomando en cuenta la superficie de filtro extraída y el flujo de aire al momento del monitoreo. De esta forma se aseguró que la muestra analizada en cada bioensayo representara los elementos particulares de cada sitio y momento, según lo cual, para la composición de las muestras de secas y de lluvias, se tomó una cantidad equivalente de los extractos obtenidos de cada mes, de tal forma que la concentración final fuera de 2000 m^3/ml de solución. A partir de esta se hicieron las diluciones para la obtención de las concentraciones seleccionadas, mismas que corresponden a 10, 25 y 50 m^3/ml . Cada tratamiento se realizó al menos por duplicado, se incluyó como testigo positivo, al

7,12-dimetilbenzo(a)antraceno y el testigo con el que se compararon los resultados obtenidos fue de etanol + tween 80 ambos al 3%.

Tabla 3.5. Resultados obtenidos al exponer a larvas de las cruza E y BE al extracto de ciclohexano

Tipo de Partícula	Época	Conc. ^d	# Alas	Manchas por ala (Cantidad de manchas) Diagnóstico ^a				Manchas con céls. mwh	Frecuencia de formación de clones ^b	
				Manchas simples pequeñas (1-2 células) [m=2]	Manchas simples grandes >2 células [m=5]	Manchas Gemelas [m=5]	Manchas Totales [m=2]		Obs.	Corr. ^c
Cruza E										
TESTIGO (etanol 3% + tween 80 3%)										
			80	0.39 (31)	0.04 (3)	0 (0)	0.43 (34)	33	1.7	
PM10										
Secas	10	80	0.36 (29)-	0.1 (8)i	0.01 (1)i	0.47 (38)-	38	1.9	0.3	
	25	80	0.34 (27)-	0.04 (3)i	0.03 (2)i	0.4 (32)-	32	1.6	-0.1	
	50	76	0.55 (42)i	0.09 (7)i	0.01 (1)i	0.66 (50)+	49	2.6	1	
Lluvias	10	80	0.52 (42)i	0.06 (5)i	0 (0)i	0.59 (47)i	46	2.4	0.7	
	50	80	0.51 (41)i	0.14 (11)+	0.04 (3)i	0.69 (55)+	54	2.8	1.1	
	25	80	0.71 (57)+	0 (0)-	0 (0)i	0.71 (57)+	57	2.9	1.2	
PST										
Secas	10	80	0.3 (24)-	0.05 (4)i	0.01 (1)i	0.36 (29)-	29	1.5	-0.2	
	25	80	0.39 (31)-	0.1 (8)i	0.01 (1)i	0.5 (40)-	39	2	0.3	
	50	80	0.37 (30)-	0.1 (8)i	0.01 (1)i	0.49 (39)-	39	2	0.3	
Lluvias	10	80	0.28 (22)-	0.06 (5)i	0.03 (2)i	0.36 (29)-	29	1.5	-0.2	
	25	74	0.45 (33)-	0.03 (2)-	0.03 (2)i	0.5 (37)-	37	2.1	0.4	
	50	80	0.54 (43)i	0.05 (4)i	0 (0)i	0.59 (47)i	46	2.4	0.7	
Cruza BE										
TESTIGO (etanol 3% + tween 80 3%)										
			78	0.27 (21)	0.06 (5)	0 (0)	0.33 (26)	25	1.3	
PM10										
Secas	10	80	0.49 (39)+	0.03 (2)-	0.01 (1)i	0.52 (42)+	42	2.2	0.8	
	25	80	0.5 (40)+	0.08 (6)-	0 (0)i	0.57 (46)+	46	2.4	1	
	50	80	0.71 (57)+	0.17 (14)+	0.05 (4)i	0.94 (75)+	73	3.7	2.4	
Lluvias	10	80	0.35 (28)i	0.04 (3)-	0.05 (4)i	0.44 (35)i	33	1.7	0.4	
	25	80	0.5 (40)+	0.05 (4)-	0.01 (1)i	0.56 (45)+	44	2.3	0.9	
	50	78	0.53 (41)+	0.05 (4)-	0.04 (3)i	0.62 (48)+	48	2.5	1.2	
PST										
Secas	10	80	0.37 (30)i	0.12 (10)i	0.03 (2)i	0.52 (42)+	42	2.2	0.8	
	25	80	0.55 (44)+	0.09 (7)-	0.04 (3)i	0.68 (54)+	54	2.8	1.5	
	50	80	0.62 (50)+	0.12 (10)i	0.01 (1)i	0.76 (61)+	61	3.1	1.8	
Lluvias	10	72	0.42 (30)i	0.03 (2)-	0.01 (1)i	0.46 (33)i	33	1.9	0.6	
	25	80	0.61 (49)+	0.05 (4)-	0.01 (1)i	0.68 (54)+	54	2.8	1.5	
	50	78	0.72 (56)+	0.09 (7)-	0.01 (1)i	0.82 (64)+	64	3.4	2.1	

^a Diagnóstico estadístico según Frei y Würigler (1988). + = positivo; - = negativo; (+) = débil positivo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error: alfa=beta=0.05

^b Frecuencia de formación de clones: manchas mwh / (cantidad de alas x 24,400 células)

^c Frecuencia corregida con el testigo

^d m³/ml

Tabla 3.6. Resultados obtenidos al exponer a larvas de las cruza E y BE al extracto de diclorometano

Tipo de Partícula	Época	Conc. ^d	# Alas	Manchas por ala (Cantidad de manchas) Diagnóstico ^a				Manchas con céls. mwh	Frecuencia de formación de clones ^b	
				Manchas simples pequeñas (1-2 células) [m=2]	Manchas simples grandes >2 células [m=5]	Manchas Gemelas [m=5]	Manchas Totales [m=2]		Obs.	Corr. ^c
Cruza E										
TESTIGO (etanol 3% + tween 80 3%)										
			64	0.22 (14)	0.09 (6)	0 (0)	0.31 (20)	18	1.2	
PM10										
Secas	10	80	0.24 (18)i	0.08 (6)-	0 (0)i	0.32 (24)-	24	1.3	0.1	
	25	80	0.35 (28)i	0.1 (8)-	0.03 (2)i	0.47 (38)i	38	1.9	0.8	
	50	80	0.47 (38)+	0.03 (2)-	0 (0)i	0.5 (40)i	40	2.1	0.9	
Lluvias	10	80	0.15 (12)-	0.03 (2)-	0.03 (2)i	0.2 (16)-	16	0.8	-0.3	
	25	80	0.47 (38)+	0.05 (4)-	0 (0)i	0.52 (42)+	42	2.2	1	
	50	80	0.82 (66)+	0.1 (8)-	0.05 (4)i	0.98 (78)+	78	4	2.8	
PST										
Secas	10	80	0.3 (24)i	0.08 (6)-	0.03 (2)i	0.4 (32)i	32	1.6	0.5	
	25	80	0.43 (34)+	0.03 (2)-	0.05 (4)i	0.5 (40)i	40	2.1	0.9	
	50	80	0.37 (30)i	0.05 (4)-	0.03 (2)i	0.45 (36)i	34	1.7	0.6	
Lluvias	10	80	0.28 (22)i	0.05 (4)-	0.05 (4)i	0.37 (30)i	28	1.4	0.3	
	25	80	0.32 (26)i	0.08 (6)-	0.05 (4)i	0.45 (36)i	36	1.8	0.7	
	50	80	0.35 (28)i	0.03 (2)-	0.03 (2)i	0.4 (32)i	32	1.6	0.5	
Cruza BE										
TESTIGO (etanol 3% + tween 80 3%)										
			80	0.22 (18)	0.03 (2)	0.05 (4)	0.3 (24)	24	1.2	
PM10										
Secas	10	80	0.43 (34)+	0.05 (4)i	0.01 (1)-	0.49 (39)+	38	1.9	0.7	
	25	80	1.08 (86)+	0.08 (6)i	0.01 (1)-	1.16 (93)+	93	4.8	3.5	
	50	80	1.59 (127)+	0.32 (26)+	0.05 (4)-	1.96 (157)+	155	7.9	6.7	
Lluvias	10	80	0.4 (32)+	0.12 (10)+	0.05 (4)-	0.57 (46)+	46	2.4	1.1	
	25	80	1.14 (91)+	0.21 (17)+	0.01 (1)-	1.36 (109)+	109	5.6	4.4	
	50	80	1.48 (118)+	0.12 (10)+	0.04 (3)-	1.64 (131)+	131	6.7	5.5	
PST										
Secas	10	80	0.62 (50)+	0.24 (19)+	0.03 (2)-	0.89 (71)+	70	3.6	2.4	
	25	80	1.05 (84)+	0.17 (14)+	0.03 (2)-	1.25 (100)+	100	5.1	3.9	
	50	80	1.15 (92)+	0.06 (5)i	0.01 (1)-	1.23 (98)+	98	5	3.8	
Lluvias	10	80	0.28 (22)i	0.11 (9)+	0.01 (1)-	0.4 (32)i	31	1.6	0.4	
	25	80	1.25 (100)+	0.35 (28)+	0.03 (2)-	1.62 (130)+	129	6.6	5.4	
	50	80	2.06 (165)+	0.11 (9)+	0.04 (3)-	2.21 (177)+	177	9.1	7.8	

^a Diagnóstico estadístico según Frei y Würzler (1988). + = positivo; - = negativo; (+) = débil positivo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error: alfa=beta=0.05

^b Frecuencia de formación de clones: manchas mwh / (cantidad de alas x 24,400 células)

^c Frecuencia corregida con el testigo

^d m³/ml

Tabla 3.7. Resultados obtenidos al exponer a larvas de las cruza E y BE al extracto de acetona

Tipo de Partícula	# Alas	Manchas por ala (Cantidad de manchas) Diagnóstico ^a				Manchas con céls. mwh	Frecuencia de formación de clones ^b		
		Manchas simples pequeñas (1-2 células) [m=2]	Manchas simples grandes >2 células [m=5]	Manchas Gemelas [m=5]	Manchas Totales [m=2]		Obs.	Corr. ^c	
Época									
Conc. ^d									
Cruza E									
TESTIGO (etanol 3% + tween 80 3%)									
	80	0.28 (22)	0.08 (6)	0 (0)	0.35 (28)	28	1.4		
PM10									
Secas	10	80	0.32 (26)-	0.01 (1)-	0.03 (2)i	0.36 (29)-	29	1.5	0.1
	25	80	0.26 (21)-	0.08 (6)-	0.01 (1)i	0.35 (28)-	28	1.4	0
	50	80	0.37 (30)i	0.03 (2)-	0.01 (1)i	0.41 (33)-	32	1.6	0.2
Lluvias	10	80	0.26 (21)-	0.06 (5)-	0.03 (2)i	0.35 (28)-	28	1.4	0
	25	80	0.45 (36)+	0.04 (3)-	0 (0)i	0.49 (39)i	39	2	0.6
	50	80	0.45 (36)+	0.08 (6)-	0.01 (1)i	0.54 (43)+	43	2.2	0.8
PST									
Secas	10	80	0.28 (22)-	0.05 (4)-	0.04 (3)i	0.36 (29)-	29	1.5	0.1
	25	80	0.37 (30)i	0.04 (3)-	0.03 (2)i	0.44 (35)-	35	1.8	0.4
	50	80	0.32 (26)-	0.1 (8)-	0.01 (1)i	0.44 (35)-	35	1.8	0.4
Lluvias	10	80	0.31 (25)-	0.08 (6)-	0 (0)i	0.39 (31)-	31	1.6	0.2
	25	80	0.39 (31)i	0.05 (4)-	0.01 (1)i	0.45 (36)i	36	1.8	0.4
	50	80	0.55 (44)+	0.11 (9)-	0.01 (1)i	0.68 (54)+	52	2.7	1.2
Cruza BE									
TESTIGO (etanol 3% + tween 80 3%)									
	78	0.29 (23)	0.01 (1)	0.03 (2)	0.33 (26)	26	1.4		
PM10									
Secas	10	80	0.39 (31)i	0.05 (4)i	0.01 (1)i	0.45 (36)i	36	1.8	0.5
	25	80	0.56 (45)+	0.06 (5)i	0 (0)-	0.62 (50)+	50	2.6	1.2
	50	78	1.26 (98)+	0.19 (15)+	0.01 (1)i	1.46 (114)+	113	5.9	4.6
Lluvias	10	74	0.59 (44)+	0.09 (7)+	0.01 (1)i	0.7 (52)+	52	2.9	1.5
	25	80	0.98 (78)+	0.1 (8)+	0 (0)-	1.08 (86)+	85	4.4	3
	50	78	0.97 (76)+	0.12 (9)+	0.05 (4)i	1.14 (89)+	89	4.7	3.3
PST									
Secas	10	80	0.44 (35)i	0.06 (5)i	0.04 (3)i	0.54 (43)+	42	2.2	0.7
	25	80	0.5 (40)+	0.08 (6)i	0.04 (3)i	0.61 (49)+	49	2.5	1.1
	50	80	0.59 (47)+	0.05 (4)i	0.01 (1)-	0.65 (52)+	52	2.7	1.2
Lluvias	10	80	0.37 (30)i	0.01 (1)i	0.01 (1)-	0.4 (32)-	32	1.6	0.2
	25	80	0.5 (40)+	0.1 (8)+	0.01 (1)-	0.61 (49)+	47	2.4	1
	50	80	0.81 (65)+	0.11 (9)+	0.01 (1)-	0.94 (75)+	75	3.8	2.4

^a Diagnóstico estadístico según Frei y Würzler (1988). + = positivo; - = negativo; (+) = débil positivo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error: $\alpha = \beta = 0.05$

^b Frecuencia de formación de clones: manchas *mwh* / (cantidad de alas x 24,4000 células)

^c Frecuencia corregida con el testigo

^d m³/ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para comparar los distintos tratamientos y obtener la pendiente en caso de existir correlación lineal entre la concentración y el efecto, se empleó la frecuencia de formación de clones por 10^5 células, corregida con los valores del testigo. Los resultados observados con los tres extractos en las cruza E y BE se presentan en las tablas 3.5, 3.6, 3.7 y figuras 3.8 y 3.9.

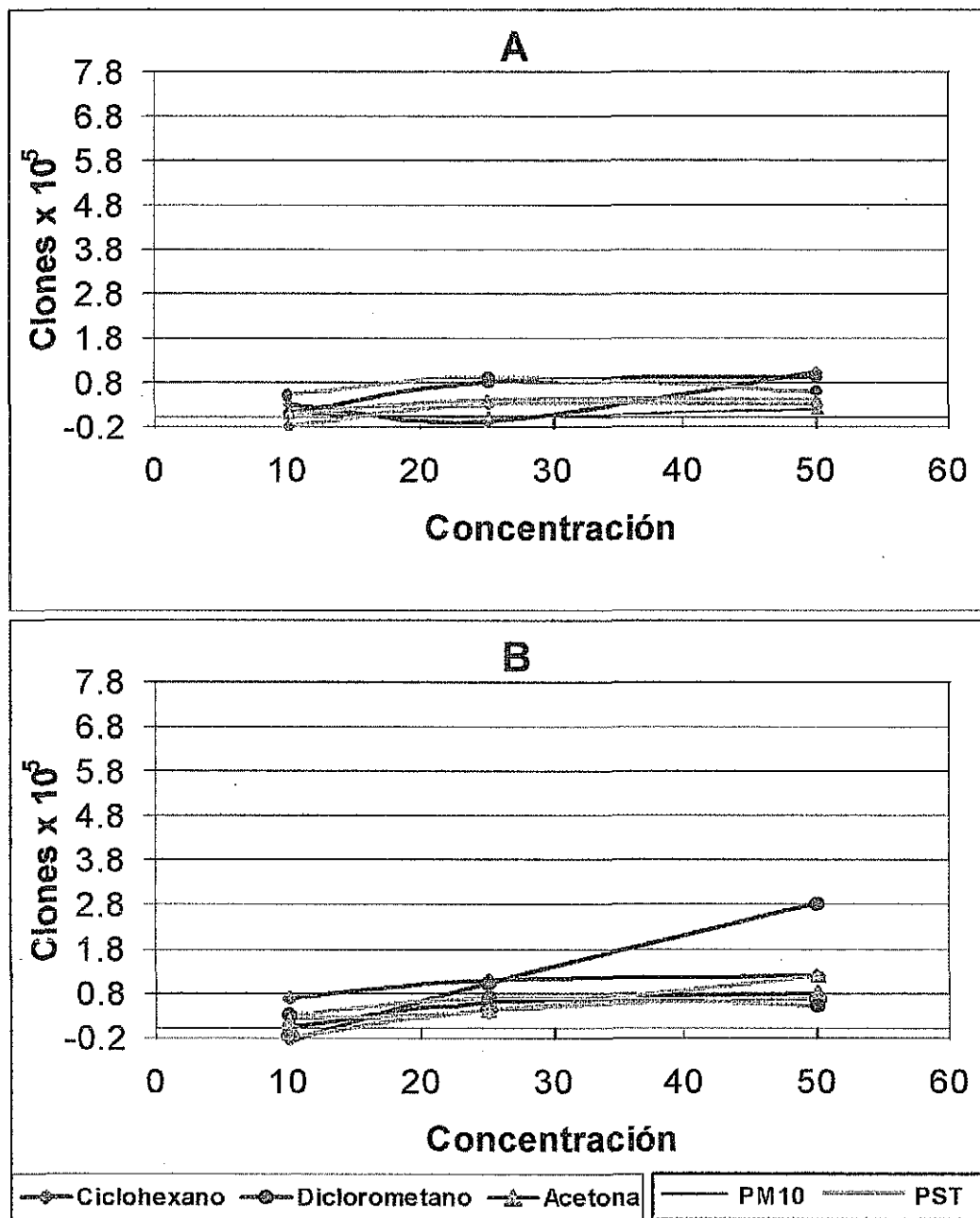


Figura 3.8. Clones inducidos en larvas de *Drosophila melanogaster* de la cruz E al exponerlas a extractos orgánicos de época de secas (A) y de lluvias (B)

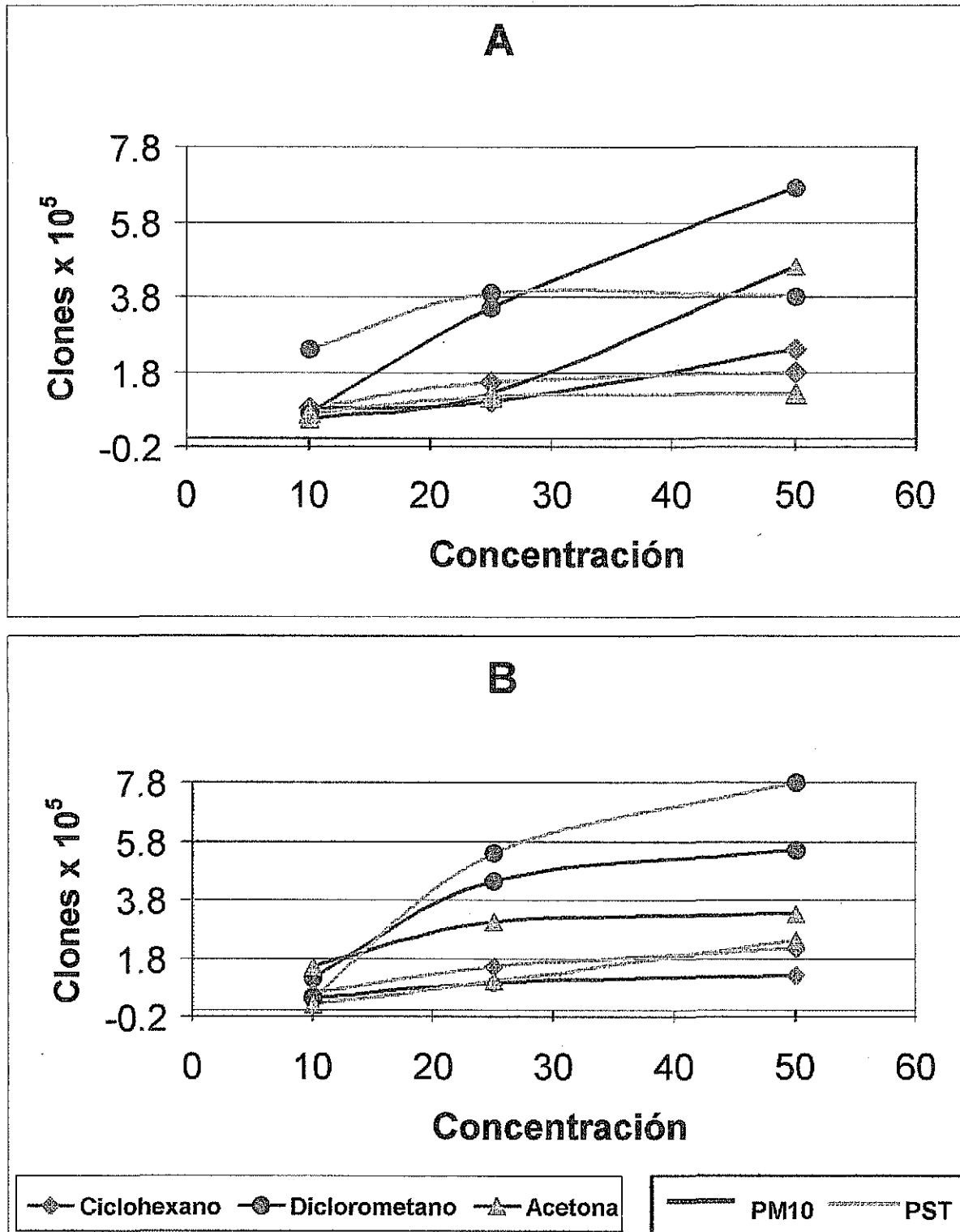


Figura 3.9. Clones inducidos en larvas de *Drosophila melanogaster* de la cruce BE al exponerlas a extractos orgánicos de época de secas (A) y de lluvias (B)

Al exponer a las larvas de la cruz estándar a los diversos extractos del fraccionamiento secuencial, se obtuvieron resultados positivos con PM10 en época de lluvias en las concentraciones de 25 y 50 m^3/ml con CX y DCM. Con ACT únicamente hubo diferencias significativas en la concentración más elevada. Al mismo tiempo se observaron resultados positivos con CX en PM10 de secas y con ACT en PST de lluvias en esta misma concentración. A pesar de haberse encontrado estos eventos significativos y que se llega a percibir en casi todos los casos una relación directa entre la concentración y el efecto (Fig. 3.8), la cantidad de eventos registrados en general en la cruz E fue muy bajo.

En el caso del cruzamiento BE se obtuvo respuesta positiva con todos los extractos a los que se sometieron las larvas de *Drosophila*. Para facilitar el análisis de estos resultados se presenta el gradiente de efectividad mutagénica en cada una de las temporadas o épocas del año. Para esto se consideró el valor máximo de clones inducidos, con la corrección del testigo y en cada caso se indica el tipo de disolvente y de material particulado.

Para la época de secas se obtuvo el siguiente gradiente de genotoxicidad; DCM/PM10 > ACT/PM10 > DCM/PST > CX/PM10 > CX/PST > ACT/PST. De este gradiente se notó que el efecto genotóxico para cada uno de los tipos de partículas fue mayor en PM10, que la fracción con más efectividad fue la de polaridad media (DCM), seguida por la de ACT. Todo esto da idea de la presencia de compuestos secundarios con polaridad incrementada y que se comportan como promutágenos, asociados a las partículas.

Para la temporada de lluvias esta relación cambió en los extractos de ciclohexano y diclorometano, al ser más genotóxico PST que PM10 (Fig. 3.9), el arreglo del gradiente fue: DCM/PST > DCM/PM10 > ACT/PM10 > ACT/PST = CX/PST > CX/PM10. Nuevamente se hizo evidente que el mayor efecto se vio con los extractos más polares, es decir, con diclorometano y acetona. Lo que concuerda, además, con la cantidad de MOE obtenida con DCM y principalmente con ACT.

De la comparación de los resultados de ambas épocas, se desprende que el efecto generado por los compuestos orgánicos asociados a las aeropartículas se debe en mayor parte a promutágenos pertenecientes a grupos químicos extraídos

posteriormente a la exposición del filtro con ciclohexano. Esta situación demuestra la capacidad de *Drosophila* para la detección de diferentes grupos químicos de contaminantes, entre los que se pueden encontrar hidrox-, metoxi- y nitro-derivados, lo que concuerda con resultados previamente reportados por nuestro grupo (Delgado-Rodríguez *et al.* 1999).

Al analizar los resultados de la cruz BE con relación a la masa de partículas colectadas, humedad relativa y MOE, se observó de acuerdo con lo esperado, que para PM10 la mutagenicidad correlaciona directamente con la masa de partículas por época y se notó que en el caso de la temporada de secas PM10 fue más efectivo que en la época de lluvias. Esto coincide también con la MOE obtenida, sobre todo con DCM y se relaciona de forma inversa con la presencia de humedad en el ambiente, lo que no necesariamente estaría indicando una relación de causalidad-efecto.

En el caso de los datos encontrados con PST se observó que contra lo esperado, la relación se invierte ya que el mayor efecto se obtuvo en los tres extractos de lluvias a pesar de haberse colectado mayor masa de partículas y más MOE en la temporada de secas. Esto evidentemente implica que la relación con el porcentaje de humedad relativa sea directa. Lo que estaría de acuerdo con el hecho de que las partículas de tamaños mayores en el ambiente, que comprenden las PST colectadas durante los meses de secas, estarían conformadas por materiales como cuarzos y silicatos, provenientes de la erosión y la resequedad de los suelos arenosos, debido a la falta de humedad. Mientras que durante los meses de lluvias, su constitución química se altera al incrementarse el porcentaje de partículas de origen antropogénico, incluidas en esta fracción y que no forman parte de las PM10.

Para establecer la capacidad de cada extracto para inducir mutaciones, se obtuvieron las potencias mutagénicas, que corresponden a la pendiente de la recta generada a partir de la correlación lineal de los datos. Este valor permitió en primera instancia establecer de manera global la efectividad de los distintos tratamientos. Es importante destacar que en todos los casos la correlación lineal fue positiva. Los resultados para la cruz BE se muestran en la figura 3.10.

Al comparar el análisis de potencias mutagénicas con el nivel de efecto de la concentración más alta, se notaron dos situaciones: La primera corresponde a la época de secas, en la que se obtuvo claramente una mayor potencia mutagénica de

todos los extractos (CX, DCM y ACT) de PM10, con respecto a PST. Por otro lado, en época de lluvias se observó un comportamiento contrario, esta vez fueron los de PST los que mostraron mayor potencia mutagénica para cada uno de los disolventes. Esto corroboró el hecho de que las características químicas de las PST se alteraron durante la época de lluvias, mientras que en el caso de las PM10, pareciera ser que la presencia de las lluvias redujo aquellos compuestos asociados con capacidad genotóxica.

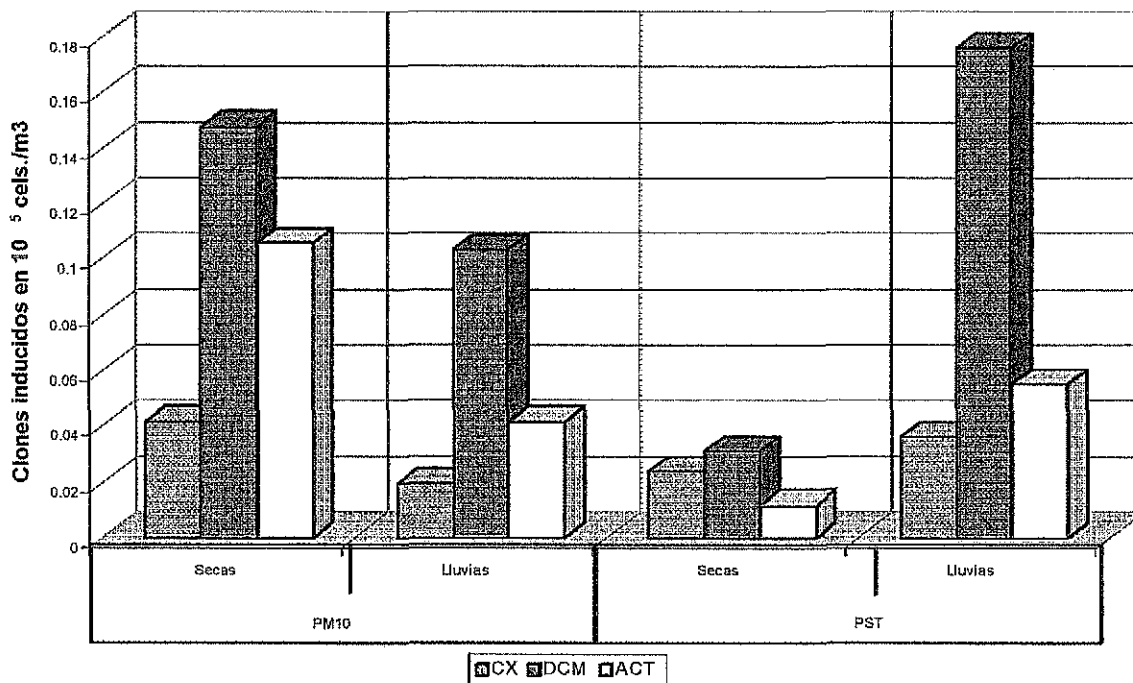


Figura 3.10. Clones inducidos en 10^5 células/m³, al exponer a larvas de *Drosophila melanogaster* de la cruz BE a tres fracciones orgánicas de compuestos asociados a PM10 y PST

Además de esto, se evidenció más claramente que los extractos que contenían a los compuestos medianamente polares y polares (DCM y ACT), fueron los más potentes, mientras que el CX fue para cada época y tipo de material particulado, el menos genotóxico.

De la experiencia anterior y de los resultados obtenidos con *Drosophila* en este trabajo, se pudo reconocer la dificultad de trabajar con bioensayos *in vivo*. Lo que se hace más evidente cuando la respuesta obtenida no coincide con la

esperada. Es esta situación la justifica la importancia de su empleo ya que debido a la existencia en el ambiente de grupos específicos de contaminantes con capacidades genotóxicas, su interacción en la atmósfera con otros grupos de compuestos químicos, en conjunto con las condiciones meteorológicas, puede resultar en la disminución o aumento de la potencia mutagénica de los contaminantes.

Con el fin de determinar cual de los extractos correspondientes a las diferentes fracciones obtenidas fue más genotóxico se discutió con base en la respuesta de la máxima concentración y al potencial genotóxico, el que involucra a las tres concentraciones evaluadas, de lo que se puede decir que:

1. Los compuestos genotóxicos más importantes, presentes en los extractos son casi exclusivamente promutágenos.
2. El disolvente que presentó mayor genotoxicidad fue el DCM, seguido de la ACT y finalmente del CX. Aparentemente son los derivados de los HAP y otros compuestos orgánicos policíclicos los que implican mayor riesgo en cuanto a su potencial genotóxico en *Drosophila melanogaster*.
3. La genotoxicidad de los extractos orgánicos asociados a las PM10 y PST se modificó según la época (secas y lluvias).

Tomando en cuenta que la naturaleza de este tipo de estudios se basa en el establecimiento de los riesgos a los que se expone un organismo en ambientes contaminados, se analizaron los datos para determinar la concentración mínima efectiva (CME), definida como la primera en duplicar el daño en las células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*. Debe recordarse que dentro del contraste de las hipótesis, la frecuencia basal o testigo debe al menos ser duplicada, para aceptar la alternativa.

Del análisis descriptivo se obtuvo la figura 3.11. En la que se nota que en cinco de los doce tratamientos, la concentración mínima efectiva correspondió a 25 m³/ml, y en los otros siete a 10 m³/ml. En todos los casos, el efecto detectado en la CME es mayor cuando se trata de la época de lluvias aún cuando corresponda a 25 m³/ml. Esto se puede observar en los tres extractos orgánicos con PST, en los que la concentración mínima efectiva de la época de lluvias corresponde a 25 m³/ml,

concentración con la que se obtuvo un efecto mayor que en época de secas. La CME en época de secas corresponde a $10 \text{ m}^3/\text{ml}$, en todos los casos, siendo la excepción PM10 con ACT.

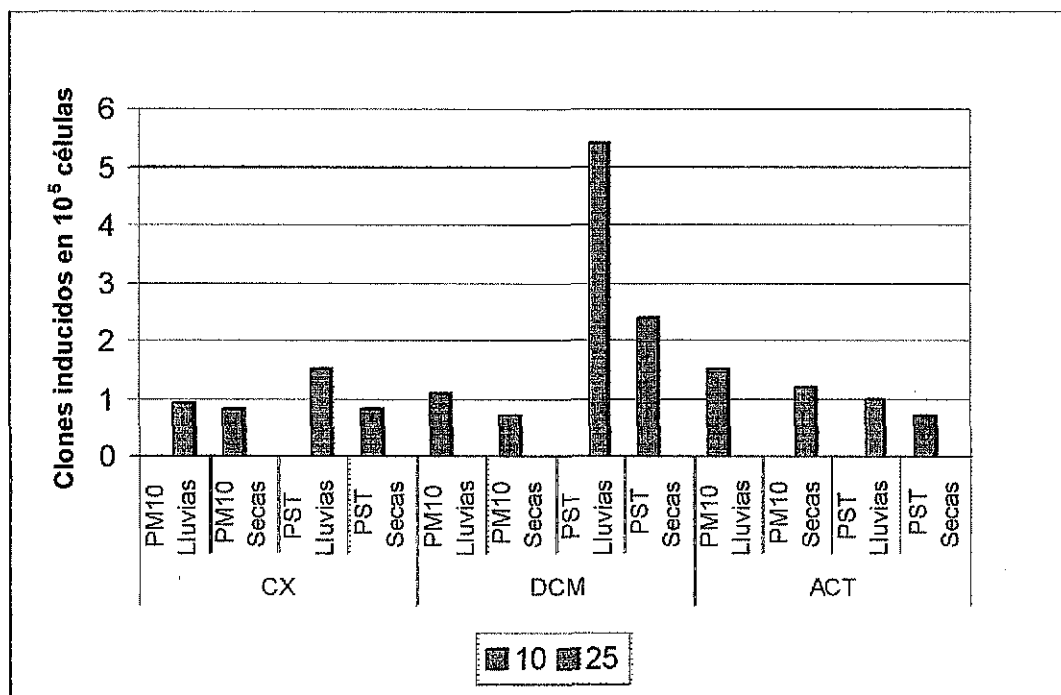


Figura 3.11. Concentración mínima efectiva (m^3/ml) para cada una de las muestras evaluadas en la prueba del ala de *Drosophila melanogaster*, con la cruz BE

Al contrastar con la potencia genotóxica (Fig. 3.10) se observa que aún cuando esta es evidentemente mayor para acetona con respecto a ciclohexano, el nivel de genotoxicidad es muy similar a concentraciones bajas para ambos extractos. Lo que implica que la presencia en el ambiente tanto de compuestos no polares, como los extraídos con CX y aquellos obtenidos con ACT, implican un riesgo importante para la población y los organismos expuestos a ellos.

Finalmente, es interesante el enfoque que se logra con el análisis de la CME ya que a pesar de que la potencia genotóxica de los extractos orgánicos de las aeropartículas en época de lluvias pareció ser más elevada en cuanto a su efectividad biológica. Los compuestos orgánicos extraídos de los filtros de la época de secas, fueron capaces de provocar daño a menores concentraciones, aún cuando en el caso de PST fueron los que reportaron la menor potencia genotóxica.

3.5 Análisis químico

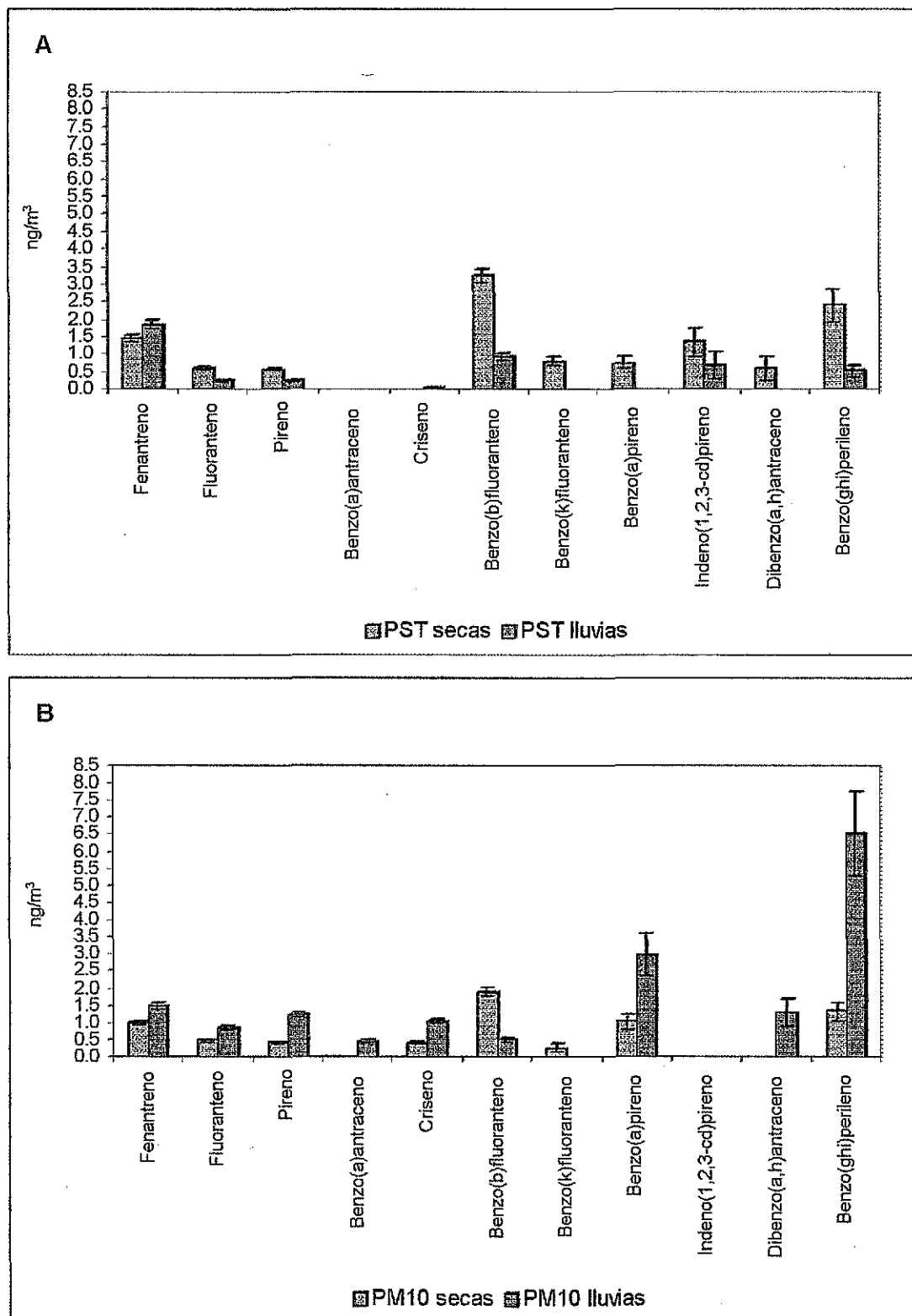


Figura 3.12. Concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos adsorbidos a las (A) PST y (B) PM10, en los muestreos realizados en la estación del Pedregal de San Ángel durante 1993

Los análisis realizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas en el modo de ión seleccionado mostraron la presencia de diez HAP contenidos en la MOE de PM10 y de PST de los 19 reportados por el método TO-13A de la USEPA (1999). Los blancos de los tres disolventes demostraron la ausencia de contaminación por el manejo de la muestra durante la extracción y la concentración. Los HAP adsorbidos a las PST superiores a 1 ng/m³ fueron benzo(b)fluoranteno > fenantreno > benzo(ghi)perileno > indeno(1,2,3-cd)pireno, mientras que benzo(ghi)perileno > benzo(a)pireno > dibenzo(a,h)antraceno > fenantreno > benzo(b)fluoranteno, lo fueron en las PM10 (Fig. 3.12, y Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Hidrocarburos aromáticos policíclicos en ng/m³ adsorbidos a las PST y a las PM10 en las temporadas de secas y lluvias en el Pedregal de San Ángel durante 1993

HAP	PST Secas	± EE	PST Lluvias	± EE	PST Promedio anual	± EE
Fenantreno	1.45	0.11	1.86	0.14	1.66	0.20
Fluoranteno	0.59	0.06	0.23	0.02	0.41	0.18
Pireno	0.54	0.03	0.22	0.01	0.38	0.16
Criseno	ne	ne	0.05	0.01	0.05	0.00
Benzo(b)fluoranteno	3.24	0.20	0.90	0.09	2.07	1.17
Benzo(k)fluoranteno	0.78	0.12	ne	ne	0.78	0.00
Benzo(a)pireno	0.74	0.16	ne	ne	0.74	0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno	1.33	0.41	0.68	0.37	1.00	0.33
Dibenzo(a,h)antraceno	0.59	0.32	ne	ne	0.59	0.00
Benzo(ghi)perileno	2.40	0.46	0.52	0.17	1.46	0.94
Suma	11.66	1.86	4.45	0.80	8.06	3.60

HAP	PM10 Secas	± EE	PM10 Lluvias	± EE	PM10 Promedio anual	± EE
Fenantreno	1.00	0.06	1.48	0.09	1.24	0.24
Fluoranteno	0.47	0.03	0.84	0.06	0.66	0.18
Pireno	0.43	0.03	1.21	0.05	0.82	0.39
Benzo(a)antraceno	ne	ne	0.46	0.03	0.46	0.00
Criseno	0.42	0.02	1.05	0.05	0.73	0.32
Benzo(b)fluoranteno	1.89	0.13	0.49	0.05	1.19	0.70
Benzo(k)fluoranteno	0.27	0.12	ne	ne	0.27	0.00
Benzo(a)pireno	1.02	0.22	2.99	0.63	2.01	0.98
Dibenzo(a,h)antraceno	ne	ne	1.27	0.39	1.27	0.00
Benzo(ghi)perileno	1.31	0.25	6.51	1.24	3.91	2.60
Suma	6.81	0.85	16.30	2.58	11.56	4.75

EE - Error estándar
ne - No encontrado

Es interesante resaltar que de los diez HAP determinados en ambos tipos de partículas, nueve se encontraron tanto en PST como en PM10, con excepción del indeno(1,2,3-cd)pireno que no se observó en las PM10 y la ausencia del benzo(a)antraceno en las PST. Esto indica que los HAP provienen de la misma fuente de emisión. La cantidad promedio anual de HAP \pm el error estándar fue menor en las PST ($8.1 \pm 3.6 \text{ ng/m}^3$) que en las PM10 ($11.6 \pm 4.7 \text{ ng/m}^3$) (Tabla 3.8). Sin embargo, no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$). Aunque se esperaría mayor cantidad de HAP en PST que en PM10, probablemente el sistema de extracción no tuvo la misma respuesta para desadsorberlos de las partículas, debido a su composición química. Las PM10 están constituidas principalmente por sulfatos, nitratos, iones de amonio, ácidos, cloruros, agua, metales y carbón elemental y orgánico (John *et al.* 1990), mientras que las PST están formadas en su mayoría por Si, Al, Ti, Mg, Fe, CaCO_3 , NaCl, polen, esporas, hongos, fragmentos de plantas y animales y ceniza (Salazar *et al.* 1993, Wilson y Suh 1996). Por otra parte, los resultados también sugieren que la distribución de estos compuestos depende del tamaño de la partícula. Lo anterior concuerda con los resultados descritos en otros estudios (Van Vaeck y Van Cawenberghe 1978, Baek *et al.* 1991, Peltonen y Kuljukka 1995), en donde observaron que los HAP se concentraron en las partículas respirables de menor diámetro ($\leq 3.5 \mu\text{m}$), en las que han sido hallados del 70 al 90 % de estos hidrocarburos.

Los resultados indican que la cantidad total de HAP fue mayor en las PM10 de la temporada de lluvias ($16.3 \pm 2.6 \text{ ng/m}^3$) que en la de secas ($6.8 \pm 0.9 \text{ ng/m}^3$), mientras que en PST fue menor en lluvias ($4.5 \pm 0.8 \text{ ng/m}^3$) que en secas ($11.7 \pm 1.9 \text{ ng/m}^3$).

Las Normas Mexicanas no han establecido los límites permitidos de concentración de HAP en ambientes extramuros, y Sitting (1994) ha citado algunos valores límites para diversos lugares de los EUA (Tabla 3.9). Tomando estos datos como referencia, el promedio anual de benzo(a)pireno adsorbido a PST (0.74 ng/m^3) y a PM10 (2.0 ng/m^3), obtenidos en este estudio, rebasaron el límite anual propuesto para Arizona (0.57 ng/m^3) (NATICH 1992). Sin embargo, el primero fue inferior y el segundo similar al encontrado en Pensilvania (2.0 ng/m^3) (TACB 1992), mientras que el dibenzo(a,h)antraceno en las PST (0.59 ng/m^3) y en las PM10 (1.27 ng/m^3) rebasó

los 0.57 y 0.071 ng/m^3 marcados para Arizona y Florida, respectivamente (NATICH 1992). Los demás HAP en la tabla 3.9 fueron superiores a los hallados en este trabajo (Amador-Muñoz *et al.* 2002).

Tabla 3.9. Límites de HAP en el aire ambiente establecidos para algunos sitios de los Estados Unidos de América

HAP	Límite en el aire ambiente (ng/m^3) (anual)	Lugar en Estados Unidos de América	Referencia
Fenantreno	1,300.00	Vermont	NATICH (1992)
Fluoranteno	60.00	Louisiana	NATICH (1992)
Pireno	3,400.00	Vermont	NATICH (1992)
Criseno	50.00	Texas	NATICH (1992)
Benzo(a)pireno	0.57	Arizona	NATICH (1992)
	2.00	Pensilvania	TACB (1992)
Dibenzo(ah)antraceno	0.57	Arizona	NATICH (1992)
	0.07	Florida	

Fuente: Datos tomados de Sittig (1994)

Zielinska *et al.* (1998) hicieron monitoreos de PST con equipos de grandes volúmenes de 1994 a 1996 en varios sitios de Arizona (EUA) como Phoenix y Tucson (zona residencial), Payson (zona montañosa) y Casa Grande (zona agrícola). El rango de concentración promedio anual en ng/m^3 para fluoranteno estuvo entre 5.57 y 7.19, para pireno entre 3.61 y 6.18, para benzo(a)antraceno entre 0.15 y 0.40, para criseno entre 0.49 y 1.71, para benzo(a)pireno entre 0.43 y 1.79, para indeno(1,2,3-cd)pireno entre 0.33 y 1.04 y para benzo(ghi)perileno entre 0.73 y 1.59. Las concentraciones de fluoranteno, pireno y criseno fueron superiores a las halladas en las PST de este estudio, sin embargo, los tres últimos se observaron en los intervalos señalados, incluso, indeno(1,2,3-cd)pireno y benzo(ghi)perileno, superaron estos rangos en la temporada de secas (Tabla 3.9).

De los compuestos identificados, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno y benzo(ghi)perileno son indicadores principalmente de fuentes vehiculares (gasolina y diesel), de la combustión de la basura, del humo del tabaco y de la producción de aluminio (Collier 1972, Collins-Williams *et al.* 1973, Berglund *et al.* 1974, Bidleman y Olney 1975, Grimmer *et al.* 1980, Daisey *et al.* 1986). Debido a su estabilidad atmosférica se les ha considerado como marcadores

de los HAP (Nielsen 1984 a, b). Los tres primeros son considerados como carcinógenos (IARC 1983).

Al contrastar los resultados obtenidos entre el análisis químico y los derivados de los bioensayos con *Salmonella* y *Drosophila*, se nota la ausencia de correlación, lo que supone la presencia en el ambiente de compuestos químicos cuya naturaleza es muy diversa generados por emisiones vehiculares y la quema de basura al aire libre, además de las diversas reacciones que se llevan a cabo entre ellos, produciendo compuestos secundarios (Lowenthal *et al.* 1995).

Drosophila melanogaster como parte de una batería de bioensayos para el estudio de los riesgos a la salud por la contaminación ambiental. Ofrece ventajas básicas sobre otras pruebas de mutagenicidad, debido a que se trata de un organismo eucarioto con el que se pueden evidenciar los efectos de compuestos de acción indirecta *in vivo*. Pero el aspecto más importante es la capacidad que tiene SMART, para el análisis de la recombinación somática o mitótica. La cual está implicada en la pérdida de heterocigocidad y por lo tanto en la manifestación de enfermedades heredables recesivas o en la progresión de neoplasias, además de otros procesos como el envejecimiento (Happle 1999). Por lo que aquellos contaminantes con capacidad recombinagénica juegan un papel muy importante cuando se trata de sus efectos a la salud. Todo esto ha generado gran interés por evaluar estos procesos además de la mutagenicidad, las aberraciones cromosómicas y las aneuploidías, mediante el empleo de ensayos que van desde procariotos, hasta mamíferos *in vivo* (Sengstag 1994).

En este sentido, *Drosophila melanogaster* y especialmente la versatilidad de SMART para el análisis de compuestos puros y en mezclas complejas, hacen de este bioensayo una excelente alternativa. Es tan útil para predecir la capacidad genotóxica y carcinogénica de moléculas específicas, como los bioensayos con procariotos *in vitro*, pero además, es tan eficiente como los sistemas eucariotos que se realizan *in vivo*. Esto tomando como ejemplo la correlación observada entre la genotoxicidad evidenciada en SMART empleando las alas de *Drosophila melanogaster* y datos epidemiológicos sobre el uso de tricíclicos antidepresivos, como factor de riesgo para la aparición de cáncer de mama (Sharpe *et al.* 2002).

Correlación que se demostró, aún sobre bioensayos con linfocitos humanos y pruebas de mutagenicidad en bacterias.

Las respuestas obtenidas con los dos bioensayos empleados para el análisis de los extractos orgánicos de aeropartículas, en este y otros trabajos, evidencian la complejidad de las mezclas ambientales. Además, como se mencionó anteriormente, dejan claro que existen compuestos de distinta naturaleza que pueden actuar directa o indirectamente.

Las diferencias observadas entre SMART y *Salmonella typhimurium*, sobre la base de la naturaleza de cada uno de los bioensayos, dejan muy claro el hecho de que los componentes de las mezclas ambientales pueden tener diferentes formas de acción, lo que lleva a la necesidad de contar con bioensayos que evalúen en forma eficiente la genotoxicidad, pero que también detecten recombinagénesis.

Finalmente, *Drosophila melanogaster* tiene una gran capacidad para la determinación de genotóxicos, por ser un eucariota *in vivo*, con posibilidad de metabolizar compuestos genotóxicos, y por la importancia que guarda con la recombinagénesis, como uno de los posibles orígenes de los eventos que se recobran, tras su exposición a mezclas complejas. Mientras que con el empleo de *Salmonella typhimurium*, únicamente se recobran eventos generados por mutación puntual y el sistema de metabolización de los agentes xenotóxicos se realiza *in vitro*, lo que no necesariamente funciona igual que cuando se lleva a cabo en el organismo.

De lo obtenido en los bioensayos y en el análisis químico, es claro que existen contaminantes en el aire de la Ciudad de México, con capacidad para afectar a los habitantes de esta gran urbe. La presencia de HAP tanto en secas como en lluvias, pero también la genotoxicidad inducida en ambos bioensayos en una de las áreas con menores índices de contaminación, urge a las autoridades y a la sociedad a analizar y concertar acciones conjuntas para reducir el riesgo a la salud por contaminantes ambientales. Políticas, programas y acciones encaminadas al mejoramiento de los combustibles, renovación y mejora de la eficiencia y uso de los transportes públicos, uso de tecnologías más limpias en los procesos industriales, comerciales y domésticos y un manejo eficiente de los residuos sólidos, entre otros.

4. CONCLUSIONES

- * Salvo en partículas \leq a 10 μm de diámetro (PM10) de la época de secas, se observó que la contaminación por material orgánico asociado a las aeropartículas fue mayor en la época de secas que en la de lluvias, además, fue mayor la cantidad de materia orgánica extraída (MOE) en PM10 que en las partículas suspendidas totales (PST), excepto para la época de secas en ciclohexano y acetona.
- * Se manifestó mayor concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) de peso molecular menor en PM10 de secas y los de mayor peso molecular en PST de ambas temporadas.
- * En todos los extractos, los resultados evidenciaron que el B(a)A y el B(ghi)P fueron los más persistentes. Posiblemente el comportamiento en cuanto a concentración en las épocas de lluvias y de secas se debió a la dinámica de distribución con respecto a su peso molecular y a la forma en que se originan las partículas de distintos tamaños.
- * Se encontró mutagenicidad tanto directa como indirecta en el ensayo con *Salmonella typhimurium*, lo que indica claramente la presencia de mutágenos directos e indirectos o promutágenos, siendo los extractos de PST más mutagénicos que los de PM10.
- * En cuanto a la mutagenicidad en *Drosophila*, el mayor efecto se obtuvo en la cruza BE, lo que sumado a las observaciones con *Salmonella* deja muy clara la importancia de los promutágenos en el ambiente.
- * En ambos bioensayos se obtuvo mayor genotoxicidad por unidad de muestreo (m^3), en los extractos de diclorometano y acetona, evidenciando así la influencia que tienen en los efectos biológicos contaminantes menos polares que los HAP entre los que se pueden mencionar hidroxi- metoxi- y nitro-HAP.
- * Es importante mencionar que ambos bioensayos correlacionaron entre sí, en cuanto a la relación de la respuesta genotóxica y la concentración de material particulado, lo que al mismo tiempo corresponde, aunque no con claridad, con la MOE obtenida.
- * No se observó correlación directa con el análisis químico. El comportamiento de los distintos compuestos detectados y la respuesta genotóxica, son indicadores que en

conjunto aportan elementos para establecer, las relaciones entre los contaminantes presentes en el ambiente.

* El empleo de las dos cruces de *Drosophila* permitió detectar la existencia de gran cantidad de promutágenos, lo que también concuerda con lo observado en *Salmonella*.

* Con SMART en *Drosophila melanogaster*, se pudieron reconocer efectos genotóxicos diferentes de los obtenidos con *Salmonella typhimurium*, sobre todo por el hecho de que la mosca de la fruta es un eucarioto con capacidad metabólica *in vivo* y cuyo espectro de detección incluye eventos de recombinación en células somáticas, lo que le da al bioensayo un valor especial por la relación que guarda con la inducción de procesos cancerosos.

* Del análisis químico se identificaron 10 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en PM10 y en PST. Los que corresponden a: benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)pireno y fenantreno. Mismos que presentaron promedios anuales mayores a 1 ng/m³. De ellos, los tres primeros son indicadores de emisiones vehiculares (gasolina y diesel) y de la quema de basura al aire libre, actividades que muy probablemente sean las principales fuentes de emisión en la zona de muestreo.

*La presencia de HAP indicativos de emisiones vehiculares, pero también de la quema de residuos sólidos y la evidencia de que existen compuestos genotóxicos en el aire de una de las zonas con índices relativamente bajos de contaminación ambiental, deja clara la necesidad de contar con programas eficientes para abatir la contaminación en la Ciudad de México. Acciones tendientes sobre todo a mejorar el transporte público, reducir el uso de vehículos particulares y hacer eficiente el manejo de los residuos sólidos domésticos.

5. REFERENCIAS

- Ahmad S., Kirkland K.E y Blomquist G.J. (1987). Evidence for a sex pheromone metabolizing cytochrome P450 mono-oxygenase in the housefly. *Arch Insect Biochem. Physiol.* **6**,121-140.
- Ahuja M.S., Paskinf J., Houck J.E. y Chow J.C. (1989). Design of a study for the chemical and size characterization of particulate matter emissions from selected sources in California. En: *Transactions: receptor models in air resources management* (J.G. Watson, Ed.) AWMA, Pittsburgh, pp. 145-158.
- Alink G.M., Smit H.A., van Houdt J.J., Kolkman J.R. y Boleij J.S.M. (1983). Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations. *Mutat. Res.* **116**, 21-34.
- Amador-Muñoz O., Delgado-Rodríguez A., Villalobos-Pietrini R., Munive-Colín Z., Ortíz-Marttelo R., Díaz-González G., Bravo-Cabrera J.L. y Gómez-Arroyo S. (2001). Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México. *Rev. Int. Contam. Amb.* **17**, 193-204.
- Ames B.N., Durston W.E. y Lee F.D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 2281-2285.
- Ames B.N., McCann J. y Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
- Ames B.N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. *Science* **204**, 587-593.
- Ames B.N., Magaw R. y Gold L.S. (1987). Ranking possible carcinogenic hazards. *Science* **236**, 271-280.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ashburner M. (1989). *Drosophila, a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Atherholt T.B., McGarrity G.J., Louis J.B., McGeorge L.J., Lioy P.J., Daisey J.M., Greenberg A. y Darack F. (1984). Mutagenicity studies of New Jersey ambient air particulate extracts. En: *Short-term bioassays in the analysis of complex mixtures IV*. (M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss y S. Nesnow, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 211-231.
- Atkinson R. y Aschmann S.M. (1988). Kinetics of the reactions of acenaphthene and acenaphthylene and structurally-related aromatic compounds with OH and NO₃ radicals, N₂O₅ and O₃ at 296 ± 2 K. *Int. J. Chem. Kinet.* **20**, 513-539.
- Baars A.J. (1980). Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug Metab. Rev.* **11**, 191-221.
- Baek S.O., Goldstone M.E., Kirk P.W.W., Lester J.N. y Perry R. (1991). Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. *Chemosphere* **22**, 503-520.
- Barale R., Giromini L., Del Ry S., Barnini B., Bulleri M., Barrai I., Valerio F., Pala M. y He J. (1994). Chemical and mutagenic patterns of airborne particulate matter collected in 17 Italian towns. *Environ. Health Perspect.* **102**, 67-73.
- Berglund B., Berglund U. y Lindvall T. (1974). Measurements of rapid changes of odor concentration by a signal detection approach. *J. Air. Pollut. Cont. Assoc.* **24**, 162-164.
- Bidleman T.F. y Olney C.E. (1975). Long range transport of toxaphene insecticide in the atmosphere of the western North Atlantic. *Nature* **257**, 475-477.
- Bodenstein D. (1950). The postembryonic development of *Drosophila*. En: *Biology of Drosophila* (M. Demerec, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, pp. 275-367.

- Bowes III S.M. y Swift D.L. (1989). Deposition of inhaled particles in the oral airway during oronasal breathing. *Aerosol Sci. Technol.* **11**, 157-167.
- Brattsten L.B. (1979). Ecological significance of mixed-function oxidations. *Drug Metab. Rev.* **10**, 35-58.
- Breyse P.N. y Swift D.L. (1990). Inhability of large particles into the human nasal passage: *in vivo* studies in still air. *Aerosol Sci. Technol.* **13**, 459-464.
- Brook J.R., Dann T.F. y Burnett R.T. (1997). The relationship among TSP, PM10, PM2.5, and inorganic constituents of atmospheric particulate matter at multiple Canadian locations. *J.A.W.M.A.* **47**, 2-19.
- Brusick D. (1988). Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutat. Res.* **205**, 69-78.
- Brusick D. (1999). Genetic toxicology. En: *Toxicology*. (H. Marquardt, S.G. Schäfer, R.O. McClellan y F. Welsch, Eds.). Academic Press, Nueva York, pp. 127-149.
- Butterworth F.M. (1994). Introduction to biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. (F.M. Butterworth, L.D. Corkum y J. Guzmán-Rincón, Eds.). Plenum Press, Nueva York, 348 p.
- Carey P.M. (1986). Air toxics emissions from motor vehicles. EPA/AA/TSS/PA-8615, Environmental Protection Agency. Ann Arbor, MI.
- Chrisp C.E. y Fisher G.L. (1980). Mutagenicity of airborne particles. *Mutat. Res.* **76**, 143-164.

- Christie W.N. (1996). Pollution and solutions: air, water and land. En: *Introduction to environmental technology*. (N.K. Ostler, Ed.). Prentice Hall, Nueva Jersey, Vol. 1, 334 p.
- Clark A.M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutat. Res.* **2**, 89-97.
- Collier L. (1972). Determination of bis-chloromethyl ether at the ppb level in air samples by high resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **6**, 930-932.
- Collins-Williams C., Kuo H. K., Davidson S., Varga E.A., Collins-Williams D. y Fitch M. (1973). Atmospheric pollen counts in Toronto, Canada. *Ann. Allergy* **31**, 65-68.
- Czerwinski M., McLemor T.L., Philpot R.M., Nahmburo P.T., Korzekwa K., Gelboin H.V. y González F.J. (1991). Metabolic activation of 4-ipomeanol by complementary DNA-expressed human cytochromes P450: evidence for species-specific metabolism. *Cancer Res.* **51**, 4636-4638.
- Daisey J.M., Leyko M.A., Kleinman M.T. y Hoffman E. (1979). The nature of the organic fraction of the New York City summer aerosol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **322**, 125-142.
- Daisey J.M., Cheney J.L. y Liroy P. (1986). Profiles of organic particulate emissions from air pollution sources: status and needs for receptor source apportionment modelling. *J. Air. Pollut. Control Assoc.* **36**, 17-33.
- Dapkus J. y Merrell D.J. (1977). Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **87**, 685-697.
- Delgado-Rodríguez A., Ortiz-Marttelo R., Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S. y Graf U. (1995). Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitroderivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **341**, 235-247.

- Delgado-Rodríguez A., Ortiz-Marttelo R., Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S. y Graf U. (1999). Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* **39**, 33-43.
- De Marini D.M. (1991). Environmental mutagens/complex mixtures. En: *Genetic Toxicology* (A.P. Li y R.H. Heflich, Eds.). CRC Press, Florida, pp. 285-302.
- De Marini D.M., Bell D.A., Levine J.G., Shelton M.L. y Abu-Shakra A. (1993). Molecular analysis of mutations induced at the hisD3052 allele of *Salmonella* by single chemicals and complex mixtures. *Environ. Health Perspect.* **101**, 207-212.
- De Martinis B.S., Kado N.Y., de Carvalho L.R.F., Okamoto R.A. y Gundel L.A. (1999). Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* **446**, 83-94.
- Devereux J., Haeberli P. y Smithies O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Doll R. y Peto R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1191-1308.
- Durston W. y Ames B.N. (1974). A simple method for the detection of mutagens in urine: studies with the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **71**, 737-741.
- Esmen N. y Corn M. (1971). Residence time of particulates in urban air. *Atmos. Environ.* **5**, 571-578.
- Fearon E.R. y Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- Feyereisen R. (1993). Cytochrome P450 in Insects. En: *Cytochrome P450*. (J.B. Schenkman y H. Greim, Eds.). Springer Verlag, Berlin, pp. 311-324.

- Fichtl B. (1999). Principles of toxicokinetics. En: *Toxicology*. (H. Marquardt, S.G. Schäfer, R.O. McClellan y F. Welsch, Eds.). Academic Press, Nueva York, pp. 43-82.
- Finlayson-Pitts J.B y Pitts N.J. Jr. (2000). *Chemistry of the upper and lower atmosphere*. Academic Press, Nueva York, 969 p.
- Flessel P., Wang Y.Y., Chang K.-I., Wesolowski J.J., Guirguls G.N., Kim I.-S., Levaggi D. y Siu W. (1991). Seasonal variations and trends in concentrations of filter-collected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and mutagenic activity in the San Francisco bay aerea. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **41**, 276-281.
- Frank M.R. y Fogleman J.C. (1992). Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran Desert *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**, 11998-12002.
- Frei H. y Würigler F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* **203**, 297-308.
- Frölich A. y Würigler F.E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* **216**, 179-187.
- Frölich A. y Würigler F.E. (1990). *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* **234**, 71-80.
- García-Bellido A. y Merriam J.R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **24**, 61-87.
- García-Bellido A. y Dapena J. (1974). Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* **128**, 117-130.

- González F.J. y Nebert D.W. (1990). Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* **6**, 182-186.
- Graf U., Juon H., Katz A.J., Frei H.J. y Würigler F.E. (1983). A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* **120**, 233-239.
- Graf U., Würigler F.E., Katz A.J., Frei H.J., Juon H., Hall C.B. y Kale P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* **6**, 153-188.
- Graf U. y Singer D. (1989). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): effects of extracts of airborne particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters. *Chemosphere* **19**, 1094-1097.
- Graf U. y van Schaik N. (1991). Improved high bioactivation cross for the SMART wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **271**, 59-67.
- Grimmer G., Naujck K.-W. y Schneider D. (1980). Changes in PAH-profiles in different areas of a city during the year. En: *Polynuclear aromatic hydrocarbons* (A. Björseth y A.J. Dennis, Eds.) Battelle Press, Columbus, Ohio.
- Grimmer G. (1983). Chemistry. En: *Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. (G. Grimmer, Ed.), Boca Raton, Florida, pp. 27-60.
- Guzmán-Rincón J. y Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook*. (F.M. Butterworth, L.D. Corkum y J. Guzmán-Rincón, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 169-181.

- Hällström I., Blanck A. y Atuma S. (1984). Genetic variation in cytochrome P450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 13-20.
- Hällström I. y Blanck A. (1985). Genetic regulation of the cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P450 dependent reactions. *Chem. Biol. Interactions* **56**, 157-171.
- Hällström I. (1986). Genetic regulation of the cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. En: *Genetic toxicology of environmental chemicals, Part B, Genetic effects and applied mutagenesis*. (C. Ramel, B. Lambert y J. Magnusson, Eds.). Alan R. Liss, Inc, Nueva York, pp. 419-425.
- Hällström I. (1987). Genetic variation in cytochrome P450 dependent demethylation in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2279-2282.
- Happle R. (1999). Loss of heterozygosity in the human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **41**, 143-161
- Haugen A., Becher G., Benestad C., Vahakangas K., Trivers G.E., Newman M.J. y Harris C.C. (1988). Biomonitoring of individuals exposed to high levels of PAH in the work environment. En: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. (M.C. Cooke y A.J. Dennis, Eds.). Columbus, EUA, pp. 377-387.
- Hileman B. (1981). Particulate matter: the inhalable variety. *Environ. Sci. Technol.* **15**, 983-986.
- Hitzfeld B., Friedrichs K.H., Ring J. y Behrendt H. (1997). Airborne particulate matter modulates the production of reactive oxygen species in human polymorphonuclear granulocytes. *Toxicology* **120**, 185-95.
- Hoffmann G.R. (1994). Induction of genetic recombination: consequences and model systems. *Environ. Mol. Mutagen.* **24**, 59-66.

- Houck J.E., Chow J.C., Watson J.G., Simons C.A., Pritchett L.C., Goulet J.M. y Frazier C.A. (1989). Determination of particle size distribution and chemical composition of particulate matter from selected sources in California. Departamento de recursos del aire de California, Sacramento CA. Contrato No. A6-165-32, Servicios Ambientales OMNI Inc., Beaverton OR.
- Houk V. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. *Mutat. Res.* **277**, 91-138.
- Haupt D. R., Pursey J.C. y Morton R.A. (1988). Genes controlling malathion resistance in a laboratory-selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genome* **30**, 844-853.
- Hughes T.J., Pellizzari E., Little L. Sparacino C. y Kolber A. (1980). Ambient air pollutants: collection, chemical characterization and mutagenicity testing. *Mutat. Res.* **76**, 51-83.
- Hunt D.W.A. y Smirle M.J. (1988). Partial inhibition of pheromone production in *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) by polysubstrate monooxygenase inhibitors. *J. Chem. Ecol.* **14**, 529-536.
- IARC (International Agency for Research of Cancer) (1983). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Polynuclear aromatic compounds, Part 1, Chemical, environmental and experimental data. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- John W., Wall S. M., Ondo J. L. y Winklmayr W. (1990). Modes in the size distributions of atmospheric inorganic aerosol. *Atmos. Environ.* **24**, 2349-2359.
- Kier L.D., Yamasaki E. y Ames B.N. (1974). Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **71**, 4159-4163.
- Kilbey B. (1978). Mutagenicity screening: general principles and minimal criteria. *Mutat. Res.* **53**, 361-367.



- Koutrakis P., Wolfson J. M., Spengler J. D., Stern B. y Franklin C. A. (1989). Equilibrium size of atmospheric aerosol sulfates as a function of the relative humidity. *J. Geophys. Res.* **94**, 6442-6448.
- Krewski D., Leroux B.G., Creason J. y Claxton L. (1992). Sources of variation in the mutagenic potency of complex chemical mixtures based on the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* **276**, 33-59.
- Lee S. F. y Schuetzle D. (1983). Sampling, extraction, and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from internal combustion engines. En: *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*. (A. Björseth, Ed.). Academic Press, Nueva York, Vol. 1, pp. 27-94.
- Lehmann M. y Koolman J. (1986). The influence of forskolin on the metabolism of ecdysone and 20-hydroxyecdysone in isolated fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **367**, 387-393.
- Lindberg R.L. y Negishi M. (1989). Alteration of mouse cytochrome P450_{coh} substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature* **339**, 632-634.
- Lindsley D.L. y Zimm G. G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, Nueva York, 1133 p.
- Lowenthal D. H., Rogers C. F., Saxena P., Watson J. G. y Chow J. C. (1995). Sensitivity of estimated light extinction coefficients to model assumptions and measurement errors. *Atmos. Environ.* **29**, 751-766.
- Magnusson J. y Ramel C. (1990). Inhibitor of poly(ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* **5**, 511-514.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.

- Marshall C.J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell* **64**, 313-326.
- Matsumoto Y., Sakai S., Kato T., Nakajima T. y Satoh H. (1998). Long-term trends of particulate mutagenic activity in the atmosphere of Sapporo. 1. Determination of mutagenic activity by the conventional tester strains TA98 and TA100 during an 18-year period (1974-1992). *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2665-2671.
- McCann J., Choi E., Yamasaki E. y Ames B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **72**, 5135-5139.
- McCann J. y Ames B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. Part II. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **73**, 950-954.
- McCann J., Gold L.S., Horn L., McGill R., Graedel T.E y Kaldor J. (1988). Statistical analysis of *Salmonella* test data and comparison of results of animal cancer tests. *Mutat. Res.* **205**, 183-195.
- McMurry P.H., Litchy M., Huang P.-F., Cai X., Turpin B.J., Dick W. y Hanson A. (1996). Elemental composition and morphology of individual particles separated by size and hygroscopicity with the TDMA. *Atmos. Environ.* **30**, 101-108.
- Miranda J., Morales J.R., Cahill T.A., Aldape F. y Flores J. (1992). A study of elemental contents in atmospheric aerosol in Mexico City. *Atmósfera* **5**, 95-108.
- Moncmanová A., Tölgyessy J., Lesný J., Palatý J., Morávek S. y Harangozó M. (1993). Chemistry and biology of water, air and soil. En: *Studies in environmental Science No. 53*. (J. Tölgyessy, Ed.). Nueva York, 858 p.

- National Research Council. (1972). Particulate polycyclic organic matter. Committee on biologic effects of atmospheric pollutants. National Academy of Sciences, National Academic Press, Washington, DC.
- NATICH (National Air Toxics Information Clear in House) (1992). Databases Report on Federal, State, local air activities. Research Triangle Park, N.C., EPA Office of Air Quality Planning and Standards (Septiembre).
- Nebert D.W., Nelson D.R., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W., Phillips I.R., Sato R. y Waterman M.R. (1989). The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* **8**, 1-13.
- Nebert D.W. y Weber W.W. (1990). Pharmacogenetics. En: *Principles of drug action. The basis of pharmacology*. (W.B. Pratt y P. Taylor, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 469-531.
- Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., González F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O., Okuda K. y Nebert D. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**, 1-51.
- Nielsen T. (1984a). Reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons toward nitrating species. *Environ. Sci. Technol.* **18**, 157-163.
- Nielsen T. (1984b). Atmospheric occurrence of organolead compounds. En: *Biological effects of organolead compounds* (P. Grandjean, Ed.) CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Nielsen T., Feilberg A. y Binderup M.-L. (1999). The variation of street air levels of PAH and other mutagenic PAC in relation to the regulations of traffic emissions and the impact of atmospheric processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **6**, 126-130.

NOM-035-ECOL-1993. Norma Oficial Mexicana. "Que establece los métodos de medición para determinar la concentración de partículas suspendidas totales en el aire ambiente y el procedimiento para la calibración de los equipos de medición". Diario Oficial de la Federación 1993.

NOM-020-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 de diciembre de 1994, pp. 44-47.

NOM-021-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 de diciembre de 1994, pp. 47-50.

NOM-022-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 de diciembre de 1994, pp. 50-53.

NOM-023-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 de diciembre de 1994, pp. 53-56.

NOM-024-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 de diciembre de 1994, pp. 56-59.

NOM-025-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 dic.-1994, pp. 59-62.

NOM-026-SSA1-1993. México, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, CDXCV 16, 23 dic.-1994, pp. 62-65.

Omura T. y Sato R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 – 2378.

Peltonen K. y Kuljukka T. (1995). Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chrom. A*, **710**, 93-108.

- Piegorsch W.W. y Hoel D.G. (1988). Exploring relationships between mutagenic and carcinogenic potency. *Mutat. Res.* **196**, 161-175.
- Pitts J.N. Jr., van Cauwenberge K.A., Grosjean D., Schmid J.T., Fitz D.R., Belser W.L., Knudson G.B. y Hyndes P.M. (1978). Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science* **202**, 515-519.
- Rodes C. E. y Evans E. G. (1985). Preliminary assessment of 10 μ m particulate sampling at eight locations in the United States. *Atmos. Environ.* **19**, 293-303.
- Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Sanders D.R., Butler M., Kiriazides D.K. y Mermelstein R. (1980). Nitropyrenes: isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. *Science* **209**, 1039-1043.
- Salazar S. y Bravo J.L. (1986). Sulfatos y nitratos en partículas atmosféricas y su relación con algunos parámetros ópticos. *Geof. Int.* **25**, 455-469.
- Salazar S., Manríquez F., Carrera L.M. y Bravo J.L. (1993). Elemental and morphological analyses of atmospheric particles from Southwestern part of Mexico City. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**, 247-254.
- Schwartz J. (1994a). Air pollution and hospital admissions for the elderly in Detroit, Michigan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 648-55.
- Schwartz J. (1994b). Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ. Res.* **64**, 36-52.
- Sensttag C. (1994). The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 323-353.
- Sharpe C.R., Collet J.P., Belzile E., Hanley J.A. y Boivin J.F. (2002). The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *Brit. J. Cancer* **86**, 92-97.

- Shelby P.B. y Olson W.H. (1981). Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* **83**, 403-418.
- Sitting M. (1994). *World-wide limits for toxic and hazardous chemicals in air, water and soil*. Noyes Publication, Park Ridge, Nueva Jersey.
- TACB (Texas Air Control Board) (1992). List of effects screening levels. Austin, Texas (Junio 22).
- Tokiwa H. y Ohnishi Y. (1986). Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **17**, 23-60.
- Tong H.Y. y Karasek F.W. (1984). Quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particulate matter by high-performance liquid chromatography fractionation and high-resolution gas chromatography. *Anal. Chem.* **56**, 2129-2134.
- Thorgeirsson S.S., Glowinski I.B. y McManus M.E. (1983). Metabolism, mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines. *Rev. Biochem. Toxicol.* **5**, 349-386.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1999). Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air. Second Edition. Compendium method TO-13A, determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ambient air using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Center for Environmental Research. Information Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH 45268, Enero 1999. EPA/625/R-96/010b
- Van Houdt J.J., Alink G.M. y Boleij J.S.M. (1987). Mutagenicity of airborne particles related to meteorological and air pollution parameters. *Sci. Total Environ.* **61**, 23-36.

- Van Vaeck L. y Van Cawenberghe K. (1978). Cascade impactor measurements of the sizes distribution of the major classes of organic pollutants in atmospheric particulate matter. *Atmos. Environ.* **12**, 2229-2239.
- Villalobos-Pietrini R., Blanco S. y Gómez-Arroyo S. (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmos. Environ.* **29**, 517-524.
- Vogel E.W., Frei H., Fujikawa K., Graf U., Kondo S., Ryo H. y Würgler F.E. (1985). Summary report on the performance of the *Drosophila* assays. En: *Collaborative study of short-term tests for carcinogens. Progress in Mutation Research* (J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper y M. Ishidate, Eds.). Elsevier/North Holland, Amsterdam, Vol. 5, pp. 47-57.
- Vogel E.W., Graf U., Frei H. y Nivard M.M.J. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. En: *The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenesis hazard evaluation*. (D.B. McGregor, J.M. Rice y S. Venitt, Eds.). IARC Scientific Publications No. 146. Lyon, Francia, pp. 427-470.
- Waters M., Nesnow S., Huisingh J., Sandhu S. y Claxton L. (1978). Application of short-term bioassays in fractionation and analysis of complex environmental mixtures. EPA 600/9-78-027, 587 p.
- Waters L.C. y Nix C.E. (1988). Regulation of insecticide resistance-related cytochrome P450 expression in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**, 214-227.
- White R.A.J., Franklin R.T. y Agosin M. (1979). Conversion of α -pinete to α -pinene oxide by rat liver and the bark beetle *Dendroctonus terebrans* microsomal fractions. *Pestic. Biochem. Physiol.* **10**, 233-242.
- Wilson W. E. y Suh H. (1996). Fine and coarse particles: concentration relationships relevant to epidemiological studies. *J. Air Waste Man. Assoc.* **47**, 1238-1249.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Würgler F.E. y Vogel E.W. (1986). *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection*. (F.J. de Serres, Ed.). Plenum Press, Nueva York, Vol. 10, pp. 1-72.
- Zeiger E., Risko K.J. y Margolin B.H. (1985). Strategies to reduce the cost of mutagenicity screening with the *Salmonella* assay. *Environ. Mutagen.* **7**, 901-911.
- Zielinska B., Fujita E., Sagebiel J., Harshfield G., Uberna E. y Hayes T. (1998). Arizona hazardous air pollutants monitoring program. *J.A.W.M.A.* **48**, 1038-1050.
- Zijlstra J.A., Vogel E.W., Breimer D.D. (1987). Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. En: *Reviews in Biochemical Toxicology*. (E. Hodgson, J.R. Bend y R.M. Philpot, Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 121-154.