



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Efectos genotóxico y antigenotóxico en macrófagos
alveolares de cobayos expuestos a ozono mediante
el ensayo de electroforesis unicelular alcalina
(ensayo cometa)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ ROMERO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

APOYOS RECIBIDOS

Este trabajo se realizó con el apoyo económico otorgado por el CONACYT con la Beca-Crédito para estudios de Maetría (número de registro 182709) por el periodo de septiembre/2003 a junio/2005.

Miembros del Comité Tutorial

Dra. María Elena Calderón Segura

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Agradecimientos

A los miembros del jurado:

Agradezco profundamente a la Dra. María Elena Calderón Segura por aceptar emprender y terminar conmigo este proyecto. Gracias por todo el tiempo invertido en este trabajo, por compartir tus conocimientos incondicionalmente y por todo el apoyo tanto profesional como personal que ha contribuido grandemente en mi formación. Espero seguir contando siempre con tu amistad.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por ser parte importante y fundamental en este proyecto. Gracias por todos los consejos y sugerencias que sin duda ayudaron a mejorar este estudio.

A la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, gracias por permitirme contar con tu amistad, así mismo, agradezco todos los atinados consejos y comentarios que en su momento, seguramente permitieron mejorar la calidad de este trabajo

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul Vander Goes, por la revisión del trabajo y por las valiosas observaciones, las cuales permitieron dar mayor calidad profesional a esta tesis.

Al Dr. Moisés Selman Lama, por la revisión y comentarios al presente trabajo.

También agradezco al Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, especialmente a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y a la Dra. María Elena Calderón Segura, por todo el apoyo y las facilidades para la realización y conclusión satisfactorias de este proyecto.

Al Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), por su amplia contribución durante toda la fase experimental, así como al bioterio por proporcionar los cobayos para la obtención de las muestras biológicas.

A Lilia Cuellar Romano, porque ambas caminamos todo este trayecto hasta concluirlo, gracias por compartir conmigo experiencias, conocimientos y resolver problemas juntas. Hicimos muy buen equipo.

Agradezco especialmente a la M en C Bettina Sommer Cervantes, por ser parte importante de este proyecto, por estar siempre dispuesta a ayudarnos, por todas las observaciones, sugerencias y consejos que mejoraron notablemente el trabajo, especialmente por tu amistad. Mil Gracias.

Al Biol. Miguel Ángel Meneses Pérez, por el apoyo técnico brindado durante todo el proceso de experimentación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Citogenética Ambiental, por su compañerismo y por estar siempre pendientes de los avances del presente trabajo. A la Sra. Emma y a Vicky por su disponibilidad siempre que necesité de ustedes.

Dedicatoria

A Jehová Dios por ser quien nos provee de la materia prima para estudiarla, es decir, la naturaleza.

A mis padres Francisco y Ana, gracias por darme la vida y siempre llenarme de amor y cariño, gracias por estar siempre conmigo y darme toda la confianza y la libertad para hacer lo que yo quiera, gracias por toda la ayuda y apoyo que me dieron para que iniciara esta nueva carrera, fueron parte importante para que llegar a a la meta, toda la vida les voy a estar agradecida.
Los quiero mucho.

A mis hermanos Roberto, Miguel Ángel, Felipe y Pedro, por todos los momentos compartidos, por estar juntos en las buenas y en las malas, por el amor que nos tenemos y por estar siempre pendientes de mí y de mis proyectos en la vida.
Gracias.

A mis abuelitos Manuel (*in memoria*) y María por que han sido un ejemplo de vida para mí, un ejemplo de lucha constante, un ejemplo de no derrotarse por nada. Gracias abuelita por todo el amor y las enseñanzas que me sigues dando, nunca las voy a olvidar.

A todos mis tíos y primos que han estado pendientes de mis estudios profesionales y animándome a seguir adelante.

A la familia Hernández Rodríguez gracias por darme su amor y estar siempre dispuestos a ayudarme, gracias por todo su apoyo.

A Manuel, te agradezco el que hagas tuyos mis proyectos profesionales, gracias por darme toda tu comprensión, amor y ayuda incondicional, por hacer todo el trayecto más fácil para llegar juntos a esta meta.
Muchas gracias.

A Jaasiel, gracias por existir, por darme tu sonrisa todos los días, eres la bendición más grande en mi vida, eres la fuente de poder que siempre me impulsa para seguir adelante. Espero que llegues muy lejos y que siempre te esfuerces por ser mejor en lo que tú decidas ser. Te amo con todo mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN

Ozono – Contaminante ambiental
Calidad del aire
Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA)
Efectos del ozono en salud pública
Acción biológica del ozono
Equilibrio oxidante-antioxidante
Antioxidantes enzimáticos
Antioxidantes no enzimáticos
Sistemas vegetales antioxidantes
Vitamina C (ácido ascórbico)
Cilantro
Perejil
Prueba de genotoxicidad
Justificación

II. OBJETIVOS

III. HIPÓTESIS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Genotoxicidad
Animales y condiciones de exposición
Análisis genotóxico – Electroforesis Unicelular Alcalina
Evaluación del daño al ADN
Análisis estadístico
Antigenotoxicidad
Aislamiento de los extractos vegetales de cilantro y perejil
Esquema de administración oral de extractos de cilantro y perejil, así como vitamina C

V. RESULTADOS

Genotoxicidad
Antigenotoxicidad

VI. DISCUSIÓN

VII. CONCLUSIONES

VIII. REFERENCIAS

IX. TABLAS

X. GRÁFICAS

Palabras clave: ozono, genotoxicidad, antigenotoxicidad, macrófagos alveolares, antioxidantes, calidad del aire.

RESUMEN

Actualmente la población de la Ciudad de México está expuesta a grandes cantidades de contaminantes ambientales entre los que se encuentra el ozono (O_3). La Norma Mexicana de la Calidad del Aire establece estándares de exposición de 0.11 ppm de O_3 por una hora no más de tres veces al año. Sin embargo, según datos generados por la estación de monitoreo del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, las concentraciones máximas registradas rebasan hasta tres veces la norma de calidad del aire (0.33 ppm de O_3) con frecuencia durante el año. El ozono ejerce efectos adversos en la salud, especialmente para el sistema respiratorio, donde su blanco de acción son los lípidos de las membranas generando especies de oxígeno reactivos (ROS) como peróxido de hidrógeno, radical superóxido, radical hidroxilo, peróxidos de lípidos y aldehídos capaces de oxidar residuos de proteínas e interactuar con otras macromoléculas como ARN y ADN, induciendo aductos, aberraciones cromosómicas, e intercambio de cromátidas hermanas.

A nivel mundial se ha incrementado cada vez más el empleo de la herbolaria para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, disminución en la tasa de mutación, la vejez celular y el desarrollo de enfermedades cardiocerebrales. Diferentes especies vegetales de uso comestible tales como brócoli, lechuga, espinaca, cilantro, perejil, jitomate y zanahoria, entre otras contienen en sus fracciones celulares múltiples fitoquímicos con actividad antioxidante y antiproliferativa como son los flavonoides, terpenos, vitaminas A, C, E y clorofilas. En México el cilantro y el perejil son ampliamente consumidos en la dieta, los cuales por su contenido de flavonoides y monoterpenos tienen fuerte actividad antioxidante debido a su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, la captura y disminución de radicales libres y el aumento de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD).

En vista de que la población de la Ciudad de México y Zona Metropolitana está expuesta a una atmósfera oxidante que representa directa o indirectamente una fuente de formación de radicales libres que en condiciones biológicas puede guiar a la generación de ROS, los objetivos de este proyecto fueron evaluar el efecto genotóxico que produce

el ozono en los macrófagos alveolares de cobayos con 0.2 y 0.5 ppm de O₃ por 3 h/3 d, 1.0 y 2.0 ppm de O₃ por 3 h/1d y analizar las acciones antigenotóxicas de los extractos de cilantro y perejil y de la vitamina C (ácido ascórbico, como testigo positivo), mediante el ensayo de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa), método muy sensible para el análisis del daño al ADN a nivel de células individuales.

Los resultados mostraron que el ozono tiene efecto genotóxico con una relación de dosis–respuesta en los macrófagos alveolares de los cobayos, visualizado por incrementos significativos en la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas) y en la longitud de la cauda (fragmentación del ADN) comparados con los valores del testigo (0.0 ppm de ozono).

Cuando se administraron oralmente los extractos de cilantro y perejil (1.25 ml/kg de peso corporal) y la vitamina C (2.5 mg/kg de peso corporal) por 15 días previos a la exposición a 1.0 y 2.0 ppm de O₃, se evidenció reducción significativa en los mismos parámetros genotóxicos evaluados.

La viabilidad de los macrófagos alveolares no fue modificada con ninguna de las concentraciones de ozono con y sin administración oral de los extractos vegetales y la vitamina C, comparado con el valor del testigo (0.0 ppm de ozono) (98 %).

Por lo anterior, se concluye que la genotoxicidad del ozono en los macrófagos alveolares de los cobayos, posiblemente se debe a que los radicales libres producto de la peroxidación de lípidos, interactúan directamente con la molécula de ADN generando rompimientos en su cadena. Probablemente la mezcla de antioxidantes de los extractos de cilantro y perejil, así como la vitamina C capturan los radicales libres y/o evitan la peroxidación de lípidos que interactúan con el genoma disminuyendo los rompimientos de la cadena de ADN. Quizás estos extractos vegetales también contribuyan a incrementar *in vivo* las concentraciones de las enzimas antioxidantes endógenas para reducir el daño oxidante por ozono.

ABSTRACT

Population of the Mexico City is exposed at levels of ozone (O₃) superior to the Mexican Norm of the Quality of Air (0.11 ppm of O₃) by one hour or more than three times to the year exerting adverse effects in the respiratory system. Ozone as powerful oxidant agent that can be rapidly converted into a number of reactive oxidant species (ROS), capable of interacting with lipids, proteins, and nucleic acids. The ROS induced lesions on DNA which cause deletions, mutations and single- and double-strand breakage. The DNA breakage is highly toxic and mutagenic and can cause chromosomes aberrations, sister chromatide exchanges and adducts.

The lung is the most important barrier that the organism has against ozone exposure, it has evolved several systems that recognize and repair he various forms of DNA damage induced by oxidant stress. Primary defense mechanism include antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutases, glutation, as well as nonenzymatic endogenous antioxidants such as the vitamins C and E and other proteins.

Epidemiological studies have shown that the consumption of fruits and vegetables lower incidence and lower mortality rates of cancer in several human cohort and case-control studies for all common cancer sites. This protection can be explains by capacity of these antioxidants to scavenge free radicals, which are responsible for the oxidative damage of biomolecules.

Among the vegetables which are commonly included in the Mexican diet are Coriander (*Coriandrum sativum*) and parseley (*Petroselinum sativum*) different salads and salsas and with strong antioxidant activity. In the present investigation was carried out to study the protective effects of coriander and parsley crude extracts against genotoxicity of the ozone in alveolar macrophages *in vivo* through alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay).

The results have shown that ozone is genotoxic in guinea pigs alveolar macrophages were exposed to 0.2 and 0.5 ppm of O₃ by 3 h/3 days, and 1.0 and 2.0 ppm by 3 h/day. There was a concentration-dependent increase in the frequency of DNA damaged Cells and tail length (fragmentation of DNA). Two highest concentrations (1.0 and 2.0 ppm) induced severe damage of DNA. The viability of alveolar macrophages was

not modified in any concentrations compared with the value of the control (0.0 ppm ozone).

Antigenotoxic effect was analyzed, previous oral administration of coriander and parsley extracts and vitamin C by fifteen days, which significantly reduced damage to the DNA. Perhaps the mixture of antioxidants in these vegetables extracts and vitamin C capture the free radicals and/or avoid lipid peroxidation that interacts with the genome diminishing fragmentation of the DNA.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Ozono – Contaminante ambiental

El hombre usa los recursos naturales y modifica el ambiente para tener mejores condiciones para su desarrollo, sin embargo, a partir de 1900, debido al crecimiento poblacional explosivo, la industrialización y las pautas de consumo, también han intensificado la extracción y el empleo de los recursos sin que se haya avanzado en la misma magnitud en el manejo de los desechos producidos. Los residuos de las diferentes actividades humanas se descargan al ambiente y el resultado es que hoy en día las huellas son evidentes en prácticamente cualquier lugar del planeta por más alejado que se encuentre, la degradación del suelo y los problemas con la calidad del agua y del aire se han extendido ampliamente en el mundo (Semarnat 2002).

Las emisiones de contaminantes a la atmósfera no sólo tienen efectos locales en la salud de las personas, sino también a nivel regional en la alteración de los bosques y ecosistemas acuáticos o incluso a nivel mundial como el cambio climático y la reducción del espesor de la capa de ozono estratosférico que afecta severamente la Antártica así como algunas otras regiones del mundo. El crecimiento rápido y la concentración de la población en áreas urbanas frecuentemente están asociados a mayor presencia de actividades industriales, incremento del parque vehicular y elevado consumo de combustibles, que contribuyen a agudizar el problema de la contaminación atmosférica. La calidad del aire en México es una preocupación permanente, ya que los signos más evidentes de su deterioro como el aumento en las molestias y las enfermedades asociadas

a la contaminación, son ya cotidianos en las principales ciudades del país (Semarnat 2002).

Actualmente la población de la Ciudad de México respira grandes cantidades de contaminantes ambientales, constituidos por una mezcla compleja de partículas orgánicas e inorgánicas de diferentes tamaños, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), aminas heterocíclicas, humo del tabaco, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y ozono.

La capa de ozono estratosférico se encuentra a unos 20 km de la superficie terrestre, se origina en un proceso reversible espontáneo que consiste en la unión de un átomo de oxígeno y una molécula de oxígeno para formar la molécula de ozono liberando energía. En la estratosfera terrestre el ozono tiene una función protectora, ya que sirve como filtro de la radiación ultravioleta (UV) proveniente del sol a tal punto que sólo llega a la superficie de la Tierra una cantidad compatible con la existencia y proliferación de la vida. Mayor radiación sobre la superficie terrestre causaría la destrucción del fitoplancton, base de todas las cadenas alimenticias del océano, pero en el hombre provocaría debilitamiento general del sistema inmunológico, importantes daños en la vista y aumento de casos de cáncer de piel. (Van der Vliet et al. 1995). Sin embargo, en la troposfera el ozono es de los principales contaminantes, producto de una serie de reacciones fotoquímicas que se llevan a cabo entre compuestos gaseosos denominados precursores, los cuales son influenciados por acción de la energía solar en el espectro de la luz ultravioleta, los precursores son básicamente los óxidos de nitrógeno (NO_x) y los hidrocarburos volátiles reactivos (HCR). Ambos son emitidos por actividades antropogénicas, como son el uso de automóviles, industrias, estaciones de servicio de

gasolina, así como todos los trabajos en los que se emplean disolventes orgánicos. Cuando los NO_x y los HCR son emitidos a la atmósfera y expuestos a radiación UV, producen compuestos secundarios que son potentes oxidantes fotoquímicos como el ozono y los peroxiacetil nitratos (Van der Vliet et al. 1995, Sánchez 1999).

1.2 Calidad del aire

Los antecedentes del inventario de emisiones de contaminantes ambientales en México, se remontan a 1988, cuando se implementó el Sistema Nacional del Inventario de Emisiones de Fuentes Fijas, así como el estudio encaminado a cuantificar su liberación al aire de la Zona Metropolitana del Valle de México. La metodología básica para elaborar este inventario fue desarrollada por el Instituto Nacional de Ecología e incluyó manuales técnicos que han permitido unificar los criterios y métodos de estimación de los niveles de contaminantes. A mediados de los años noventa se establecieron los inventarios de las principales zonas metropolitanas del país: Valle de México, Guadalajara, Monterrey, Toluca y algunas ciudades como Mexicali, Ciudad Juárez y Tijuana. Actualmente, las redes de monitoreo instaladas en estas zonas, cuentan con sistemas modernos de medición para registrar ozono, bióxido de azufre, bióxido de nitrógeno, monóxido de carbono, partículas suspendidas totales, partículas menores a 10 micrómetros de diámetro y plomo (Semarnat 2002).

La ley general de salud dispone que corresponde a las autoridades de salubridad establecer normas, tomar medidas y realizar actividades tendientes a proteger a la población ante los riesgos y daños que pudieran ocasionar las condiciones del ambiente,

así como determinar los valores de concentración máxima permisibles para el ser humano de los contaminantes atmosféricos. Con base en lo anterior, la Secretaría de Salud dio a conocer las Normas Oficiales Mexicanas, publicadas el 23 de diciembre de 1994 en el Diario Oficial de la Federación, en las que se establecen los criterios de calidad del aire en materia de salud y son de observancia para las autoridades federales y locales que tengan a su cargo la vigilancia y evaluación de la calidad del aire con fines de protección a la salud de la población, es competencia de la Secretaría responsable del sector ambiental (actualmente Semarnat), la expedición de normas para la certificación de los niveles de emisión de contaminantes a la atmósfera (Semarnat 2002).

Los contaminantes que se liberan en la atmósfera pueden dividirse en tres grandes categorías según su fuente de origen:

- 1) Emisiones que proceden de fuentes móviles (sector del transporte), bióxido de carbono (CO_2), óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO) e hidrocarburos (HC), que pueden ser compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, así como derivados de precursores de HC y NO_x y como consecuencia de la fotooxidación, el ozono (O_3).
- 2) Emisiones provenientes de fuentes fijas (industrias, hogares y agricultura). Las más importantes junto con el CO_2 son el bióxido de azufre (SO_2), los NO_x , los HC , los metales pesados, los clorofluorocarbonos (CFC) y el metano (CH_4).
- 3) Emisiones que surgen de la producción de energía, las más importantes son el CO_2 y el SO_2 (U.S. EPA 1997).

Cuadro 1. Límites estándar de exposición a los contaminantes liberados a la atmósfera en la Ciudad de México.

Contaminante	Límite de exposición aguda	Límite de exposición crónica (valor medio)	
	Concentración y tiempo promedio	Frecuencia máxima aceptable	Para protección de la salud de la población susceptible
O ₃	0.11 ppm (1 hrs)	1 vez cada 3 años	na
SO ₂	0.13 ppm (24 hrs)	1 vez al año	0.030 ppm (maa)
NO ₂	0.21 ppm (1 hrs)	1 vez al año	na
CO	11 ppm (8 hrs)	1 vez al año	na
PST	260 mg/m ³ (24 hrs)	1 vez al año	75 mg/m ³ (maa)
PM10	150 mg/m ³ (24 hrs)	1 vez al año	50 mg/m ³ (mma)

mg/m³: Miligramo por metro cúbico.

ppm: Partes por millón.

na: No aplica.

maa: media aritmética anual.

Fuente: Instituto Nacional de Ecología, Semarnap / Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental / Agencia de Cooperación Internacional del Japón, **Segundo Informe Sobre la Calidad del Aire en Ciudades Mexicanas 1997**, INE, Cenica, JICA, México, 1998.

La Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos (EPA), ha clasificado al ozono como un contaminante crítico. La EPA establece Estándares de Calidad del Aire de 0.11 ppm promedios por hora (que no sea excedido más de tres veces en un período de tres años) y 0.08 ppm por ocho horas, aunque los niveles de ozono en el ambiente frecuentemente exceden los estándares de la calidad del aire en muchas áreas urbanas (U.S. EPA 1997).

Cuadro 2. Número de días con valores iguales o mayores a los 100, 150, 200, 250 y 300 puntos IMECA en algunas de las ciudades principales de México, 1988-2001.

Ciudades	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Mayor o igual a 100 puntos IMECA														
ZMVM	330	332	341	351	335	324	346	325	333	337	337	304	332	305
ZMG	-	-	-	-	-	44	270	166	256	213	211	155	143	121
ZMM	-	-	-	-	-	83	106	33	65	43	36	100	35	99
ZMVT	-	-	-	-	-	-	5	7	60	30	68	77	47	30
Cd. Juárez	-	-	-	-	-	-	-	-	25	31	37	27	24	19
Tijuana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	7	9	nd	nd
Mexicali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	111	123	nd	nd
Mayor o igual a 150 puntos IMECA														
ZMVM	232	136	235	284	264	240	263	263	238	225	219	194	194	146
ZMG	-	-	-	-	-	22	135	65	94	57	40	10	16	10
ZMM	-	-	-	-	-	9	37	5	6	1	0	0	0	4
ZMVT	-	-	-	-	-	-	0	0	5	1	1	2	2	2
Cd. Juárez	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	6	0	3	5
Tijuana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	nd	nd
Mexicali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	42	51	nd	nd
Mayor o igual a 200 puntos IMECA														
ZMVM	69	15	94	162	125	85	101	94	71	55	61	33	24	15
ZMG	-	-	-	-	-	5	9	14	23	12	7	0	2	0
ZMM	-	-	-	-	-	0	1	0	1	0	0	0	0	0
ZMVT	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0
Cd. Juárez	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	0	1	1
Tijuana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	nd	nd
Mexicali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	12	13	nd	nd
Mayor o igual a 250 puntos IMECA														
ZMVM	11	3	28	56	39	14	4	7	5	3	3	2	1	0
ZMG	-	-	-	-	-	0	0	6	3	2	2	0	2	0
ZMM	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZMVT	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Cd. Juárez	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	1	0
Tijuana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	nd	nd
Mexicali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	5	6	nd	nd
Mayor o igual a 300 puntos IMECA														
ZMVM	1	0	4	7	12	1	0	0	0	0	0	0	1	0
ZMG	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZMM	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZMVT	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Cd. Juárez	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
Tijuana	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	nd	nd
Mexicali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	3	4	nd	nd

nd: No disponible.

IMECA: Índice Metropolitano de la Calidad del Aire.

ZMVM: Zona Metropolitana del Valle de México; ZMG: Zona Metropolitana de Guadalajara; ZMM: Zona Metropolitana de Monterrey; ZMVT: Zona Metropolitana del Valle de Toluca.

Nota: Para la ZMG las mediciones comenzaron en el mes de noviembre de 1993 y de junio a octubre de 1995 no se tienen registros.

Fuente: Semarnat, Instituto Nacional de Ecología, Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana, Regional y Global, 2002, México.

Según datos generados por la estación de monitoreo ubicada en el Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, el contaminante ozono se incrementa con respecto a la Norma Mexicana de la Calidad del Aire (0.11 ppm O₃ una vez cada tres años, Cuadro 1). Las concentraciones máximas registradas rebasan dicha norma con cierta frecuencia durante el año alcanzando valores de hasta tres veces (0.33 ppm de O₃). Desde un punto de vista del análisis de riesgo, el hecho de que en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México con frecuencia se sobrepasa la norma para el ozono, (Cuadro 2), permite reconocer que el 100% de la población de la ciudad está expuesta por periodos de una hora o más a concentraciones de ozono superiores a 0.11 ppm (Sánchez 1999).

1.3 Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA)

El Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), pondera y transforma las condiciones de un conjunto de contaminantes a un número adimensional, el cual indica el grado de contaminación presente en una localidad determinada y puede ser fácilmente entendido por la población en general. El factor de medición que se utilizó para la creación del IMECA considera las normas de la calidad del aire y los niveles de daño significativo para determinar los efectos de la contaminación (Cuadro 3), utilizando las funciones lineales segmentadas, basadas en el Pollutant Standard Index (PSI) de los Estados Unidos, por lo tanto corresponden a los estándares primarios y a los niveles de daño significativo de ese país. Los contaminantes seleccionados son el CO, O₃, NO₂, PST, PM₁₀ y SO₂ (U.S. EPA 1997).

Cuadro 3. Puntos IMECA estándar de los contaminantes liberados a la atmósfera en la Ciudad de México.

IMECA	PST (mg/m ³ ; 24h)	PM10 (mg/m ³ ; 24h)	SO ₂ (ppm; 24h)	NO ₂ (ppm; 1h)	CO (ppm; 8h)	O ₃ (ppm; 1h)
100	260	150	0.13	0.21	11	0.11
200	546	350	0.35	0.66	22	0.23
300	627	420	0.56	1.10	31	0.35
400	864	510	0.78	1.60	41	0.48
500	1000	600	1.00	2.00	50	0.60

mg/m³: Miligramo por metro cúbico.
ppm: Partes por millón.

Fuente: Instituto Nacional de Ecología, Semarnap / Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental / Agencia de Cooperación Internacional del Japón, **Segundo Informe Sobre la Calidad del Aire en Ciudades Mexicanas 1997**, INE, Cenica, JICA, México, 1998.

La calidad del aire es buena cuando el valor del IMECA está debajo de 50 puntos, de 51 a 100 es satisfactoria, de 101 a 200 es no satisfactoria, de 201 a 300 es mala y de 301 en adelante se considera muy mala (U.S. EPA 1997).

1.4 Efectos del ozono en salud pública

El ozono ejerce efectos adversos en la salud, especialmente en las personas que viven en ciudades industrializadas como es el caso de la Ciudad de México, donde sus niveles en la atmósfera dependen de una combinación de factores físicos y químicos, como la acción de la radiación solar, el clima, las emisiones industriales y del tráfico vehicular. El ozono como potente oxidante es extremadamente irritante para el sistema respiratorio, ya que es capaz de reaccionar con una variedad de radicales libres como peroxiacetil nitrato, acroleína y derivados aldehídos, produciendo cambios perjudiciales que pueden ser evaluados por medio de las alteraciones en la función pulmonar (Gilliland et al. 2001).

El ozono es un gas que puede penetrar eficazmente a través del árbol traqueobronquial hasta las regiones pulmonares del sistema respiratorio, causando un flujo de células inflamatorias e induciendo lesiones en células residentes del pulmón. Este gas a bajas concentraciones (0.001-0.12 ppm), frecuentemente encontradas en las áreas urbanas, puede provocar efectos deletéreos en la salud humana, pero principalmente en la población infantil y senil. Exposiciones incluso menores de 0.08 ppm son suficientes para inducir alteraciones en la actividad de varias enzimas e iniciar una reacción inflamatoria en el pulmón induciendo incrementos significativos en el número de neutrófilos, en la concentración de prostaglandina E₂, de interleucina-6 (IL-6) y en la actividad de lactosa deshidrogenasa, esta enzima junto con los mediadores están usualmente asociados con edema celular y en altas concentraciones de ozono con muerte celular (Calderón-Garcidueñas et al. 1996, Gilliland et al. 2001).

Los efectos del ozono en salud humana han sido estudiados por más de 30 años siendo el sistema respiratorio el principal blanco, el grado de afección depende de varios factores como la concentración del contaminante, la duración de exposición, la calidad del aire que se inhala, las actividades realizadas, la mezcla con otros contaminantes, la altura de la Ciudad de México, las características del clima, la sensibilidad individual, la dieta, las enfermedades respiratorias pre-existentes y el estatus socioeconómico (Semarnat 2002). Estudios epidemiológicos en poblaciones humanas expuestas por varios días a concentraciones entre 0.3 - 0.5 ppm de O₃, así como estudios de laboratorio, lo han asociado con la manifestación de una variedad de alteraciones respiratorias tales como irritación, tos, espasmo, descenso de la capacidad vital, edema, inflamación neutrofilica de la submucosa de las vías aéreas, daño epitelial, modificaciones en la sustancia surfactante, desarrollo de cáncer pulmonar, enfermedades cardiovasculares y nerviosas, síndrome de muerte infantil, bajo rendimiento escolar en los niños y disminución en el peso corporal de los recién nacidos, entre otros (Wiester et al. 1996, U.S. EPA 2004).

Las concentraciones de ozono y la temperatura ambiental son difíciles de experimentar con los seres humanos pero en condiciones de laboratorio generalmente se emplean desde 0.05 a 2.0 ppm a temperaturas entre 18-26 °C (NTP, TR-440 1999).

Evidencias experimentales *in vivo* e *in vitro* llevadas a cabo por más de tres décadas, han apoyado el hecho de que el ozono es mutagénico, citotóxico y genotóxico en diferentes líneas celulares (Dubeau y Chung 1982, Heral y Chung 1984, Wilson et al. 1984, Gabrielson et al. 1994). Se ha demostrado también que las mezclas orgánicas presentes en el aire del Distrito Federal inducen mutaciones en *Salmonella typhimurium* mediante el ensayo de Ames (Villalobos-Pietrini et al. 1995), así como intercambio de

cromátidas hermanas (ICH) y alteraciones en la cinética de proliferación en los linfocitos humanos en cultivo (Calderón-Segura et al. 2004). También se han observado aductos o daño al ADN en macrófagos alveolares tanto en animales como en células humanas, que se asocia con el incremento en la incidencia de cáncer pulmonar así como en la tasa de mortalidad (Hamelin 1985, Victorin 1992, Bhalla 1999, Jorge et al. 2002, Yu et al. 2002).

Los lavados broncoalveolares son excelentes para evaluar la respuesta inflamatoria del pulmón, ya que permiten el análisis bioquímico y fisiológico para seguir la alteración pulmonar e inflamación y daño en el ADN por exposición a ozono. La exposición aguda al ozono produce una respuesta inflamatoria en el epitelio de la cavidad nasal, el traqueoalveolar y hasta el bronquial. El incremento de monocitos se relaciona con el proceso inflamatorio y por lo tanto con daño pulmonar por la producción de citosinas proinflamatorias, especies de oxígenos reactivos (ROS) y enzimas proteolíticas (Steinberg et al. 1990, Kirichenko et al. 1996, Li et al. 1996, Bornholdt et al. 2002, Yu et al. 2002).

1.5 Acción biológica del ozono

El ozono al momento de ser inhalado, primeramente se pone en contacto con los fluidos secretados en el sistema respiratorio que cubre a las células epiteliales de la mucosa, estos fluidos contienen una variedad de componentes entre los que se encuentran proteínas (mucinas, albúminas y diversas enzimas) así como diversos antioxidantes (ascorbato, urato y glutatión); principalmente el ascorbato y el urato son los responsables de atrapar el ozono en las vías aéreas superiores (Van der Vliet et al. 1995).

Por su estructura química, el ozono es un gas muy permeable en las membranas pulmonares y altamente reactivo con las macromoléculas de los fluidos. Las células epiteliales sintetizan una compleja mezcla de sustancias constituida de lípidos solubles (80-90 %) y de proteínas (10-20 %), que constituye una barrera con la cual el ozono puede interactuar antes de ejercer sus efectos tóxicos en el pulmón y posiblemente sea el primer sitio en este órgano para formar intermediarios metabólicos de proteínas y lípidos endógenos de doble enlace (Uhlson et al. 2002, Hoogervorst et al. 2003).

Si las concentraciones de ozono son elevadas, comienza un proceso de inflamación en las vías aéreas y en los pulmones que se caracteriza por la generación de leucotrienos, histamina, bradiquinina, una variedad de citosinas y quimocinas, así como proliferación y migración celular. Entre las citosinas antiinflamatorias está la interleucina-6 (IL – 6), citosina multifuncional considerada como la principal molécula en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio. Dicha citosina puede ocasionar fiebre, activar a los linfocitos T y B y estimular la transcripción de genes en hepatocitos. Estudios actuales indican que la IL – 6 tiene las siguientes propiedades antiinflamatorias y protectoras: bloquea la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), de la interleucina-1 (IL – 1) y la proteína 2 de macrófagos inflamatorios (MIP-2); disminuye el secuestro de neutrófilos; incrementa los niveles del receptor antagónico de la IL – 1 y del receptor del TNF- α ; estimula la síntesis de los inhibidores de las metaloproteinasas; inactiva la producción del superóxido intracelular e inhibe la apoptosis o muerte celular programada (MCP). La IL – 6 puede ser secretada por los macrófagos alveolares, los linfocitos y las células epiteliales del sistema respiratorio (Li et al. 1996, Jorge et al. 2002, Yu et al. 2002).

En los pulmones, los macrófagos alveolares son el principal sistema de defensa, ya que no sólo desarrollan actividades de fagocitosis y protección, sino que también producen diferentes sustancias bioactivas en las que se incluye a las citosinas. El TNF- α está entre las moléculas de respuesta temprana que aparece en los sitios de inflamación. La generación del TNF- α por los macrófagos alveolares puede iniciar la respuesta inflamatoria al promover la síntesis de las citosinas quimiotácticas contribuyendo a la circulación de subpoblaciones de leucocitos específicos en los sitios de daño (Yamauchi et al. 2002).

En los humanos, la exposición aguda de ozono *in vivo* afecta la cantidad y la morfología de los macrófagos alveolares (Victorin 1992, Ferng et al. 1997, Ferng 2002) y disminuye su capacidad de defensa (fagocitosis) contra partículas y patógenos (Polzer et al. 1994). Además de los efectos agudos, la exposición crónica puede contribuir a cambios significativos en el funcionamiento del pulmón y estructuras anexas, así como en la formación de fibrosis intersticial (Victorin 1992, Last et al. 1993). También se ha observado una relación dosis-respuesta en la expresión de la IL - 6 y se ha demostrado respuesta inflamatoria así como daño al ADN por el rompimientos de la cadena. En este sentido, diversos estudios han descrito la reactividad del ozono con el ADN pero poco se conoce sobre los tipos de mutaciones producidas por este oxidante, así como el mecanismo implicado en la carcinogénesis (Adamson et al. 1999, Bornholdt et al. 2002, Yamauchi et al. 2002, Yu et al. 2002).

El potencial genotóxico del ozono se debe a su baja solubilidad acuosa, por su lenta reacción con el agua genera radicales hidroxilo, pero puede actuar mucho más rápido directamente vía los radicales libres del proceso de peroxidación de ácidos grasos

poliinsaturados, oxidación de proteínas, aminas, tioles, y ácidos nucleicos. Rápidamente interactúa con lípidos de los fluidos así como con los de membrana de las células respiratorias, generando metabolitos que resultan de la activación del ácido araquidónico, los cuales son posiblemente responsables del reclutamiento y activación de granulocitos en las vías aéreas. Al unirse con los lípidos se forman ozonidos, los cuales a su vez constituyen aldehídos y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), elevando la concentración de radicales libres. Los aldehídos y el H_2O_2 son capaces de modificar residuos de proteínas, siendo particularmente reactivos con cisteína y lisina, pero también puede alterar su estructura y/o función (Van der Vliet et al. 1995, Díaz-Llera et al. 2002).

Pryor y Church (1991) y Pryor et al. (1995) muestran *in vitro* que los ácidos grasos poliinsaturados de los fluidos pulmonares producen diversos aldehídos al ser ozonizados y proponen que el daño en las vías respiratorias podría ser por peroxidación. De los intermediarios aislados, tres han sido estudiados más extensamente: el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), el 4-hidroxi-2-hexenal y el malonaldehído, siendo el HNE el principal metabolito y el más tóxico. Este compuesto se origina a partir de los ácidos araquidónico y linoléico y podría ser indicador de peroxidación de los lípidos (Esterbauer et al. 1991). El HNE ha mostrado ser citotóxico en numerosas líneas celulares a concentraciones menores de $0.1 \mu M$, estimula la quimiotaxis de neutrófilos y la activación de fosfolipasas moduladas por las adenilato y guanilato ciclasas. De 1 a $100 \mu M$ de HNE causa efectos citotóxicos, genotóxicos, carcinogénicos y apoptosis o muerte celular programada (Bermúdez et al. 1991, Michielis y Remache 1991, VanWinkle et al. 1994, Kleeberger et al. 1999).

Lee et al. (1996), evidencian *in vitro* que con 25 y 100 μM el HNE estimula necrosis y apoptosis en los macrófagos alveolares del ratón, además proponen que el HNE ejerce sus efectos con las moléculas biológicas por unión con los grupos tiol (cisteína) para constituir aductos tioéteres que bajo ciclización forman hemiacetales (Ueta et al. 1993, Szweda et al. 1993, Haney et al. 1999, Uhlson et al. 2002).

El ozono interactúa con más del 80% de los fosfolípidos saturados como la glicerofosfocolina, el adipalmitoil glicerofosfocolina y el 1-miristoil-2-palmitoil glicerofosfocolina, así como con un 14% de los fosfolípidos insaturados entre los que se encuentran el 1-palmitoil-oleoil glicerofosfocolina. También tiene afinidad por aminoácidos de proteínas, principalmente histidina, triptofano, metionina, tirosina, cisteína para inducir aductos (Uhlson et al. 2002, Hoogervorst et al. 2003).

El ozono al reaccionar con lípidos de doble cadena genera un intermediario ozonido muy inestable que se rompe para formar aldehídos, radicales hidroxilo (OH) e hidroxiperóxidos que finalmente fragmentan su doble enlace C=C para originar radicales libres con grupos hidroxilo. Estos radicales OH \cdot pueden reaccionar con el ADN provocando rompimientos y daño en la cadena lo cual se asocia con la inhibición de la replicación del ADN en células epiteliales de los bronquios humanos en cultivo (Mustafa y Tierney 1978, Mustafa 1990, Mudway y Kelly 1998, Kafoury et al. 1999, Kotiaho et al. 2000, Squadrito et al. 2000, Díaz-Llera et al. 2002).

Las mutaciones inducidas por el ozono en el ADN son preferentemente por sustitución de bases en el par G-C (guanina-citosina) por A-T (adenina-timina), produciendo residuos 8-OH-Guanina (8-OH-Gua) y a menos que sea reparado durante la transcripción, se ha observado una relación directa entre 8-OH-Gua y la carcinogénesis *in*

vivo. El nivel de 8-OH-Gua en la orina, es un biomarcador de daño al ADN y de estrés oxidante (Bornholdt et al. 2002, Jorge et al. 2002, Gackowski et al. 2003). De tal forma que los fosfolípidos oxidados, los radicales libres, los intermediarios de lípidos y los intermediarios de proteínas, pueden inhibir y/o activar proteínas citosólicas asociadas con el crecimiento o proliferación celular, unirse con el ADN generando rompimientos en su cadena, provocar mutaciones y apoptosis (Pryor y Church 1991, Pryor et al.1995, Klestadt et al. 2002, Hoogervorst et al. 2003).

1.6 Equilibrio oxidante-antioxidante

En condiciones normales, durante el metabolismo aeróbico la transferencia de electrones en células pulmonares genera niveles bajos de metabolitos del oxígeno potencialmente tóxicos. Las especies de oxígeno reactivos (ROS) incluyendo radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno que juegan un papel integral en la modulación de algunas funciones fisiológicas, sin embargo si se producen en cantidades excesivas pueden ser dañinos. El estrés oxidante natural resulta cuando desciende la capacidad antioxidante de la célula o por incremento en los niveles de especies de oxígeno y nitrógeno reactivos (ROS y RNS). Aunque los radicales libres son esenciales en los procesos metabólicos, una sobreproducción de ROS y RNS puede guiar al desbalance entre oxidantes y antioxidantes, cuando el nivel es mayor las moléculas oxidadas pueden ocasionar estrés oxidante produciendo alteraciones de proteínas, lípidos de membrana, ARN y ADN (Doelman y Band 1990, Vallyatan y Shi 1997, Suzy et al. 2002, Fattman et al. 2003). Si el daño no es reparado posiblemente cause cambios en los

pares de bases provocando mutaciones, rompimientos de una o dos cadenas de ADN, enlaces cruzados, aberraciones y rearrreglos cromosómicos (Ames et al. 1993, Eastwood 1999, Liu et al. 2002, Roberts y Gordon 2003).

El balance entre las funciones fisiológicas y el daño oxidante está determinado por la formación-eliminación de ROS y RNS, normalmente estos son removidos rápidamente antes de causar alteración y muerte celular, para disminuir el estrés oxidante para las moléculas biológicas, el pulmón cuenta con un efectivo sistema antioxidante. Este sistema incluye a las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, entre otras (Suzy et al. 2002, Fattman et al. 2003).

1.7 Antioxidantes enzimáticos

La superóxido dismutasa (SOD), es una enzima con una función esencial en la protección de las células pulmonares contra el estrés oxidante, ya que remueve los ROS, catalizando la transformación de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno. Hay tres formas de SOD: la SOD cobre-zinc es un homodímero de 32 kDa, localizada en citosol y núcleo, actúa como un atrapador de superóxido; la SOD de manganeso es un homotetrámero de 96 kDa presente en matriz mitocondrial y la SOD extracelular (EC-SOD) se encuentra en fluidos extracelulares como el líquido sinovial y el plasma, es una glicoproteína hidrofóbica con aparente peso molecular de 135,000 kDa en forma de tetrámero o dímero, tiene un átomo de cobre y uno de zinc por subunidad requeridos por su actividad enzimática. La EC-SOD es el antioxidante extracelular primario en tejido pulmonar, el mRNA para esta enzima se expresa en varios tipos

celulares de pulmón como epitelio bronquial, endotelio vascular, células alveolares tipo 2 y macrófagos alveolares (Suzy et al. 2002, Fattman et al. 2003).

La catalasa, es una hemoproteína tetramérica que se oxida y se reduce en su sitio activo en presencia de H_2O_2 , tiene actividad reductora para moléculas pequeñas tales como H_2O_2 y metil o etil hidroperóxido, pero no metaboliza moléculas grandes como los productos hidroperóxido lipídicos de la peroxidación lipídica. La catalasa es mas efectiva cuando hay concentraciones altas de H_2O_2 , pero a concentraciones bajas, el sistema glutatión tiene un papel crítico (Fattman et al. 2003).

Las enzimas del sistema glutatión, son un mecanismo central que complementa a la catalasa en la reducción de H_2O_2 , pero la supera por su capacidad para eliminar variedades adicionales de peróxidos tóxicos como son los lipídicos formados por el ataque de radicales libres a lípidos poliinsaturados de membrana. La enzima clave en el ciclo redox responsable de la reducción de H_2O_2 es la glutatión peroxidasa (GPx), donde se requiere específicamente de glutatión reducido (GSH) que actúa como donador de electrones, el glutatión disulfuro (GSSG) producido en el transcurso de la reacción y que subsecuentemente es reducido a GSH nuevamente por la glutatión reductasa, la cual usa el NADPH generado del sistema hexosa monofosfato como donador de electrones. Las células no estresadas, contienen concentraciones elevadas del complejo GSH:GSSG para aumentar el GSH disponible y así promover la disminución activa de H_2O_2 a través del sistema glutatión. El GSH libre funciona como un antioxidante soluble en agua que interactúa directamente con los radicales intermediarios en las reacciones catalizadas no enzimáticamente (Doelman y Band 1990, Fattman et al. 2003).

1.8 Antioxidantes no enzimáticos

Las células pulmonares también usan compuestos antioxidantes no enzimáticos para actuar directamente como atrapadores de agentes oxidantes, entre ellos se encuentran la vitamina E (α -tocoferol) que es un antioxidante unido a membrana capaz de terminar la cadena de reacción de la peroxidación lipídica atrapando radicales peroxilipídicos. La vitamina E también llega a ser un radical pero mucho menos reactivo, sin embargo en concentraciones altas puede funcionar como prooxidante. El ácido ascórbico o vitamina C puede ser atrapador de radicales superóxido e hidroxilo, formando el radical libre semidehidroascorbato subsecuentemente reducido por el glutatión, pero en niveles elevados tiene propiedades prooxidantes. Otros antioxidantes no enzimáticos incluyen al β -caroteno (vitamina A) (atrapador de radicales superóxido y peroxilo), ácido úrico (radicales hidroxilo, superóxido y peroxilo), glucosa (radical hidroxilo), bilirrubina (radicales peroxilipídicos), taurina (ácido hipocloroso) y cisteína (donador de grupos sulfidriilo) (Fattman et al. 2003).

1.9 Sistemas vegetales antioxidantes

En México como en otros países se ha incrementado cada vez más el empleo de la herbolaria para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades incluyendo el cáncer (Southon 2001, Sun et al. 2002).

Hay estudios que han reportado una correlación positiva entre el consumo de frutas y verduras con el decremento en la tasa de mutación del ADN, la vejez celular, el desarrollo de enfermedades cardiocerebrales, cataratas, artritis, cáncer y frecuencia de

mortalidad humana (Sinatra y De Marco 1995, Rao 2002). Se ha publicado también que una mezcla de fitoquímicos de frutas y verduras suministra un mejor sistema bioprotector. Actualmente, se han aislado más de 5000 fitoquímicos vegetales, pero su estructura química, sus funciones antioxidantes y biológicas aún no han sido bien caracterizadas (Armstrong et al. 1975, Acheson y Williams 1983, Verlangieri et al. 1985, Mangels et al. 1993, Hennekens et al. 1996, Rapola et al. 1997, Parker et al. 2000, Vinson et al. 2001, Dewanto et al. 2002 a, b, Halvorsen et al. 2002).

En algunos vegetales como el jitomate se han identificado varias enzimas antioxidantes como las catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas, los complejos de ascorbato-glutación (peroxidasa-ascorbato, monodihidroascorbato reductasa y dihidroascorbato reductasa) y la glutación reductasa, que constituyen el principal mecanismo de captura de ROS y RNS que requieren de los cofactores NADPH o NADH para las reacciones de óxido-reducción (Asada 1994, Parker et al. 2000, Vinson et al. 2001, Dewanto et al. 2002 a,b, Halvorsen et al. 2002).

Diferentes especies vegetales comestibles tales como brócoli, lechuga, espinaca, cilantro, perejil, jitomate y zanahoria, entre otras, contienen en sus fracciones celulares de diversos órganos (raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas), múltiples fitoquímicos con actividades antioxidantes y antiproliferativas como son los flavonoides (flavenos, flavanos y antocianinas); terpenos (β -carotenos, licopenos y zeaxantinas), vitaminas A, C y E; así como clorofilas y clorofilinas (la vitamina A es un caroteno) (Miller et al. 2000, Gill et al. 2002, Lapidot et al. 2002, Liu y Zheng 2002, Liu et al. 2002, Dutta y Dutta 2003).

Los flavonoides son compuestos fenólicos cuya fuente puede estar en los frutos (manzana, fresa y durazno) y en las verduras (espinaca y lechuga). Durante mucho tiempo pasaron inadvertidas las propiedades benéficas de estos compuestos y eran considerados como sustancias sin valor nutritivo para el hombre. Sin embargo por los años treinta se demostró que los flavonoides derivados de las frutas cítricas protegían los capilares sanguíneos (Rusznay y Szent-György 1936, tomado de Acheson y Williams 1983). El creciente interés en los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica, ya que el consumo de frutas y verduras ricas en flavonoides se asocia con su efecto protector contra enfermedades cardíacas y cáncer. Actualmente se sabe que los flavonoides junto con las vitaminas A, C y E, los β -carotenos y las clorofilas contenidos en diversos frutos y vegetales comestibles, son el mejor sistema para reducir los radicales libres provenientes del estrés oxidante actuando como antioxidantes naturales (Cao et al. 1996, Blokhina et al. 2003, Apak et al. 2004, Misso y Thompson 2005, Teixeira et al. 2005, Solomidou y Muzycantov 2006).

El organismo por sí mismo, no puede sintetizar compuestos fitoquímicos como los flavonoides por lo que deben obtenerse mediante la dieta o en forma de suplementos, sin embargo, las dosis farmacológicas no siempre producen los efectos esperados y en exceso resultan dañinos, por lo que actualmente se prefiere incluir en la dieta una mezcla de frutas y verduras ricas en diversos antioxidantes como licopenos, terpenos y flavonoides (Chu et al. 2002, Lapidot et al. 2002).

Estudios *in vitro* e *in vivo* con el ensayo de Ames describen que las clorofilas de distintos vegetales comestibles (apio, espinaca, brócoli, acelgas, cilantro) protegen a *Salmonella typhimurium* contra las mutaciones inducidas por algunos hidrocarburos

aromáticos policíclicos, nitrosaminas y óxidos de nitrógeno (Cao et al. 1996, Dashwood et al. 1998, Chu et al. 2002, Cortés-Eslava et al. 2002, Grey y Adlercretz 2003). Las clorofilas pueden actuar como molécula interceptora capaz de unirse directamente con la parte activa de los metabolitos electrofílicos de carcinógenos químicos, disminuyendo su genotoxicidad y actividades oncogénicas (Surh et al. 1995).

1.10 Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es un potente antioxidante soluble en agua, que se produce en forma natural en la mayoría de los tejidos vegetales, interviene en la homeostasis celular, así como en la captura y disminución de ROS y de RNS durante el estrés oxidante (Carr y Frai 1999, Song et al. 2001, Medina et al. 2002) incluyendo los radicales libres hidroxilo, peroxilo, el anión superóxido, óxido de nitrógeno y otros grupos químicos funcionales como ácido hipoclorico, ozono, oxígeno y las especies de nitrosación (N_2O_3/N_2O_4); participa también en la regeneración del α -tocoferol (vitamina E, una molécula de la fase lipídica y con gran actividad antioxidante) que es utilizado como cofactor para las enzimas prolil y lisil hidrolasas las cuales catalizan la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en la biosíntesis del colágeno que también podría estar involucrado en el crecimiento y división celular. La actividad antiapoptótica de la vitamina C se ha asociado con el bloqueo de la liberación del citocromo c en la mitocondria y supresión de la cascada de caspasas de la apoptosis (Asada 1994, Noctor y Foyer 1998, Noroozi et al. 1998, Njus et al. 2001, Rössig et al. 2001, Leonard et al. 2002, Medina et al. 2002).

La vitamina C es un radio y metalo protector que en conjunto con algunos flavonoides disminuyen la frecuencia de rompimientos del ADN en linfocitos humanos (Cai et al. 2001, Gerhäuser et al. 2003, May et al. 2003). Witenberg et al. (1999) y Guaiquil et al. (2001) evidencian efecto antiapoptótico de la vitamina C en células HL-60 en cultivo expuestas a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Lutsenko et al. (2002), demuestran disminución de aductos en hepatocitos humanos de la línea 293T expuestos a H₂O₂. La vitamina C evita la fibrosis hepática en ratas expuesta al Bisfenol A (un plástico policarbonado) (Bindhumol et al. 2003) y a dimetilnitrosamina (George 2003); de igual manera contrarresta el síndrome del alcohol fetal en ratas gestantes y tratadas con etanol (Cohen-Kerem y Koren 2003).

1.11 Cilantro

El cilantro (*Coriandrum sativum*; Umbelliferae), es una planta de las regiones mediterráneas, ampliamente cultivada y usada como una especia en muchas partes del mundo. Su etimología comienza con la palabra griega koriannon, una combinación de koris (bicho oloroso) y annon (fragancia de anis). En latín se escribe coriandrum y en antiguo francés así como en inglés, desde el siglo XIV se conoce como coriander. En el siglo X se consideró como un complemento en la alimentación pero desapareció en el siguiente siglo quizá por su desagradable aroma. Fue reintroducido nuevamente por los portugueses en el siglo XVIII como koendoro, término japonés que proviene de la palabra portuguesa coentro. Sus aplicaciones culinaria y medicinal se han documentado por más de 3000 años, incluso el fruto se encuentra listado en la farmacopea británica,

germana y europea, por considerarse como una droga contra la indigestión, como bactericida, contra helmintiasis y reumatismo (Uchibayashi 2001, Ishikawa et al. 2003).

La actividad bactericida del cilantro se ha probado contra *Salmonella choleraesuis*, debido a la presencia de alcanos y alquenos alifáticos como dodecenal y undecenal, característicos de sus hojas (Kubo et al. 2004). Los aceites esenciales de las semillas y de las hojas, son particularmente efectivos contra *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria monocytogenes*, por su contenido de alcoholes y aldehídos de cadena larga (C6-C10) (Delaquis et al. 2002, Gill et al. 2002). Su eficacia en las enfermedades digestivas se debe a su actividad antiinflamatoria en el intestino (Jagtap et al. 2004).

Se ha mostrado que el cilantro reduce los niveles de colesterol y triglicéridos, previniendo e inhibiendo la hiperlipidemia en ratas (Chithra y Leelamma 1997, Lal et al. 2004). El efecto antiperoxidante de la semilla se ha estudiado en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, donde se observa disminución significativa en los niveles de peróxidos lipídicos y ácidos grasos libres e incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes como glutatión (Chithra y Leelamma 1999).

El extracto acuoso del cilantro tiene gran acción antioxidante debido a su capacidad atrapadora de radicales hidroxilo y superóxido, además de inhibir la peroxidación lipídica. Satyanarayana et al. (2003), consideran que su fuerte función antioxidante es incluso superior a la del ácido ascórbico. Los tocoferoles, fosfolípidos, fitoesteroles y fenoles por su gran eficacia para atrapar radicales libres son los antioxidantes más importantes del aceite crudo de semillas de cilantro (Ramadan et al. 2003), mientras que los componentes volátiles del aceite esencial de semillas de cilantro contienen principalmente monoterpenos (Misharina 2001). Los flavonoides del fruto y de

las hojas del cilantro incluyen quercetina 3-glucuronido, isoquercetina y rutina (Kunzemann y Herrmann 1977) y la composición de ácidos grasos junto con el contenido de los componentes biológicamente activos del aceite de semilla de cilantro, son en su mayoría ácido oleico y petroselínico (Mironova et al. 1991).

Algunas moléculas del cilantro presentes en hojas, semillas, fruto y raíz son los aceites esenciales (3S-linalol), monoterpenos (citronelol, geraniol, mirceno, α - y γ -terpineno, limoneno, α - y β -felandreno, p-cimeno, α - y β -pineno, borneol y camfor) y ácidos grasos (oleico, linolenico petroselínico y palmítico). Ishikawa et al. (2003), separaron e identificaron del extracto metanólico por HPLC, 33 compuestos entre los que se encuentran los siguientes: 2 tiol monoterpenos, 7 monoterpeno glucosidos, 3 glucosidos no carotenoides, 1 compuesto aromático, 7 compuestos aromáticos glucosidos, 2 alquil glucosidos, 8 glúcidos, 1 uracilo y 2 nucleósidos.

1.12 Perejil

El perejil (*Petroselinum sativum*; Umbelliferae), es una popular hierba culinaria, sus hojas son usadas para aderezar y sazonar, mientras que el aceite de su semilla es un importante condimento para carnes y embutidos. El perejil es rico en metabolitos secundarios, desde 1715 se aisló de sus semillas el fenilpropanoide, su uso culinario data del tiempo de los romanos, está documentado en “De Re Coquinaria” de Columella, pero en el siglo XIII aparentemente ya tenía conocimiento de la actividad farmacológica del perejil, por lo que se consideró como medicamento, más que como alimento. Los aceites de las hojas y de las semillas ha mostrado tener actividades preventivas contra

enfermedades tales como la halitosis en Estados Unidos y Europa (Appendino et al. 1998).

El perejil se ha empleado en la alimentación, farmacia, perfumería e industria cosmética, principalmente por su contenido de aceites esenciales. Es ampliamente conocido por sus efectos benéficos en la digestión, en problemas estomacales, renales, hepáticos y sanguíneos; el aceite esencial obtenido del fruto tiene una fuerte acción en el sistema nervioso central. Sus constituyentes característicos son: flavonoides como apina, luteolina y glucosidos de apigenina; aceites esenciales como apiol y miristicina; cumarinas como bergapten e imperatorina y vitamina C. Los terpenos del perejil que se han reportado incluyen al mirceno, miristicina, β -felandreno, α -pineno y p-1,3,8-mentatrieno (Kreydiyyeh y Usta, 2002).

El aroma característico del perejil se debe principalmente a p-1,3,8-mentatrieno, p-dimetilestireno y β -felandreno, miristicina, mirceno, linalol y 2-metilbutanoato y también se producen aldehídos como nonanal y decanal (Fejes et al. 1998, López et al. 1999, Fejes et al. 2000).

El perejil es usado por personas diabéticas en Turquía y en ratas diabéticas para reducir glucosa en la sangre, así como de alanina transaminasa y fosfatasa alcalina, en sangre y tejido hepático (Bolkent et al. 2004).

El extracto de perejil protege la mucosa gástrica en ratas, mostrando actividad antiulcerígena, por los taninos, flavonoides, esteroides y triterpenos de las hojas (Al-Howiriny et al. 2003), también tiene propiedades laxantes y diuréticas (Kreydiyyeh et al. 2001, Yarnell 2002).

Datos epidemiológicos sugieren que el consumo de alimentos vegetales crudos y frescos como perejil, apio, pepino, rábano, zanahoria, brócoli, col, lechuga, tomate, frutas cítricas y algunas legumbres, tienen potencial preventivo contra ciertas enfermedades debido a la presencia de sustancias potencialmente anticarcinogénicas tales como carotenos, vitamina C, vitamina E, selenio, fibra, indoles, fenoles, inhibidores de proteasas, esteroles vegetales y limoneno, mientras que con una dieta baja en éstos es probable el riesgo de desarrollar cáncer, (Potter y Steinmetz 1996).

La actividad antioxidante del extracto de perejil se debe a su efecto atrapador de radicales libres, ya que reduce fuertemente H_2O_2 y OH^\cdot por contener concentraciones elevadas de flavonoides y de aceites esenciales. También se ha observado que el extracto de perejil tiene actividad antilipoperoxidante (Fejes et al. 1998, 2000).

En cultivos celulares de perejil se han identificado flavonoides agliconas como las flavonas apigenina, luteolina y crisoeriol así como los flavonoles kaempferol, quercetina e isoramnetina. La administración de extracto de perejil a ratas aumenta la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo (Hempel et al. 1999).

En humanos con dieta suplementada de perejil aumenta el flavonoide flavona apigenina en orina así como las enzimas glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) en sangre (Nielsen et al. 1999).

1.13 Pruebas de genotoxicidad

Existen diferentes sistemas de prueba para detectar daño al ADN como son los micronúcleos, aductos, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas

entre otros. Actualmente el ensayo cometa o electroforesis unicelular es el más frecuentemente usado para evaluar el efecto de los contaminantes ambientales sobre el ADN, ésta técnica de fluorescencia es rápida, sencilla, de fácil aplicación, sensible para detectar rompimientos de una o doble cadena de ADN, tanto en los sitios álcali-lábiles o sensibles como en los entrecruzamientos proteína-ADN, en eventos de reparación por escisión incompleta en células individuales y con gran reproducibilidad en tejidos y órganos de diferentes especies animales incluyendo al humano. Además es considerado como una herramienta para evaluar daño mutagénico y genotóxico por estrés oxidante en células humanas *in vivo* e *in vitro*, así como en diversas áreas, entre las que se encuentran biomonitorio ambiental, radiación biológica, ecotoxicología y toxicología epidemiológica molecular. Comparado con otras pruebas genotóxicas, algunas de sus ventajas son que se obtienen resultados a corto tiempo y no se necesitan células en proliferación (Ueta et al. 1993, Ashby et al. 1995, Fairbain et al. 1995, Lee et al. 1996, Anderson 1998, Wagner et al. 1998, Tice et al. 2000, Collins 2002, Speit y Hartmann 2002, Lee et al. 2003).

El ensayo cometa fue originalmente desarrollado por Östling y Johanson (1984) para cuantificar rompimientos en la cadena de ADN en células individuales expuestas a radiación ionizante. En los primeros intentos para detectar el daño emplearon un sistema en el cual las células embebidas en un gel de agarosa mostraron un halo de ADN fragmentado alrededor del núcleo. Después el ensayo se mejoró, realizando la lisis en una solución detergente neutra y aplicando un campo eléctrico débil para atraer hacia el ánodo los fragmentos de ADN localizados en el núcleo. Como la corriente eléctrica pasa a través del gel, la doble cadena de ADN rota se desenrolla y es arrastrada formando una

cauda detrás de la cabeza nuclear. El ADN se tiñó con bromuro de etidio y las células se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia, resultando una imagen parecida a un cometa. Midieron la cauda y determinaron la diferencia entre células irradiadas y no irradiadas, la longitud se incrementó con relación a la dosis de radiación, las condiciones neutras limitaron la utilidad del ensayo ya que fue usado solamente para cuantificar células con y sin daño al ADN (Tice et al. 2000, Collins 2002, Bowden et al. 2003).

En un intento por superar las limitaciones cuantitativas, Singh et al. (1988), basados en la electroforesis neutra descrita por Östling y Johanson (1984) introdujeron la versión alcalina, aumentando el pH y el contenido de sales en la electroforesis (pH 13) para detectar rompimientos de una cadena de ADN y en sitios álcali-lábiles en células individuales, las condiciones alcalinas causaron la desnaturalización del ADN e hicieron al ensayo más sensible a la fragmentación de una sola cadena. Midieron la longitud de la cauda del cometa a partir del primer borde del núcleo y observaron que células con la misma longitud de migración tenían diferente intensidad en la cauda (Ashby et al. 1995, Tice et al. 2000, Collins 2002, Olive 2002, Speit y Hartmann 2002, Bowden et al. 2003, Lee et al. 2003, Faust et al. 2004). El ensayo alcalino fue aceptado por el panel International Workshop on Genotoxicity Test Procedures como la versión óptima, para evaluar sustancias genotóxicas, carcinogénicas, antineoplásicas y apoptóticas. En los últimos años la electroforesis unicelular alcalina ha sido una excelente herramienta en el área de toxicología genética, ya que permite la valoración de daño genético *in vitro* e *in vivo* en gran variedad de células y tejidos de animales y plantas (Tice et al. 2000, Lee et al. 2003).

Posteriormente, Olive et al. (1990) tomaron en cuenta el diámetro de la cabeza y la longitud de la cauda (midiendo la longitud de la cauda desde el centro de la cabeza). Desarrollaron un método de lisis seguida por electroforesis neutra para detectar rompimiento de doble cadena y electroforesis alcalina (pH 12.1) para fragmentación de una cadena de ADN, sin embargo, debido a que la mayoría de los agentes genotóxicos inducen rompimientos de una cadena y en los sitios álcali-lábiles, la versión alcalina es la más aplicada. Debido a la presencia de caudas cortas con mayor fragmentación y largas con pocos fragmentos de ADN, adicionalmente propusieron otro parámetro, la intensidad de la cauda al cual llamaron “momento de la cauda”, el cual se definió como la distancia entre el centro de la masa de la cauda y el centro de la masa de la cabeza, multiplicado por el porcentaje de ADN en la cauda, esta metodología requirió de la ayuda de un sistema de cómputo para analizar y cuantificar cada imagen de cometa, el momento de la cauda comenzó entonces a ser la norma para medir el daño al ADN (Tice et al. 2000, Collins 2002, Speit y Hartmann 2002, Bowden et al. 2003).

Por su parte, Tice et al. (1990) utilizando la electroforesis unicelular alcalina, midieron el diámetro de la célula perpendicular a la dirección de electroforesis para definir la cabeza del cometa y calcularon el momento de la cauda multiplicando la fracción de ADN en la cauda por la mitad de la longitud de la cauda.

Debido a que las tres metodologías anteriores tomaban en cuenta toda la cabeza o la mitad de ella junto con la longitud de la cauda, las células sin daño eran registradas como cometas con la longitud de la cauda igual al diámetro o al radio del núcleo respectivamente, lo cual conduce a que las células intactas tengan un momento de la cauda. Ashby et al. (1995) proponen medir la longitud de la cauda a partir del límite

posterior del núcleo y el momento de la cauda como el producto de la longitud de la cauda por el porcentaje de ADN en la misma.

Desde que apareció el concepto de momento de la cauda, se han desarrollado otras variantes del ensayo cometa, como son el “momento del cometa” y la “inercia de la cauda”, estos sistemas refinados han provisto nuevas vías para observar el daño al ADN, debido a que estas variaciones usualmente tienen una aplicación específica, no han sido ampliamente implantadas. El momento de la cauda queda entonces como norma o estándar para los laboratorios que emplean un equipo de imágenes por computadora en su análisis del ensayo cometa (Hellman et al. 1995).

Para evaluar el daño al ADN por medio del ensayo cometa se usan varios parámetros, entre los que se encuentran 1) determinación del porcentaje de células con cometas, 2) los cometas son usualmente clasificados en cinco categorías, en el nivel 0 no hay daño y en el 4 están las células con el máximo daño, 3) el uso de un sistema de análisis de imagen que determina longitud de la cauda (migración de los fragmentos de ADN), porcentaje de ADN en la cauda (frecuencia de rompimientos de la cadena) y el momento de la cauda, los tres pueden ser usados en combinación o por separado para describir la magnitud del efecto genotóxico al ADN (Angelis et al. 1999, Tice et al. 2000, Faust et al. 2004).

1.14 Justificación

En México son ampliamente consumidos en la dieta tanto el cilantro como el perejil crudos, como se mencionó antes, ambas plantas poseen actividades antioxidantes y antimutagénicas, esto es de gran importancia ya que la población de la Ciudad de México y zona metropolitana está expuesta constantemente a una atmósfera de ozono que representa directa o indirectamente una fuente de formación de radicales libres que bajo condiciones biológicas puede guiar a la generación de ROS y RNS, con la consecuente inducción del daño al ADN y cambios en la expresión, estructura y función de proteínas pulmonares que modifican los procesos celulares que intervienen en el metabolismo y homeostasis, lo cual conlleva a efectos adversos en la salud humana. Por ello la necesidad de evaluar el daño al ADN en los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a diversas concentraciones de ozono y paralelamente las acciones antioxidantes de los extractos crudos de cilantro y perejil mediante el ensayo de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).

II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico del ozono con diferentes concentraciones en macrófagos alveolares en cobayos machos y la acción antigenotóxica de los extractos de cilantro y perejil en el mismo modelo animal mediante el ensayo de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).

2.1 Objetivos Particulares

- Evaluar mediante electroforesis unicelular alcalina el daño genotóxico en los macrófagos alveolares de cobayos machos expuestos a 0.2, y 0.5 ppm de ozono por 3 h diarias en tres días consecutivos y 1.0 y 2.0 ppm de ozono por 3 h en un día.
- Determinar la viabilidad celular de los macrófagos alveolares de cobayos machos expuestos a las diferentes concentraciones de ozono.
- Analizar la acción antigenotóxica de los extractos de cilantro y perejil así como de la vitamina C (ácido ascórbico), en macrófagos alveolares expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de ozono, con la misma prueba de evaluación genotóxica.
- Establecer una relación de dosis-efecto entre la inducción del daño al ADN y los efectos protectores en presencia de los extractos de cilantro y perejil así como vitamina C, en los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a ozono.

III. HIPÓTESIS

Si el ozono es genotóxico al inducir daño al ADN de los macrófagos alveolares *in vivo*, este efecto se evidenciará a través del aumento en la frecuencia de cometas y la migración del ADN. Mientras que si los extractos de cilantro y perejil tienen acción antígenotóxica se mostrará por la disminución del daño al ADN en las mismas células de los cobayos expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de ozono /3 h /día.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue dividido en dos etapas, en la primera se realizaron los ensayos para inducir y analizar el daño sobre el ADN de los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a 0.2 y 0.5 ppm de ozono por 3 h durante 3 días consecutivos y a 1.0 y 2.0 ppm por 3 h un solo día, mediante la prueba de electroforesis unicelular alcalina. Las exposiciones al ozono se llevaron a cabo en las instalaciones del Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

La segunda etapa comprendió la detección de los efectos antioxidantes de los extractos vegetales de cilantro y perejil así como la vitamina C, empleando el mismo ensayo de evaluación del daño genotóxico y modelo experimental antes mencionado.

4.1 GENOTOXICIDAD

4.1.1 Animales y condiciones de exposición

Se realizaron experimentos preliminares con el fin de estandarizar el ensayo cometa para los macrófagos alveolares de la siguiente forma: los cobayos machos fueron proporcionados por el bioterio del INER en el cual permanecieron hasta alcanzar la edad madura y el peso corporal entre 400 y 450 g, se mantuvieron en condiciones de ciclos luz-oscuridad por 12 h, con temperatura (20-25 °C) y humedad controladas, con alimento y agua *ad libitum*. Una vez alcanzada la edad y el peso, se formaron cuatro grupos

experimentales con cuatro cobayos cada uno, el grupo 1 se expuso a 0.2 ppm y el grupo 2, a 0.5 ppm de O₃ por 3 h durante 3 días consecutivos en una cámara acrílica para ozono (48 X 73 X 32 cm), en la misma cámara pero con ambiente de aire al grupo testigo (cobayos expuestos a 0.0 ppm de O₃); el grupo 3 a 1.0 ppm y el grupo 4 a 2.0 ppm de O₃ por 3 h continuas en un día, también con sus respectivos testigos. Se realizaron cuatro experimentos consecutivos.

El ozono se produjo pasando un flujo constante de aire a través de un ozonizador (Puraqua-V, Purificadores Eléctricos por Ozono, México DF, México) en el cual un arco eléctrico convierte el aire en ozono por medio de luz ultravioleta. La concentración del gas se reguló modificando el voltaje del ozonizador y monitoreando continuamente con el analizador ultravioleta para ozono (modelo 1008 PC, Dasibi Environmental, CA, USA) conectado a la cámara a través de tubos de Tygon.

Después de la exposición, los animales de cada grupo experimental y sus respectivos testigos se anestesiaron inyectando intraperitonealmente 1 ml de pentobarbital sódico (Sedal-vet) en solución de 1:3 con solución salina fisiológica (SSF) (PISA), Para aislar los macrófagos alveolares y posterior análisis genotóxico (electroforesis unicelular alcalina) se realizó el lavado broncoalveolar introduciendo 1 ml de SSF recuperando inmediatamente y repitiendo el proceso una vez más.

4.1.2 Análisis genotóxico - electroforesis unicelular alcalina

En las muestras de los lavados broncoalveolares de los cobayos expuestos y no expuestos a ozono inmediatamente se determinó el porcentaje de viabilidad celular (para

estimar el efecto citotóxico) con el método de exclusión de azul tripano, para lo cual se tomaron 10 μ l del botón celular más 10 μ l de azul tripano 0.4 %, en 100 células consecutivas se cuantificó el número de células vivas y muertas. Simultáneamente se realizó una mezcla de 20 μ l de células más 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LPMA 0.5 %, Gibco) a 37 °C, se pusieron en un portaobjetos esmerilado previamente cubierto con una capa de agarosa normal (NMA 1 %, Gibco), se les colocó un cubreobjetos y se hicieron seis laminillas por muestra, las cuales se mantuvieron a 4 °C por 3 min, se removió el cubreobjetos y se sumergieron en un vaso couplin con una solución de lisis final (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, Tritón 1 % y DMSO 10 %, Sigma pH 10) por 1 h a 4 °C. Todos los geles se colocaron en una cámara de electroforesis con amortiguador alcalino frío (300 mM NaOH/1 mM EDTA pH 13, Sigma) durante 20 min para desenrollar las hebras del ADN, la electroforesis fue a 25 volts y 300 mA por 20 min. Posteriormente los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante (Tris 0.4 M, pH 7.5 Sigma) por 5 min cada uno, se fijaron con metanol absoluto frío por 5 min y se secaron al aire en oscuridad a temperatura ambiente. A cada laminilla se agregó 50 μ l de bromuro de etidio (10 %) para teñir el ADN y visualizar el daño.

4.1.3 Evaluación del daño al ADN

Para determinar el daño al ADN en los macrófagos alveolares de los cobayos de los grupos experimentales y de los testigos, se registraron los parámetros siguientes: a) las células con y sin daño al ADN (con y sin cometas) (Fig. 1); b) la longitud de la cauda

(fragmentación del ADN) (Fig 2) y c) la frecuencia de células con diferente grado de daño al ADN, categorizado en cuatro niveles con base a la longitud de la cauda del cometa (Fig.3), Esto se realizó en 50 células consecutivas usando un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss modelo Axiostar Plus H-BO-100, a un objetivo de 40X con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm.

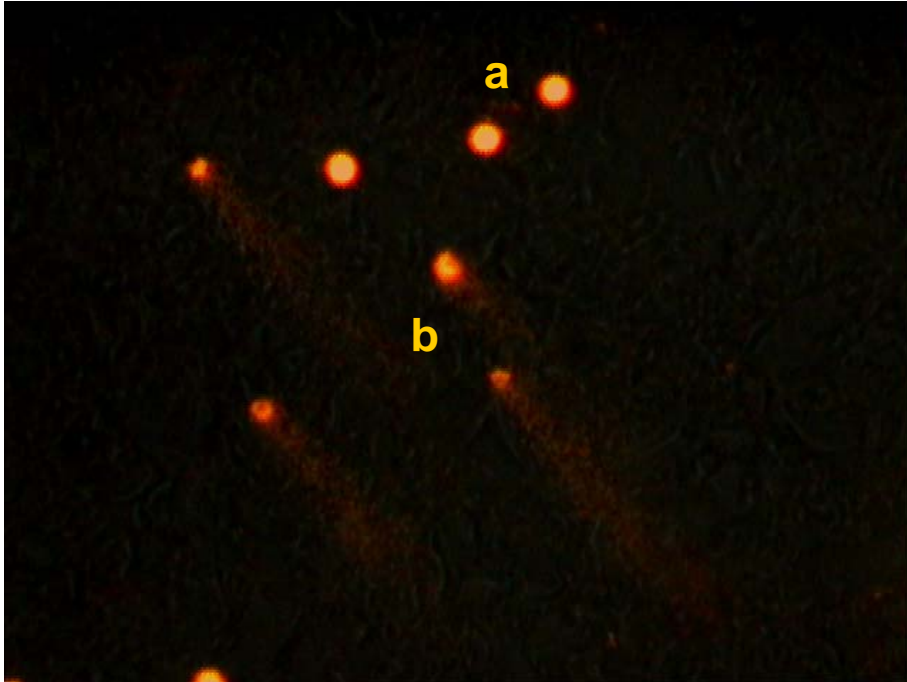


Figura 1. Imagen en la que se observan los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a ozono, a) células sin daño al ADN (sin cometa); b) células con daño al ADN (con cometas) (10X).

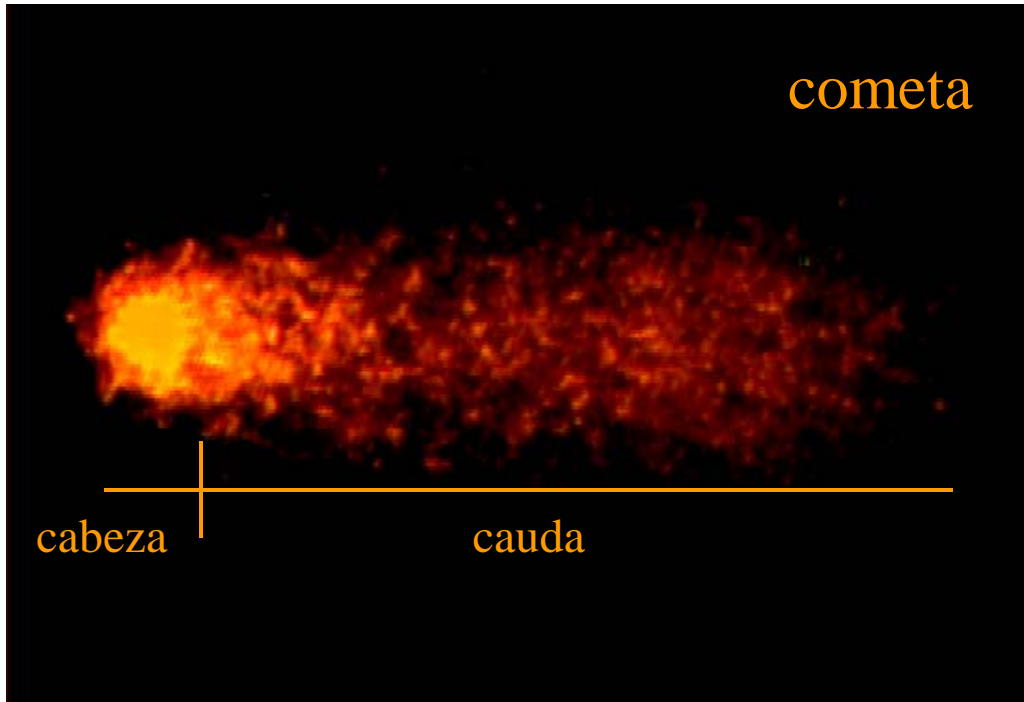


Figura 2. Macrófago alveolar de cobayo expuesto a 2.0 ppm de ozono con severo daño al ADN, mostrando la cabeza y su cauda (40X).

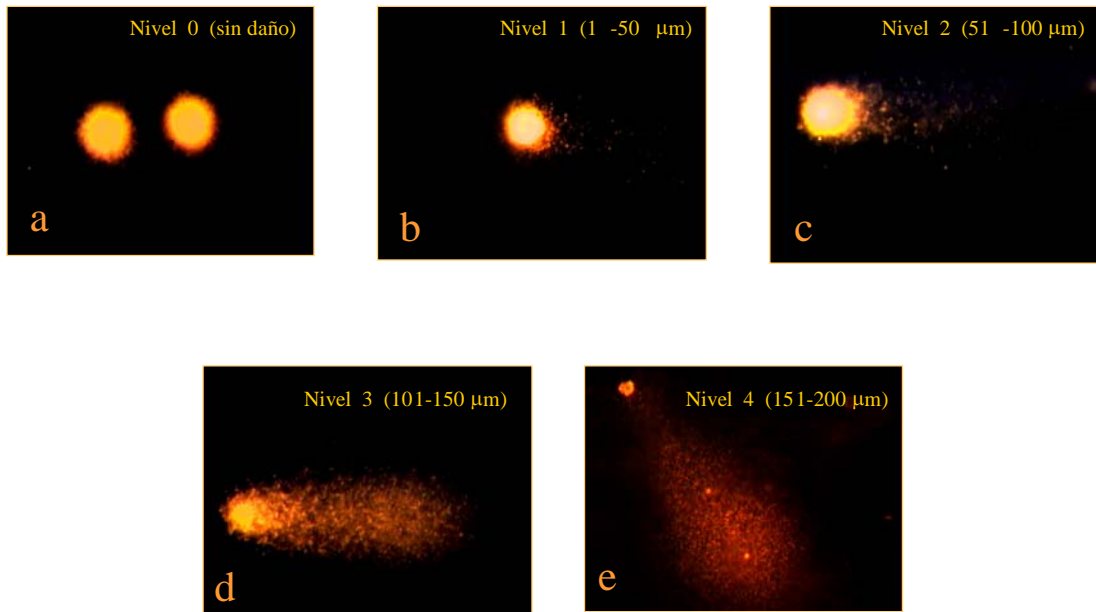


Figura 3. Imágenes de los macrófagos alveolares con y sin daño ADN (con y sin cometas) de cobayos expuestos a diferentes concentraciones de ozono, categorizados en 4 niveles de acuerdo al tamaño de la cauda: a) Macrófago sin daño al ADN, b) Cometa con cauda de 50-100 μm , c) Cometa con cauda de 101-150 μm , d) Cometa con cauda de 151-200 μm , e) Cometa con cauda de 201-250 μm (40X).

4.1.4 Análisis estadístico

Con el fin de evitar prejuicios en las observaciones del análisis genotóxico se reetiquetaron los geles con los núcleos de los macrófagos alveolares de los cobayos expuestos y no expuestos a 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de ozono, así como de los experimentos con y sin administración oral de los extractos del cilantro, perejil y la vitamina C con sus respectivos testigos. Los valores promedio de los cuatro experimentos se compararon entre sí, mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA), de comparación múltiple de Newman-Keuls y de Dunnett.

4.2 ANTIGENOTOXICIDAD

4.2.1 Aislamiento de los extractos vegetales de cilantro y perejil

Los extractos vegetales se aislaron del cilantro y perejil, los cuales se lavaron tres veces con agua bidestilada (desionizada), el exceso del agua se eliminó por absorción con papel filtro estéril, el homogeneizado se obtuvo utilizando un extractor de jugos a 4 °C y en condiciones de oscuridad.

4.2.2 Esquema de administración oral de los extractos de cilantro y perejil, así como de la vitamina C

Se realizaron experimentos preliminares para determinar la concentración adecuada de los extractos vegetales que disminuyera el efecto genotóxico en los macrófagos alveolares de cobayos machos (con peso corporal entre 400-450 g). La cantidad adecuada de administración oral de los extractos crudos de cilantro y perejil fue de 1.25 ml/kg de peso corporal y de 2.5 mg/kg de peso corporal para vitamina C (como testigo positivo) durante 15 días consecutivos previo a la exposición a 1.0 y 2.0 ppm de O₃, los testigos negativos con las mismas concentraciones de los extractos vegetales y vitamina C y otro más con agua, estuvieron en un ambiente de aire (0.0 ppm de O₃). Se realizaron cuatro experimentos consecutivos.

Para evaluar los efectos antigenotóxicos de los extractos vegetales del cilantro y perejil y de la vitamina C contra el daño al ADN de los macrófagos alveolares de cobayos expuestos y no expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de ozono se llevó a cabo en todos los experimentos el ensayo de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) así como el análisis de la viabilidad descritos en la primera etapa.

V. RESULTADOS

5.1 Genotoxicidad

Para evaluar la genotoxicidad que causa el ozono en los macrófagos alveolares de los cobayos machos, se realizó el ensayo de electroforesis unicelular alcalina considerando tres parámetros, la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas), la longitud de la cauda (migración del ADN en μm) y los niveles de daño al ADN de acuerdo a la longitud de la cauda (μm).

La Tabla 1 muestra los valores promedio de cuatro experimentos consecutivos del efecto genotóxico en macrófagos alveolares de cobayos expuestos a 0.2 y 0.5 ppm de O_3 por 3 h diarias durante 3 días y 1.0 y 2.0 ppm de O_3 por 3 h durante 1 día. La frecuencia de células con daño al ADN (con cometas) aumenta significativamente a 0.2 ppm con 14, con 0.5 ppm fue de 16, con 1.0 ppm de 25 y con 2.0 ppm de 42, con respecto al testigo (0.0 ppm de O_3) (Tabla 1, Gráfica 1).

Con respecto a la longitud de la cauda (migración del daño al ADN en μm), los valores aumentan significativamente con 0.2 ppm, $43.32 \pm 3.77 \mu\text{m}$; con 0.5 ppm, $55.15 \pm 3.66 \mu\text{m}$; con 1.0 ppm, $80.15 \pm 3.30 \mu\text{m}$ y con 2.0 ppm, $158.23 \pm 3.17 \mu\text{m}$, comparado con el valor del testigo, $23.25 \pm 1.43 \mu\text{m}$ (0.0 ppm de O_3) ($p < 0.01$) (Tabla 1, Gráfica 2).

En la frecuencia de las células con diferente grado de daño al ADN categorizados como niveles del 0 al 4, todas las concentraciones de ozono están en mayor proporción en las categorías 2 y 3, con su longitud de la cauda en 51-100 μm y 101-150 μm respectivamente, excepto para 2.0 ppm que se encontraron en los niveles 2-4 (51-200 μm) (Tabla 1, Figs. 3c y 3d).

El análisis de la viabilidad de los macrófagos alveolares de los cobayos expuestos a 0.2 y 0.5 ppm de O₃ por 3 h en tres días y 1.0 y 2.0 ppm de O₃ por 3 h/día, demuestra que este gas no ejerce citotoxicidad ya que no hubo diferencias significativas con respecto a los valores del testigo (0.0 ppm de O₃) (98.0± 1.72 μm) (Tabla 1, Gráfica 3).

5.2 Antigenotoxicidad

Una vez corroborada la reproducibilidad del efecto genotóxico del ozono en los macrófagos alveolares de cobayos se procedió a analizar las propiedades antigenotóxicas de los extractos crudos de cilantro y perejil, usando vitamina C como testigo positivo ya que ha demostrado reducir el daño oxidante de este gas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se realizaron experimentos previos con diferentes tratamientos de los extractos crudos de cilantro y perejil para encontrar el volumen adecuado que redujera el daño al ADN inducido a 1.0 y 2.0 ppm de O₃ en los macrófagos alveolares de cobayos machos, encontrando una clara disminución en el daño al ADN de estas células con 1.25 ml/kg de peso corporal de los extractos vegetales y 2.5 mg/kg de peso corporal de vitamina C durante 15 días.

Los resultados obtenidos en los grupos de cobayos expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de O₃, previa administración oral con 1.25 ml/kg de peso corporal de los extractos crudos de cilantro y perejil, así como 2.5 mg/kg de peso corporal de vitamina C durante 15 días consecutivos son los siguientes; con el extracto de cilantro la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas) fue de 25 a 6 con 1.0 ppm y de 42 a 4 con 2.0 ppm de O₃. El extracto del perejil redujo de 25 a 5 en 1.0 ppm y de 42 a 5 en 2.0 ppm; la vitamina C disminuye la frecuencia de 25 a 4 y de 42 a 6 expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de O₃ respectivamente comparado con los testigo negativos con y sin administración oral de extractos vegetales y expuestos al aire (Tabla 3, Gráficas 6 y 8).

Con relación a la longitud de la cauda del cometa (migración del ADN) se observa disminución significativa del daño al ADN en los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de O₃ con los extractos vegetales y la vitamina C. Con el extracto de cilantro desciende la longitud de la cauda de $80.15 \pm 3.30 \mu\text{m}$ a $21.40 \pm 2.66 \mu\text{m}$; con 1.0 ppm y de $136.22 \pm 11.19 \mu\text{m}$ a $18.22 \pm 2.77 \mu\text{m}$ con 2.0 ppm; el extracto de perejil reduce de $80.15 \pm 3.30 \mu\text{m}$ a $20.10 \pm 2.87 \mu\text{m}$ con 1.0 ppm y de $136.22 \pm 11.19 \mu\text{m}$ a $24.88 \pm 3.78 \mu\text{m}$ con 2.0 ppm; mientras que con vitamina C (testigo positivo) de $80.15 \pm 3.30 \mu\text{m}$ a $18.02 \pm 3.80 \mu\text{m}$ con 1.0 ppm y de $136.22 \pm 11.19 \mu\text{m}$ a $21.02 \pm 2.33 \mu\text{m}$ con 2.0 ppm (Tabla 3, Gráficas 7 y 9).

Con respecto a la frecuencia de macrófagos con diferente grado de daño al ADN (niveles 0-4), de los cobayos con administración oral de los extractos vegetales y vitamina C, expuestos a dosis agudas observamos que la mayor proporción se encuentra en el nivel 1 (1-50 μm) (Fig.3b), células con caudas pequeñas, comparada con los expuestos a 1.0 y 2.0 ppm O₃ que se encuentran en los nivel 2, 3 y 4 (51-200 μm) (Tabla 3, Fig 3c).

Al comparar los valores de la frecuencia de células con daño al ADN, longitud de la cauda del cometa y las proporciones de células con diferente grado de daño (niveles del 0-4) de los testigos con y sin administración oral de los extractos vegetales y vitamina C expuestos al aire, observamos que no hubo diferencias significativas con los grupos tratados con la administración de los extractos y expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de O₃ (Tabla 2, Gráficas 4 y 5, fig 3).

La viabilidad de los macrófagos alveolares de los cobayos con y sin administración oral de los extractos de cilantro y perejil, y con vitamina C sin y con exposición a 1.0 y 2.0 ppm de ozono no fue afectada.

VI. DISCUSIÓN

El ozono es un potente oxidante atmosférico, del cual se ha mostrado que puede causar diversos efectos morfológicos, celulares, fisiológicos, bioquímicos y daño al ADN en tejidos animales y vegetales (U.S. EPA 2004). Existen diversos ensayos para evaluar los efectos genotóxicos de contaminantes ambientales entre los cuales se encuentran los micronúcleos, la prueba de Ames, las aberraciones cromosómicas y la electroforesis unicelular alcalina conocida como ensayo cometa, el cual es una técnica rápida y sencilla para detectar rompimientos en el genoma a nivel de células individuales (Noroozi et al. 1998, Sierens et al. 2001). En el presente estudio se aplicó este último ensayo para analizar el efecto genotóxico del ozono así como la capacidad antioxidante de los extractos de cilantro y perejil en macrófagos alveolares de cobayos.

En este trabajo se evidencia el daño al ADN en los macrófagos alveolares de cobayos expuestos con 0.2 y 0.5 ppm de ozono por 3 h diarias durante 3 días y 1.0 y 2.0 ppm por 3 h/día. En las exposiciones crónicas, a partir de 0.2 ppm aumenta la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas) y se duplica la longitud de la cauda del cometa (Tabla 1, gráficas 1 y 2) con respecto al testigo (0.0 ppm de ozono). Con 0.5 ppm es mayor la frecuencia de células con cometas y la longitud de su cauda (Tabla 1, gráficas 1 y 2) con respecto a los datos del testigo negativo (0.0 ppm de ozono). Cuando se realizaron las exposiciones agudas se observa mayor efecto genotóxico con 1.0 ppm de ozono, se triplica la frecuencia de células con daño al ADN y cuatro veces más la longitud de la cauda (Tabla 1, gráficas 1 y 2) con respecto al testigo (0.0 ppm de ozono) y a 2.0 ppm de ozono el 84% de los macrófagos muestran gran fragmentación al ADN visualizados con caudas muy grandes, seis veces más la longitud de la cauda del testigo (0.0 ppm de ozono) lo que implica severo daño al genoma (Tabla 1, gráficas 1 y 2). El análisis de la viabilidad de los macrófagos alveolares de los

cobayos expuestos con las concentraciones crónicas y agudas no fue afectada, comparada con el valor del testigo testigo (0.0 ppm de ozono) (Tabla 1, gráfica 3).

El efecto genotóxico en los macrófagos alveolares expuestos a las diferentes concentraciones de ozono tuvo una clara relación dosis-respuesta en todos los parámetros evaluados (Tabla 1). Datos que concuerdan con los reportados por Frenkel (1992), Ferng et al. (1997), Haney et al. (1999) y Bornholdt et al. (2002), que demuestran inducción significativa de rompimientos del ADN en células de lavados broncoalveolares de ratas y cobayos expuestos a 0.1 y 1.0 ppm de ozono en periodos de 3-24 h. Lee et al. (1996), muestran lo mismo en cultivo de células bronquiales humanas expuestas a 0.4 ppm de ozono por 40 min y a 1.0 y 2.0 ppm por 2 h. Díaz-Llera et al. (2002), observan similar acción genotóxica en leucocitos humanos expuestos a 0.9-5.3 mM de O₃ por 1 h. Sin embargo, Dillon et al. (1992), obtienen débil respuesta mutagénica en *Salmonella typhimurium* cepa TA102 con y sin activación metabólica expuesta a 0.02 - 0.5 ppm de ozono por 35 min.

El mecanismo por el cual el ozono produce rompimientos en el ADN aún no ha sido totalmente identificado, diversas investigaciones *in vivo* e *in vitro* han evidenciado que este gas al penetrar a las vías respiratorias causa daño epitelial y peroxidación de los lípidos de membrana así como de los fluidos pulmonares, con la producción de peróxido de hidrógeno, aniones superóxidos o aldehídos como especies de oxígenos reactivos (ROS) como intermediarios entre otros (Pryor y Church 1991, Pryor 1992, 1994, Cheng et al. 1995), los cuales pueden interactuar con el ADN de los macrófagos alveolares y de las células epiteliales broncoalveolares. (Floyd y Carney 1992, Frenkel 1992, Pryor 1994, Díaz-Llera et al. 2002).

Cajigas et al. (1994), identifican translocaciones en los pares de bases G-T principalmente en las secuencias 5'-C-G-A-3' asociadas con la formación de los aductos 5-hidroximetiluracilo, timina glicol y 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-oxo-dG) en ADNc a 2.0 ppm de ozono por 24 h. Jorge et al. (2002), cuantifican el porcentaje de translocaciones

en los pares GC a AT: 28 % G:C a T:A, 23 % G:C a C:G y 23 % G:C a A:T, vía formación de aductos 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina (8-oxo-dG) y 8-oxo-dihidro-2'-dGTP (8-oxo-dGTP) en células humanas transfectadas con el plásmido SV40, expuestas a 20 ppm de ozono por 10, 20 y 30 min.

Cheng et al. (2003), señalan que en la línea celular A549 con 0.6, 0.8 y 1.0 ppm de ozono por 1 h, el aumento de los rompimientos en el ADN es dependiente de los niveles del aducto 8-oxoguanina (8-oxo-dG). Recientemente, Ito et al. (2005), revelan que la fragmentación del ADN de las células del timo de ternera expuestas a ozono *in vitro* es vía radicales hidroxilo y la formación del aducto 8-oxo-dG es por interacción directa con el ozono.

Diversos estudios en poblaciones humanas expuestas por corto tiempo (1 a 24 h) a niveles mayores de 0.1 ppm de ozono urbano con picos de 0.25 ppm en ciudades de América y Europa, revelan el mismo efecto genotóxico en diferentes líneas celulares respiratorias (Burnett et al. 1997, Hoek et al. 1997, U.S. EPA 2004). En México, Castillejos et al. (1992) y Calderón-Garcidueñas et al. (1997, 1999) visualizan rompimientos en el ADN e identifican el aducto 8-oxo-dG, en células del epitelio nasal de niños que habitan en el Suroeste del Distrito Federal. Valverde et al. (1997), Rojas et al. (2000) y Fourtoul et al. (2004), reportan similar daño sobre el ADN en células del epitelio nasal y bucal así como en leucocitos de personas que habitan en la misma zona de la Ciudad de México, donde los niveles de ozono atmosférico son de 0.2 a 0.4 ppm. Pacini et al. (2003), encuentran el mismo efecto genotóxico en células de la mucosa nasal de personas que viven en la Ciudad de Florencia, Italia, donde las concentraciones de ozono atmosférico son menores comparados con los de la Ciudad de México.

Actualmente, se ha relacionado la incidencia de enfermedades respiratorias como el asma (Hassett et al. 1985, Lawrence et al. 1998), con exposiciones a concentraciones mayores

de 1.0 ppm de ozono atmosférico, aunque su acción carcinogénica aún no ha sido identificada. Sin embargo, estudios con modelos animales han demostrado que produce tumores en pulmón (Mustafa et al. 1988). En ratones hembras B6C3F₁ expuestas con 0.5 y 1.0 ppm de ozono, desarrollan adenomas y carcinomas en bronquios y alveolos con más incidencia a mayor concentración (Herbert et al. 1996). Con 1.0 ppm de ozono por 24 y 30 meses aumenta la presencia de neoplasmas en ratones hembras y machos con gran frecuencia de mutaciones, específicamente en el proto-oncogen *K-ras* y sugiriendo que el ozono causa daño al ADN directa e indirectamente (Sills et al. 1995). Paralelamente al daño oxidante por ozono, la inflamación es otro factor de riesgo adicional a las alteraciones en la función pulmonar (Balkwill y Mantovani 2001, Coussens y Werb 2002). Durante la inflamación crónica, las células producen mayores niveles de especies de oxígenos y nitrógenos reactivos, los cuales conducen a las alteraciones funcionales a éste y a otros órganos (Loft y Poulsen 1996, Halliwell y Cross 1994, Ohshima et al. 2003).

El pulmón tiene mecanismos de defensa contra el daño oxidante, los cuales incluyen a los sistemas antioxidantes enzimáticos intracelulares como catalasa, superóxido dismutasas (SOD-manganeso y cobre-zinc), glutatión peroxidasa (GSHP), reductasa (GSHR), glutatión-S-transferasa (GSH-ST), glutatión disulfido transhidrogenasa y los sistemas antioxidantes no enzimáticos tales como las vitaminas A, C y E, ferritina, glutatión reducido, ubiquinona y otras proteínas (Heffner y Repine 1989). A exposiciones agudas de ozono se incrementan la transcripción y traducción de los RNAm de estas moléculas antioxidantes detectando elevadas concentraciones en los lavados broncoalveolares (Suzy et al. 2002). Las variaciones en la tasa redox son un indicador sensible del daño oxidante el cual ha mostrado una correlación con el grado de inflamación y daño pulmonar (Lee et al. 1989, 1990, Plopper et al. 1994, Rivas-Arancibia et al. 1998, Dormans et al. 1999, Long et al. 2001, Suzy et al. 2002). Por ello la

administración exógena de antioxidantes protege contra los efectos del ozono en humanos y animales (Heffner y Repine 1989, Kodavanti et al. 1996).

Investigaciones *in vivo* e *in vitro* sugieren que el estrés oxidante está relacionado con la etiología de muchas enfermedades del sistema respiratorio y de otros órganos (Lawrence 2000). Estudios epidemiológicos indican que una dieta a base de frutas y verduras reducen el riesgo a estas patologías, la presencia de ciertos antioxidantes vegetales disminuyen la peroxidación de lípidos y los niveles de radicales libres, reduciendo y/o evitando alteraciones en las biomoléculas celulares. Diferentes fitoquímicos vegetales tales como los licopenos, terpenos, flavonoides y las vitaminas A y E previenen, reducen e inhiben el daño pulmonar producido por el ozono tanto *in vivo* como *in vitro* (Pryor 1991, Anderson et al. 1998, Romieu et al. 1998, Carr y Frai 1999, Cai et al. 2001, Song et al. 2001, Medina et al. 2002, Gerhäuser et al. 2003, May et al. 2003).

En la última década, en el aire de la Ciudad de México se han detectado diversos contaminantes atmosféricos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y el ozono, entre otros, los cuales están asociados con el aumento de las enfermedades respiratorias en la población mexicana (Castillejos et al. 1992, Calderón-Garcidueñas et al. 1996, 1998, Romieu et al. 1996, 1998), por tal motivo, otro objetivo de este trabajo fue analizar los efectos antioxidantes de los extractos completos del cilantro y del perejil contra la genotoxicidad del ozono, ya que ambos vegetales forman parte de la dieta del mexicano y se consumen principalmente crudos, además la mayoría de los estudios con antioxidantes vegetales se basan con fitoquímicos específicos y son pocos los enfocados con extractos completos.

En experimentos preliminares administramos oralmente diferentes volúmenes de los extractos de cilantro y perejil así como vitamina C a cobayos machos previo a la exposición a 1.0 y 2.0 ppm de ozono por 3 h, encontrando que con 1.5 mg/kg de peso corporal de los extractos vegetales y 2.5 mg/kg de peso corporal de vitamina C por 15 días antes de la

exposición ozono, se obtuvo reducción significativa del efecto genotóxico con pocas células con cometas, poca fragmentación del ADN (longitud de la cauda μm) y caudas pequeñas dentro de las categorías de daño al ADN en los niveles 1 y 2 (Tabla 3, gráficas 6, 7, 8 y 9, figs.3b y 3c), comparado con los valores de los testigos (administración oral con y sin cilantro, perejil y vitamina C expuestos a 0.0 ppm de ozono) (Tabla 2, gráficas 4 y 5).

El efecto antioxidante de los extractos de cilantro y perejil en los macrófagos alveolares de cobayos expuestos a concentraciones agudas de ozono se puede explicar con base en sus propiedades químicas, ambos tienen elevada actividad antioxidante por la presencia de metabolitos secundarios, predominantemente flavonoides y terpenos entre otros (datos en preparación por Baldomero et al. Instituto de Química, UNAM) (Kunzemann y Herrmann 1977, Hempel et al. 1999, Nielsen et al. 1999, Kreydiyyeh et al. 2001, Misharina 2001, Al-Howiriny et al. 2003, Satyanarayana et al. 2003), los cuales se consideran excelentes donadores de átomos de hidrógeno a los radicales peroxi (Noroozi et al. 1998), por su parte, Ramadan et al. (2003) confieren la gran función antioxidante del extracto de cilantro a su facilidad para atrapar radicales libres y/o intermediarios metabólicos producidos por el ozono y Fejes et al. (1998, 2000), confirman que la acción antioxidante del extracto de perejil se debe a su efecto atrapador de radicales libres por los flavonoides. Además de las vías respiratorias, también aumenta la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo, como lo demostraron Hempel et al. (1999) en ratas administradas con extractos de perejil.

La antigenotoxicidad de los extractos vegetales también puede deberse a la estimulación de las células del sistema respiratorio para la sobreproducción de las enzimas antioxidantes endógenas capaces de incrementar la captura de los ROS o de los intermediarios metabólicos del ozono evitando sus interacciones con el genoma de los macrófagos alveolares. Estos resultados concuerdan con los reportados por Nielsen et al. (1999) que observaron incremento en la concentración de flavonoides y de las enzimas antioxidantes

glutación reductasa y superóxido dismutasa en la orina de humanos con suministro de una dieta suplementada con perejil. Chathaam et al. (1987) y Elsayed et al. (1991), obtuvieron aumento en los niveles de estos antioxidantes, siendo mayor cuando se aplicó exógenamente en animales y humanos expuestos a 1.0 ppm de ozono por 1h.

La peroxidación de lípidos de membrana y de los fluidos pulmonares por la interacción del ozono, es fuente de producción de radicales libres y ROS que causan daño al ADN. Chithra y Leelamma (1999) y Fejes et al. (1998, 2000), encuentran actividad antilipoperoxidante en los extractos de cilantro y perejil, observando disminución significativa en los niveles de peróxidos lipídicos y ácidos grasos e incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes como glutatión. Cortés-Eslava et al. (2004) trabajando con el extracto de cilantro, demuestran también efecto antimutagénico contra las aminas aromáticas.

Al comparar los valores de los parámetros de genotoxicidad de ambos extractos vegetales, en este trabajo se observó que el cilantro y el perejil muestran similar actividad antioxidante lo que indica tal vez que los extractos tienen la misma cantidad de antioxidantes ya que encontramos genotoxicidad semejante en ambas concentraciones de ozono, esto muestra que los fitoquímicos de ambos extractos vegetales son excelentes antigenotóxicos, posiblemente reductores de la peroxidación de los lípidos y de la acción de los radicales libres e inhibidores de la toxicidad del ozono.

Con la finalidad de tener la certeza de la acción antioxidante de ambos extractos vegetales contra el daño al ADN inducido por el ozono, se usó como testigo positivo la vitamina C a 2.5 mg/kg de peso corporal, la cual ha mostrado ser excelente antioxidante, ya que inhibe la acción oxidante del ozono tanto *in vivo* como *in vitro* por su capacidad para disminuir los ROS durante el estrés oxidante causado por ozono en las vías respiratorias (Halliwell 1990, Green et al. 1994, Thiele et al. 1997, Duthie et al. 1996, Cooke et al. 1998, Qi et al. 2000, Guaiquil et al. 2001, Jonhston y Cox 2001, Lutsenko et al. 2002, Cheng et al.

2003). La vitamina C junto con los flavonoides y terpenos contenidos en los sistemas vegetales, disminuyen la frecuencia de fragmentación del ADN (Cai et al. 2001, May et al. 2003), sin embargo, Satyanarayana et al. (2003) consideran que la actividad antioxidante del extracto de cilantro puede ser superior a la de la vitamina C. Los resultados mostrados en la Tabla 2, corroboran el papel antioxidante de esta vitamina al visualizar frecuencias basales de macrófagos alveolares con cometas con poca fragmentación del ADN (caudas pequeñas) de los cobayos expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de ozono (Tabla 2, fig. 2b).

Los resultados del presente estudio, apoyan la posibilidad de continuar con las investigaciones para identificar las clases de antioxidantes contenidos en los extractos completos de cilantro y perejil, así como el mecanismo y/o interacciones de estas moléculas contra la acción de los ROS producidos por el ozono y quizás aplicarlos a otros agentes oxidantes presentes en el aire de la Ciudad de México, lo cual sería de gran relevancia y beneficio para la salud.

VII. CONCLUSIONES

El ozono a diferentes concentraciones produjo genotoxicidad en los macrófagos alveolares *in vivo*, con una clara relación de dosis-respuesta. A elevadas concentraciones ocasionó severo daño al ADN, evidenciado en el incremento de la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas) y en la longitud de su cauda.

La administración oral de los extractos de cilantro y perejil a cobayos machos por 15 días previos a la exposición a ozono, disminuyó significativamente tanto la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas), como la longitud de la cauda de los macrófagos alveolares, mostrando que los extractos vegetales tuvieron acción antígenotóxica.

La viabilidad de los macrófagos alveolares de los cobayos expuestos y no expuestos a diferentes concentraciones de ozono, con y sin administración oral de los extractos vegetales, no se afectó en comparación con los valores de los testigos por lo que este gas no ejerció citotoxicidad.

La electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa), mostró ser un excelente método sensible y reproducible para evaluar el daño al ADN causado por ozono.

En ciudades industrializadas, donde las concentraciones de ozono se encuentran por arriba de los estándares de calidad del aire, se podría recomendar una dieta con mayor consumo de cilantro y perejil, por su gran contenido de antioxidantes que ayudan a disminuir el daño oxidante al ADN.

VIII. REFERENCIAS

- Acheson R. M. y Williams D. R. R. 1983. Does consumption of fruit and vegetables protect against stroke. *Lancet* **1**, 1191-1193.
- Adamson I. Y. R., Vincent R., Bjarnason S. 1999. Cell injury and interstitial inflammation in rat lung after inhalation of ozone and urban particulates. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **20**, 1067-1072.
- Al-Howiriny T., Al-Sohaibani M., El-Tahir K., Rafatullah S. 2003. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*. *Am. J. Chin. Med.* **31**, 699-711.
- Al-Said M. S., Al-Khamis K. I., Islam M. W., Parmar N. S., Tariq M., Ageel A. M. 1987. Post-coital antifertility activity of the sedes of *Coriandrum sativum* in rats. *J. Ethnopharmacol.* **21**, 165-173.
- Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7915-7922.
- Anderson D. 1998. Comet assay responses of carcinogen exposure. *Mutagenesis* **13**, 539-555.
- Anderson D., Dobrzynska M. M., Basaran N., Basaran A., Yu T. W. 1998. Flavonoids modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. *Mutat. Res.* **402**, 269-277.
- Angelis K., Dusinská M., Collins A. 1999. Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 2133-2138.
- Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S. E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7970-7981.

- Appendino G., Jakupovic J., Bossio E. 1998. Structural revision of the parsley sesquiterpenes crispanone and crispane. *Phytochemistry* **49**, 1719-1722.

- Armstrong B. K., Mann J. I., Adelstein A. M., Eskin F. 1975. Commodity consumption and ischemic heart-disease mortality with special reference to dietary practices. *J. Chronic. Dis.* **28**, 455-469.

- Asada K. 1994. Mechanism for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under of light stress. En: *Molecular mechanism to the field* Baker N. R., Bowyer J. R. Photoinhibition photosynthesis. Bios. Scientific Publishers Oxford pp: 129-142.

- Ashby J., Tinwell H., Lefevre P. A., Browne M. A. 1995. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* **10**, 85-90.

- Balkwill F. y Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-545.

- Bermúdez E., Ferng S. F., Castro C. E., Mustafa M. G. 1991. DNA strand breaks caused by exposure to ozone and nitrogen dioxide. *Environ. Res.* **81**, 72-80.

- Bhalla D. K. 1999. Ozone-induced lung inflammation mucosal barrier disruption: toxicology, mechanism and implications. *Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* **2**, 31-86.

- Bindhumol V., Chitra K. C., Mathur P. P. 2003. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rat. *Toxicology* **188**, 117-124.

- Blokchina O. Virolainen E., Fagerstedt K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot. (Lond).* **91**, 179-194.

- Bolkent S., Yanardag R., Ozsoy-Sacan O., Karabulut-Bulan O. 2004. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) on the liver of diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Phytother. Res.* **18**, 996-999.

- Bornholdt J., Dybdahl M., Vogel U., Hansen M., Loft S., Wallin H. 2002. Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice. *Mutat. Res.* **26**, 63-71.

- Bowden R., Buckwalter M., McBride J., Johnson D., Murray B., O'Neill K. 2003. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the Comet assay. *Mutat. Res.* **537**, 1-9.

- Burnett R. T., Brook J. R., Yung W. T., Dales R. E., Krewski D. 1997. Association between ozone and hospitalization for respiratory diseases in 16 Canadian cities. *Environ. Res.* **72**, 24-31.

- Cai L., Koropatnick J., Cherian M. G. 2001. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper. *Chemico-Biol. Interac.* **137**, 75-88.

- Cajigas A., Gayer M., Beam C., Steinberg J. J. 1994. Ozonation of DNA forms adducts: a ³²P-DNA labeling and thin-layer chromatography technique to measure DNA environmental biomarkers. *Arch. Environ. Health* **49**, 25-36.

- Calderón-Garcidueñas L., Osnaya-Brizuela N., Ramírez-Martínez L., Villarreal-Calderón A. 1996. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* **104**, 160-168.

- Calderón-Garcidueñas L., Osnaya N., Rodríguez A. A., Villareal C. A. 1997. DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**, 11-20.

- Calderón-Garcidueñas L., Rodríguez Alcaraz A., Villarreal-Calderón A., Light O., Janszen D., Morgan K. T. 1998. Nasal epithelium as a sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicol. Sci.* **46**, 352-364.

- Calderón-Garcidueñas L., Wen W. L., Zhang Y. J., Rodríguez A. A., Osnaya N., Villareal C. A., Santella R. M. 1999. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* **107**, 469-474.

- Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Butterworth F. M., Amador-Muñoz O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat. Res.* **558**, 7-17.

- Cao G. H., Sofic E., Pryor R. I. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3426-3431.

- Carr A. y Frai B. 1999. Does Vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB* **13**, 1007-1024.

- Castillejos M., Gold D. R., Dockery D., Tosteson T., Baum T., Speizer F. E. 1992. Effects of ambient ozone on respiratory function and symptoms in Mexico City schoolchildren. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 276-282.

- Chathaam M. D., Eppler J. H., Saunder L. R., Green D., Kulle T. J. 1987. Evaluation of the effects of vitamine C on ozone induced bronchoconstriction in normal subjets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **498**, 269-279.

- Cheng P. W., Boat T. F., Shaikh S., Wang O. L., Hu P. C., Costa D. L. 1995. Differential effects of ozone on lung epithelial lining fluid volume and protein content. *Exp. Lung Res.* **21**, 351-365.

- Cheng T. J., Kao H. P., Chan C. C., Chang W. P. 2003. Effects of ozone on DNA single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells. *Environ. Res.* **93**, 279-284.

- Chithra V. y Leelamma S. 1997. Hypolipidemic effect of coriander seeds (*Coriandrum sativum*): mechanism of action. *Plant Foods Hum. Nutr.* **51**, 167-172.

- Chithra V. y Leelamma S. 1999. *Coriandrum sativum* changes the levels of lipid peroxides and activity of antioxidant enzymes in experimental animals. Indian J. Biochem. Biophys. **36**, 59-61.

- Chu Y., Sun J., Wu X., Liu R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. J. Agric. Food Chem. **50**, 6910-6916.

- Ciganda C. y Laborde A. 2003. Herbal infusions used for induced abortion. J. Toxicol. Clin. Toxicol. **41**, 235-239.

- Cohen-Kerem R. y Koren G. 2003. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. Neurotoxicol. Teratol. **25**, 1-9.

- Collins A. 2002. The comet assay, principles, applications and limitations. En: *Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*. Vol. **203**, 163-177. Human Press Inc. Totowa, Nueva Jersey.

- Cooke M. S., Evans M. D., Podmore L. D., Herbert K. E., Mistry N., Mistry P., Hickenbotham P. T., Hussieni A., Griffiths H.R., Lunec J. 1998. Novel repair action of Vitamin C upon *in vivo* oxidative DNA damage. FEBS Lett. **363**, 363-367.

- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Espinosa-Aguirre J. J. 2004. Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. Toxicol. Lett. **153**, 283-292.

- Coussens L. M. y Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. Nature **420**, 860-867.

- Dashwood R., Negishi T., Hayatsu H., Breinholt V., Hendricks J., Bailey G. 1998. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. Mutat. Res. **399**, 245-253.

- Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* **74**, 101-109.

- Dewanto V., Wu X. Z., Liu R. H. 2002a. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Agric. Food Chem.* **50**, 4959-4964.

- Dewanto V., Wu X. Z., Adom K. K., Liu R. H. 2002b. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Agric. Food Chem.* **50**, 3010-3014.

- Díaz-Llera S., González-Hernández Y., Prieto-González E. A., Azoy A. 2002. Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutat. Res.* **517**, 13-20.

- Dillon D., Combes R., McConville M., Zeiger E. 1992. Ozone is mutagenic in *Salmonella*. *Environ. Mol. Mutagen.* **19**, 331-337.

- Doelman C. y Band A. 1990. Oxygen radicals in lung pathology. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 381-400.

- Dormans J. A., Van Bree L., Boere A. J., Marra M., Rombout P. J. 1999. Interspecies differences in time course of pulmonary toxicity following repeated exposure to ozone. *Inhal. Toxicol.* **11**, 309-329.

- Dubeau H. y Chung Y. S. 1982. Induction of point mutation and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **102**, 249-259.

- Dutta A. y Dutta S. K. 2003. Vitamine E and its role prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: Review *J. Am. Coll. Nutr.* **22**, 258-268.

- Duthie S., Ma A., Ross M., Collins A. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* **56**, 1291-1295.

- Eastwood M. A. 1999. Interaction of dietary antioxidants *in vivo*: how fruit and vegetables prevent disease. *Q. J. Med.* **92**, 527-530.

- Elsayed N. M. 2001. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition* **17**, 828-834.

- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. 1991. Chemistry, biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81-128.

- Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. 1995. The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* **339**, 37-59.

- Fattman C., Schaefer L., Oury T. 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 236-256.

- Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R., Mann M., Mersch-Sundermann V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* **566**, 209-229.

- Fejes S., Kery A., Blazovics A., Lugasi A., Lemberkoviks E., Petri G., Szoke E. 1998. Investigation of the *in vitro* antioxidant effect of *Petroselinum crispum* (Mill.) nym. Ex A.W. Hill. *Acta Pharm. Hung.* **68**, 150-156.

- Fejes S., Blazovics A., Lemberkoviks E., Petri G., Szoke E., Kery A. 2000. Free radical scavenging and membrane protective effect of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum* (Mill.) nym. Ex A.W. Hill. *Phytother. Res.* **14**, 362-365.

- Ferng S. F., Castro A. C., Afifi A. A., Bermúdez E., Mustafa M. G. 1997. Ozone-induced DNA strand breaks in Guinea pig tracheobronchial epithelial cells. *J. Toxicol. Environ. Health* **51**, 353-367.

- Ferng S. F. 2002. Ozone-induced DNA single strand-breaks in guinea pig tracheobronchial epithelial cells *in vivo*. *Inhal. Toxicol.* **14**, 621-633.

- Floyd R. A. y Carney J. M. 1992. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* **32**, 22-27.

- Fortoul T. I., Valverde M., López M. C., Avila-Costa. M. R., Avila-Casado M. C., Mussali G. P., González V. A., Rojas E., Ostrosky S. P. 2004. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environ. Res.* **94**, 243-248.

- Frenkel K. 1992. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol. Ther.* **53**, 127-166.

- Gabrielson E. W., Yu X., Spannhake E. W. 1994. Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells. *Environ. Health Perspect.* **102**, 972-974.

- Gackowski D., Speina E., Zielinska M., Kowalewski J., Rozalski R., Siomek A., Paciorek T., Tudek B., Olinski R. 2003. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res.* **63**, 4899-4902.

- George J. 2003. Ascorbic acid concentrations in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Clin. Chimica Acta* **335**, 39-47.

- Gerhäuser C. L., Klimo K., Heiss E., Neumann I., Gamal-Eldeen A., Knauff J., Liu G., Sitthimonchai S., Norbert F. 2003. Mechanism-based *in vitro* screenig of potencial cancer chemoprevent agents. *Mutat. Res.* **523**, 163-172.

- Gill A. O., Delaquis P., Russo P., Holley R. A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. Food Microbiol.* **73**, 83-92.

- Gilliland F. D., Berhane K., Rappaport E. B., Thomas D. C., Avol E., Gauderman W. J., London S. F., Margolis H. G., McConnell R., Islam K. T., Petters J. M. 2001. The effects of

ambient air pollution on school absenteeism due to respiratory illnesses. *Epidemiology* **12**, 43-54.

•Green M. H., Lowe J. E. Waugh K. E., Aldridge K.E., Cole J., Arlett C. F. 1994. Effect of diet and Vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat. Res.* **316**, 91-102.

•Grey C. E. y Adlercretz P. 2003. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* **527**, 27-36.

•Guaiquil V. H., Vera J. C., Golde D. W. 2001. Mechanism of vitamine C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *Biol. Chem.* **276**, 40955-40961.

•Halvorsen B., Holte K., Myhstad M. C. W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S. F., Wold A. B., Haffner K., Baugerod H., Andersen L. F., Mosskaug J. O., Jacobs D. R., Blomhoff R. A. 2002. Systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* **132**, 461-471.

•Halliwell B. y Cross C. E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Cell* **10**, 5-12.

•Halliwell B. y Gutteridge J. M. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1-8.

•Hamelin C. 1985. Production of single- and double-strand breaks in plasmid DNA by ozone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **11**, 253-257.

•Haney J. T., Connor T. H., Li L. 1999. Detection of ozone-induced DNA single strand breaks in murine bronchoalveolar lavage cell acutely exposed *in vivo*. *Inhal. Toxicol.* **11**, 331-341.

•Hassett C., Mustafa M. G., Coulson W. F., Elashoff R. M. 1985. Murine lung carcinogenesis following exposure to ambient ozone concentrations. *J. Natl. Cancer Inst.* **75**, 771-777.

- Heffner J. E. y Repine J. E. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 531-554.

- Hellman B., Vaghef H., Boström B. 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **336**, 123-131.

- Hempel J., Pforte H., Raab B., Engst W., Bohm H., Jacobasch G. 1999. Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. *Nahrung* **43**, 201-204.

- Hennekens C. H., Buring J. E., Manson J. E., Stampfer M., Rosner B., Cook N. R., Belanger C., LaMotte F., Gaziano J. M., Ridker P. M., Willett W., Peto R. 1996. Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *J. Engl. J. Med.* **334**, 1145-1149.

- Heraul P. L. y Chung Y. S. 1984. Mutagenicity of ozone in different repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 472-477.

- Herbert R. A., Hailey J. R., Grumbein S., Chou B. J., Sills R. C., Haseman J. K., Goehl T., Miller R. A., Roycroft J. H., Boorman G. A. 1996. Two-year and lifetime toxicity and carcinogenicity studies of ozone in B6C3F1 mice. *Toxicol. Pathol.* **24**, 539-548.

- Hoek G., Schwartz J. D., Groot B., Eilers P. 1997. Effects of ambient particulate matter and ozone on daily mortality in Rotterdam, The Netherlands. *Arch. Environ. Health* **52**, 455-63.

- Hoogervorst E. M., de Vries A., Beems R. B., Van Ostrom T. M., Wester P. W., Vos J. G., Bruins W., Roodbergen M., Flemming R. C., Vijg J., Schooten F. J., Steeg H. V. 2003. Combined oral benzo [a] pirenene and inhalatory ozone exposure have no affect no lung tumor development in DNA repair-deficient Xpa mice. *Carcinogenesis* **24**, 613-619.

- Ito K., Inoue S., Hiraku Y., Kawanishi S. 2005. Mechanism of site-specific DNA damage induced by ozone. *Mutat. Res.* **585**, 60-70.

- Ishikawa T., Kondo K., Kitajima J. 2003. Water-Soluble Constituents of Coriander. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 32-39.

- Jagtap A. G., Shirke S. S., Phdke A. S. 2004. Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel diseases. *J. Ethnopharmacol.* **90**, 195-204.

- Jonhston C. S. y Cox S. K. 2001. Plasma-saturating intakes of vitamin C confer maximal antioxidant protection to plasma. *J. Amer. College Nutr.* **20**, 623-627.

- Jorge S. A. C., Menck C. F. M., Sies H., Osborne M. R., Phillips D. H., Sarasin A., Stary A. 2002. Mutagenic fingerprint of ozone in human cells. *DNA Repair.* **1**, 369-378.

- Kafoury R. M., Pryor W. A., Squadrito G. L., Salgo M. G., Zou X., Friedman M. 1999. Induction of inflammatory mediators in human airway epithelial cells by lipid ozonation products. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 1934-1942.

- Kirichenko A., Li L., Morandi M. T., Holian A. 1996. 4-Hydroxy-2-nonenal-Protein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 416-424.

- Kleberger S. R., Longphre M., Tankersley C. G. 1999. Mechanisms of response to ozone exposure: the role of mast cells in mice. *Res. Rep. Eff. Inst.* **1**, 31-36.

- Klestadt D., Lava-Gilly P., Falla J. 2002. Ozone-mediated cytotoxicity after short-term exposure and its relation to the production of cellular metabolites (NO, H₂O₂). *Cell Biol.Toxicol.* **1**, 259-269.

- Kodavanti U. P., Costa D. L., Richards J., Crissman K. M., Slade R., Hatch G. E. 1996. Antioxidants in bronchoalveolar lavage fluid cells isolated from ozone esposed normal and ascorbate-deficient guinea pigs. *Exp. Lung Res.* **22**, 435-448.

- Kotiaho T., Eberlin M. N., Vainiotalo P., Kostianen R. 2000. Electrospray mass and tandem mass spectrometry identification of ozone oxidation products of amino acids and small peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 525-535.

- Kreydiyyeh S. I., Usta J., Kaouk I., Al-Sadi R. 2001. The mechanism underlying the laxative properties of parsley extract. *Phytomedicine* **8**, 382-388.

- Kreydiyyeh S. y Usta J. 2002. Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *J. Ethnophar.* **79**, 353-357.

- Kubo I., Fujita K., Kubo A., Nihei K., Ogura T. 2004. Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3329-3332.

- Kunzemann J. y Herrmann K., 1977. Isolation and identification of flavon(ol)-O-glycosides in caraway (*Carum carvi* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), anise (*Pimpinella anisum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.) and of flavon-C-glycosides in anise. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **164**, 194-200.

- Lal A. A., Kumar T., Murthy P. B., Pillai, K. S. 2004. Hypolipidemic effect of *Coriandrum sativum* L. in triton-induced hyperlipidemic rats. *Indian J. Exp. Biol.* **42**, 909-912.

- Lapidot T., Walker D., Kanner J. 2002. Antioxidant-prooxidant effects of phenolics on pancreatic β -cells *in vitro*. *Agric. Food Chem.* **50**, 7220-7225.

- Last J. A., Gelzleichter T. R., Pinkerton K. E., Walker R. M., Witschi H. 1993. A new model of progressive pulmonary fibrosis in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 487-494.

- Lawrence W. B., Abbey D. E., Knutsen S. F. 1998. Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in Californis adults: results from the AHSMOG study. *Environ. Health Perspect.* **106**, 813-822.

- Lawrence J. M. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-370.

- Lee J. S., Afifi A. A., Mustafa M. G. 1989. Effects of short-term, single and combined exposure of rats to NO₂ and O₃ on lung tissue enzyme activities. *Inhal. Toxicol.* **1**, 21-35.

- Lee J. S., Afifi A. A., Mustafa M. G. 1990. Effect of short-term, single and combined exposure to low-level NO₂ and O₃ on lung tissue enzyme activities in rats. *J Toxicol. Environ. Health* **29**, 293-305.

- Lee J. G., Madden I. C., Hatch G. E., Bottei G., Reed W., Adler K. B., Devlin R. B. 1995. Ozone exposure *in vivo* induces increases in DNA single strand breaks in human and guinea pig lung cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: A498.

- Lee J. G., Madden M. C., Reed W., Adler K., Devlin R. 1996. The use of the single cell gel electrophoresis assay in detecting DNA single strand breaks in lung cells *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 195-204.

- Lee M., Kwon J., Chung M. 2003. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutat. Res.* **541**, 9-19.

- Leonard S. S., Cutter D., Ding M., Vallyathan V., Castranova V., Shi X. 2002. Antioxidant properties of fruit and vegetables juices: more to the story than ascorbic acid. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **32**, 193-200.

- Li L., Hamilton R. F., Kirichenko A., Holian A. 1996. 4-hydroxynonenal, induced cell death in murine alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139**, 135-143.

- Liu G. A. y Zheng R. L. 2002. Protection against damaged DNA in the single cell by polyphenols. *Pharmazie* **57**, 852-854.

- Liu M., Li X. Q., Weber C., Lee C. Y., Brown J., Liu R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2926-2930.

- Loft S. y Poulsen H. E. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* **74**, 297-312.

- Long N. C., Suh J., Morrou J. D., Schiestl R. H., Murthy G. G., Brain J. D. 2001. Ozone causes lipid peroxidation but little antioxidant depletion in exercising and nonexercising hamsters. *J. Appl. Physiol.* **91**, 1694-1700.

- López M. G., Sánchez-Mendoza I. R., Ochoa-Alejo N. 1999. Comparative study of volatile components and fatty acids of plants and *in vitro* cultures of parsley (*Petroselinum Crispum* (Mill) Nym ex Hill). *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3292-3296.

- Lutsenko E. A., Cárcamo J. M., Golde D. W. 2002. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *Biol. Chem.* **277**, 16895-16899.

- Mangels A. R., Holden J. M., Beecher G. R., Forman M. R., Lanza E. 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables an evaluation of analytic data. *J. Am. Diet. Assoc.* **93**, 284-296.

- May J. M., Qu Z., Neel D. R., Li X. 2003. Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1640**, 153-161.

- Medina I., Tombo I., Sauté-Gracia M. T., Bruce J. G., Frankel E. N. 2002. Effects of natural phenolic compounds on the antioxidant activity of lactoferrin in liposomes and oil in water emulsions. *Agric. Food Chem.* **50**, 2392-2399.

- Michiels C. y Remacle J. 1991. Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblasts. *Toxicology.* **66**, 225-234.

- Miller H. E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Amer. Coll. Nutr.* **19**, 312-319.

- Mironova A. N., Filippova G. I., Fedina N. I., Volkova Z. D., Kozlova V. L., Alymova T. B., Gorshkova E. I., Bykova S. F. 1991. Chemical and biological properties of coriander fatty oil. *Vopr. Pitan.* **1**, 59-62.

- Misharina T. A. 2001. Effect of conditions and duration of storage on composition of essential oil from coriander seeds. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **37**, 726-732.

- Misso N. L. y Thompson P. J. 2005. Oxidative stress and antioxidant deficiencies in asthma: potential modification by diet. *Redox Rep.* **10**, 247-55.

- Mudway I. S. y Kelly F. J. 1998. Modeling the interactions of ozone with pulmonary epithelial lining fluid antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148**, 91-100.

- Mustafa M. G. y Tierney D. F. 1978. Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.* **118**, 1061-1090.

- Mustafa M. G., Hassett C. M., Newell G. W., Schrauzer G. N. 1988. Pulmonary carcinogenic effects of ozone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **534**, 714-723.

- Mustafa M. G. 1990. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 245-265.

- Nielsen S. E., Young J. F., Daneshvar B., Lauridsen S. T., Knuthsen P., Sandstrom B., Dragsted L. O. 1999. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br. J. Nutr.* **81**, 447-455.

- Njus D., Wigle M., Kelley P. M., Kipp B. H., Schlegel H. B. 2001. Mechanism of ascorbic acid oxidation by cytochrome b₅₆₁. *Biochem.* **40**, 11905-11911.

- Noctor G. y Foyer C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249-279.

- Noroozi M., Angerson W. A., Lean M. E. J. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1210-1218.

- NTP, TR-440. 1999. Toxicology and carcinogenesis studies of ozone (CAS No. 10028-15-6) and ozone /NNK (CAS No. 10028-15-6/64091-91-4) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (inhalation studies). pp 1-5.

- Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* **122**, 86-94.

- Olive P. 2002. The comet assay, an overview of techniques. En: *Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*. Vol. **203**, 163-177. Humana Press Inc. Totowa, Nueva Yersey.

- Ohshima H., Tatemichi M., Sawa T. 2003. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **417**, 3-11.

- Östling O. y Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.

- Pacini S., Giovannelli L., Gulisano M., Peruzzi B., Polli G., Boddi V., Ruggiero M., Bozzo C., Stomeo F., Fenu G., Pezzatini S., Pitozzi V., Dolara P. 2003. Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy. *Environ. Mol. Mutagen.* **42**, 127-135.

- Parker M. L., Nig A., Smith A. C., Waldron K. W. 2000. Esterified phenolics of the cell walls of chufa (*Cyperus esculentus* L.) tubers and their role in texture. *Agric. Food Chem.* **48**, 6284-6291.

- Plopper C. G., Duan X., Buckpitt A. R., Pinkerton K. E. 1994. Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 124-131.

- Polzer G., Lind I., Mosbach M., Schmidt A., Seidel A. 1994. Combined influence of quartz dust, ozone and NO₂ on chemotactic mobility, release of chemotactic factors and other cytokines by macrophages *in vitro*. *Toxicol. Lett.* **72**, 307-315.

- Potter J. D. y Steinmets K. 1996. Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci. Publ.* **139**, 61-90.

- Pryor W. A. 1991. Can Vitamin E protect humans against the pathological effects of ozone in smog. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 702-722.

- Pryor W. A. y Church D. F. 1991. Aldehydes, hydrogen peroxide and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 41-46.

- Pryor W.A. 1992. How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 83-88.

- Pryor W. A. 1994. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 451-465.

- Pryor W. A., Squadrito G. L., Friedman M. 1995. A new mechanism for the toxicity of ozone. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 287-293.

- Qi W., Russel J. R., Dun-Xian T., Joaquin J. G., Lucien C. M., Malgorzata K. 2000. Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ. Health Perspect.* **108**, 399-402.

- Ramadan M. F., Kroh L. W., Mörsel J. T. 2003. Radical Scavenging Activity of Black Cumin (*Nigella sativa* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) Crude Seed Oils and Oil Fractions. *J. Agrics. Food Chem.* **51**, 6961-6969.

- Rao A. V. 2002. Lycopene, tomatoes and the prevention of coronary heart disease. *Exp. Biol. Med.* **227**, 908-913.

- Rapola J. M., Virtamo J., Ripatti S., Huttunen J. K., Albanes D., Taylor P. R., Heinonen O. P. 1997. Randomised trial of α -tocopherol and β -carotene on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* **349**, 1715-1720.

- Rivas-Arancibia S., Vázquez S. R., González K.D., Schneider R. S., Lechuga G. A. 1998. Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutasa. *Environ. Res.* **76**, 33-39.

- Roberts W. G. y Gordon M. H. 2003. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by liposome assay. *Agric. Food Chem.* **51**, 1486-1493.

- Rojas E., Valverde M., López M. C., Naufal I., Sánchez I., Bizarro P., López I., Fortoul T. I., Ostrosky W. P. 2000. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **468**, 11-17.

- Romieu I., Meneses F., Ruiz S., Sienna J., Huerta J., Etzel R., White M., Hernández M. 1996. Effects of air pollution on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico City. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 300-307.

- Romieu I., Meneses F., Ramirez M., Ruiz S., Perez Padilla R., Sienna J., Gerber M., Grievink L., Dekker R., Walda I., Brunekreef B. 1998. Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 226-232.

- Roser S., Pool-Zobel B. L., Rechkemmer G. 2001. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat. Res.* **497**, 169-175.

- Rössig L., Hoffmann B., Hugel B., Mallat Z., Haase A., Freyssinet J. M., Tedgui A., Aicher A., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2001. Vitamin C Inhibits Endothelial Cell Apoptosis in Congestive Heart Failure. *Circulation* **104**, 2182-2187.

- Sánchez A. J. R. 1999. Importancia de la evaluación de la calidad del aire por ozono en la zona suroeste de la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Satyanarayana S., Sushruta K., Sarma G. S., Srinivas N., Subba G. V. 2003. Antioxidant activity of the aqueous extracts of spicy food additives—evaluation and comparison with ascorbic acid in *in-vitro* systems. *J. Herb. Pharmacother.* **4**, 1-10.

- Semarnat. 2002. Instituto Nacional de Ecología, Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana, Regional y Global, México.

- Sills R. C., Hong H. L., Greenwell A., Herbert R. A., Boorman G. A., Devereux T. R. 1995. Increased frequency of K-ras mutations in lung neoplasms from female B6C3F1 mice exposed to ozone for 24 or 30 months. *Carcinogenesis* **16**, 1623-1628.

- Sinatra S. T. y DeMarco J. 1995. Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn. Med.* **59**, 579-588.

- Sierens J., Hartley J., Campbell M., Leathem A., Woodside J. 2001. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat. Res.* **485**, 169-176.

- Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **175**, 184-191.

- Solomidou M. y Muzykantov V. R. 2006. Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treat. Respir. Med.* **5**, 47-78.

- Song J. H., Shin S. H., Wang W., Roos G. M. 2001. Involvement of oxidative stress in ascorbate-induced proapoptotic death of PC12 cells. *Exp. Neurol.* **169**, 425-437.

- Southon S. 2001. Increased fruit and vegetable consumption: potencial health benefits. *Nutr. Metab. Cardiovasc.* **11**, 78-81.

- Speit G. y Hartmann A. 2002. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. En: *Methods in molecular biology. DNA repair protocols: eukariotic systems*. Vol. **113**, 203-212. Humana Press Inc. Totowa, Nueva Jersey.

- Squadrito G. L., Salgo M. G., Fronczeck F. R., Pryor W. A. 2000. Synthesis the inflammatory signal transduction species formed during ozonation and/or peroxidation of tissue lipids. *Methods Enzymol.* **319**, 570-582.

- Sun J., Chu Y., Wu X., Rui H. L. 2002. Antioxidant and antiproliferative of common fruits. *Agric. Food Chem.* **50**, 77449-77454.

- Surh Y. J., Park K. K., Shlyankevich M. 1995. Inhibitory effects of chlorophyllin on chemically induced mutagenesis and carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **768**, 246-249.

- Steinberg J. J., Gleeson J. L., Gil D. 1990. The pathobiology of ozone-induced damage. *Arch. Environ. Health* **45**, 80-87 .

- Suzy A., Comhair A., Erzurum S. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, 246-255.

- Szweda L. I., Uchida K., Tsai L., Stadtmant E. R. 1993. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biol. Chem.* **268**, 3342-3347.

- Teixeira S., Siquet C., Alves C., Boal I., Marques M. P., Borges F., Lima J. L, Reis S. 2005. Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1099-1108.

Thiele J. J., Traber M. G., Tsang K., Cross C. E., Packer L. 1997. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 385-391.

•Tice R. R., Andrews P. W., Singh N. P. 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci.* **53**, 291-301.

•Tice R., Aguerri E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J., Sasaki Y. 2000. Single cell gel/ comet assay: Guidelines for *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.

•Uchibayashi M. 2001. The coriander story. *Yakushigaku Zasshi* **36**, 56-57.

•Uhlson C., Harrison K., Allen C. B., Ahmad S., White C. W., Murphy R. C. 2002. Oxidized phospholipids derived from ozone-treated lung surfactant extract reduce macrophage and epithelial cell viability. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 896-906.

•U.S. EPA 1997. Responses to significant comments on the 1996 proposed rule on the National Ambient Air Quality Standards for Ozone, office of air and radiation docket.

•U.S. EPA 2004. Review of the California Ambient Air Quality Standard For Ozone. Appendix A: Review of the animal toxicological studies on the health effects of ozone.

•Valverde M., López M. C., López I., Sánchez I., Fortoul T. I., Ostrosky W. P., Rojas E. 1997. DNA Damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**, 147-152.

•Vallyatan V. y Shi X. 1997. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ. Health Perspect.* **105**, 165-177.

•Van der Vliet A., O'Neil C., Eiserich J., Cross C. 1995. Oxidative damage to extracellular fluids by ozone and possible protective effects of thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 43-50.

- VanWinkle W. B., Snuggs M., Buja L. M. 1994. Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **28**, 119-134.

- Verlangieri A. J., Kapeghian J. C., Eldean S., Bush M. 1985. Fruit and vegetables consumption and cardiovascular mortality. *Med. Hypotheses* **16**, 7-15.

- Victorin R. 1992. Review of the genotoxicity of ozone. *Mutat. Res.* **277**, 221-238.

- Villalobos-Pietrini R., Blanco S., Gómez-Arroyo S. 1995. Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmos. Environ.* **29**, 517-524.

- Vinson J. A., Su X. H., Zubik L., Bose P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in food: fruits. *Agric. Food Chem.* **49**, 5315-5321.

- Wagner E., Rayburn A., Anderson D., Plena M. 1998. Analysis of mutagens with single cell gel electrophoresis, flow cytometry, and forward mutation assays in an isolated clone of Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **32**, 360-368.

- Wiester M. J., Watkinson W. P., Costa D. L., Crissman K. M., Richards J. H., Winsett D. W., Highfill J. W. 1996. Ozone toxicity in the rat – III. Effects of changes in ambient temperature on pulmonary parameters. *J. Appl. Physiol.* **81**, 1691-1700.

- Wilson D. W., Plopper C. G., Dungworth D. L. 1984. The response of macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury. *Am. J. Pathol.* **116**, 193-206.

- Witenberg B., Kalir H. H., Raviv Z., Kletter Y., Kravtsov V., Fabian I. 1999. Inhibition by ascorbic acid of apoptosis induced by oxidative stress in HL-60 myeloid leukemia cells. *Biochem. Pharm.* **57**, 823-832.

- Yamauchi T., Kawai Y., Ueda T. 2002. Alkylator-induced DNA excision repair in human leukemia CCRF-CEM cells *in vitro*, measured using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Int. J. Hematol.* **76**, 328-332.
- Yarnell E. 2002. Botanical medicines for the urinary tract. *World J. Urol.* **20**, 285-293.
- Yu M., Zheng X., Witschi H., Pinkerton K. E. 2002. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicol. Sci.* **68**, 488-497.

TABLA 1. Evaluación del daño al ADN de macrófagos alveolares de cobayos expuestos a diferentes concentraciones de ozono ^a

Concentración de ozono (ppm)	Frecuencia de células con daño al ADN $\bar{X} \pm EE$	Longitud de la cauda (μm) $\bar{X} \pm EE$	% de Viabilidad $\bar{X} \pm EE$	Niveles de células con daño al ADN (4 niveles, μm) ^b				
				0	1	2	3	4
Testigo aire	10 \pm 1.01	23.25 \pm 1.43	98.0 \pm 1.72	40	1	5	3	1
0.2	14 \pm 2.02	43.32* \pm 3.77	96.0 \pm 0.91	36	0	5	8	1
0.5	16 \pm 1.76	55.15* \pm 3.66	98.0 \pm 2.01	34	1	9	5	1
1.0	25 \pm 1.32	80.15* \pm 3.30	97.0 \pm 1.36	25	5	14	6	0
2.0	42 \pm 1.93	136.22* \pm 11.19	98.0 \pm 1.47	8	3	17	13	9

^a Promedio de 4 experimentos n = 50 células en cada uno

^b Niveles de daño definidos de acuerdo al tamaño de la cauda designados desde 0 = sin daño; 1= 1-50 μm ; 2= 51-100 μm ; 3= 101-150 μm ; 4 = 151-200 μm (máximo daño) en 50 células consecutivas (medidas arbitrarias).

* Diferencias significativas para F=57.143 p<0.01

TABLA 2. Evaluación de los efectos antioxidantes de los extractos de cilantro y perejil así como vitamina C, en macrófagos alveolares de cobayos expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de ozono por 3 h en 1 día ^a

Concentración de ozono (ppm)	Frecuencia de células con daño al ADN $\bar{X} \pm EE$	Longitud de la cauda (μm) $\bar{X} \pm EE$	Niveles de células con daño (4 niveles, μm) ^b				
			0	1	2	3	4
0	8 ± 1.00	18.58 ± 2.15	44	6	0	0	0
Cilantro							
0	5 ± 0.87	21.57 ± 1.56	45	5	0	0	0
1.0	6 ± 1.47	21.40 ± 2.66	44	6	0	0	0
2.0	4 ± 0.85	18.22 ± 2.77	46	4	0	0	0
Perejil							
0	4 ± 1.08	21.7 ± 5.02	46	4	0	0	0
1.0	5 ± 1.55	20.10 ± 2.87	45	4	1	0	0
2.0	5 ± 1.19	24.88 ± 3.78	45	4	1	0	0
Vit C							
0	3 ± 0.95	15.28 ± 3.35	47	3	0	0	0
1.0	4 ± 1.08	18.02 ± 3.80	46	4	0	0	0
2.0	6 ± 1.04	21.02 ± 2.33	44	6	0	0	0

^a Promedio de cuatro experimentos con administración oral de 1.25 ml/kg de peso corporal de los extractos crudos de cilantro y perejil, así como 2.5 mg/kg de peso corporal de vitamina C durante 15 días n = 50 células en cada experimento

^b Niveles de daño definidos de acuerdo al tamaño de la cauda designados desde 0 = sin daño; 1= 1-50 μm ; 2= 51-100 μm ; 3= 101-150 μm ; 4 = 151-200 μm (máximo daño) en 50 células consecutivas (son medidas arbitrarias).

TABLA 3. Evaluación de los efectos antioxidantes de los extractos de cilantro y perejil y de la vitamina C, en macrófagos alveolares de cobayos expuestos a 1.0 y 2.0 ppm de ozono por 3 h en 1 día ^a

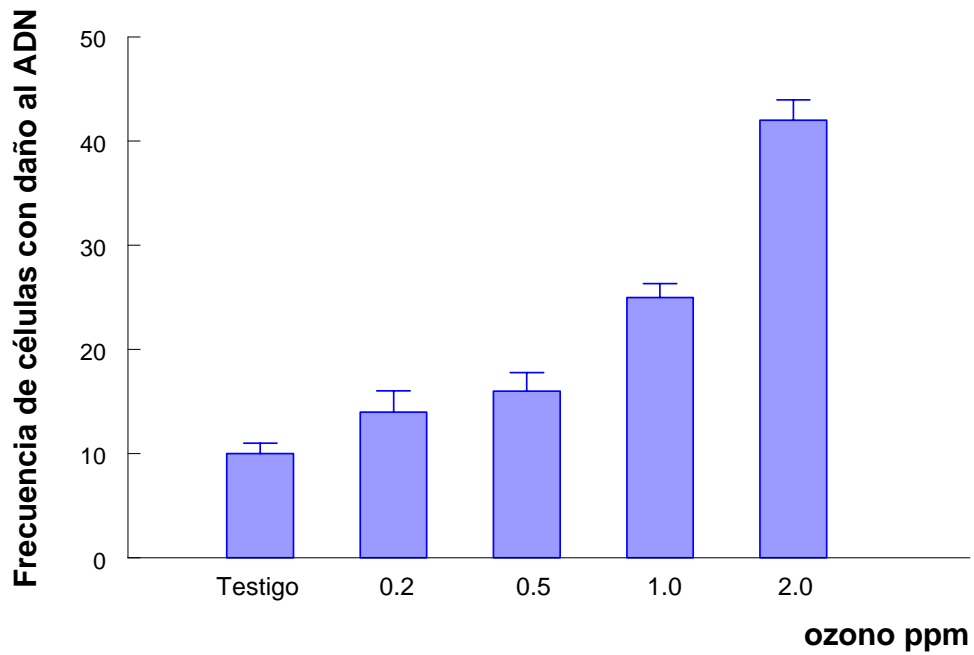
Concentración de ozono (ppm)	Frecuencia de células con daño al ADN $\bar{X} \pm EE$	Longitud de la cauda (μm) $\bar{X} \pm EE$	Niveles de células con daño ^b (4 niveles, μm)				
			0	1	2	3	4
1.0	25* \pm 1.32	80.15* \pm 3.30	25	5	14	6	0
2.0	42* \pm 1.93	136.22* \pm 11.19	8	3	17	13	9
Cilantro							
1.0	6 \pm 1.47	21.40 \pm 2.66	44	6	0	0	0
2.0	4 \pm 0.85	18.22 \pm 2.77	46	4	0	0	0
Perejil							
1.0	5 \pm 1.55	20.10 \pm 2.87	45	4	1	0	0
2.0	5 \pm 1.19	24.88 \pm 3.78	45	4	1	0	0
Vit C							
1.0	4 \pm 1.08	18.02 \pm 3.80	46	4	0	0	0
2.0	6 \pm 1.04	21.02 \pm 2.33	44	6	0	0	0

^a Promedio de cuatro experimentos con administración oral de 1.25 ml/kg de peso corporal de los extractos crudos de cilantro y perejil, así como 2.5 mg/kg de peso corporal de vitamina C durante 15 días n = 50 células en cada experimento

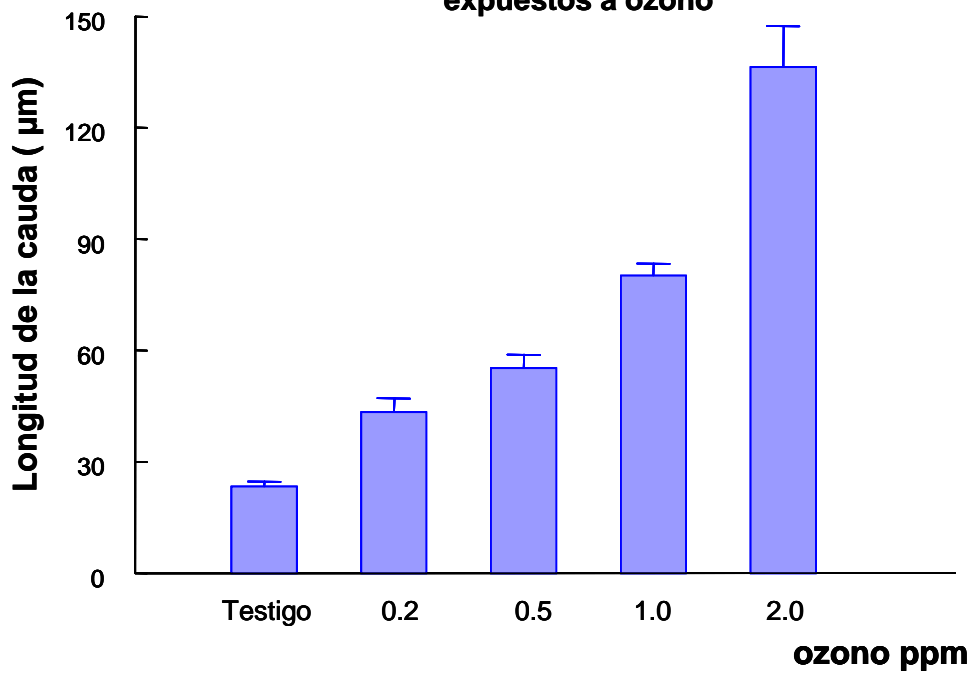
^b Niveles de daño definidos de acuerdo al tamaño de la cauda designados desde 0 = sin daño; 1= 1-50 μm ; 2= 51-100 μm ; 3= 101-150 μm ; 4 = 151-200 μm (máximo daño) en 50 células consecutivas (son medidas arbitrarias).

* Diferencias significativas para F=77.52 p<0.001

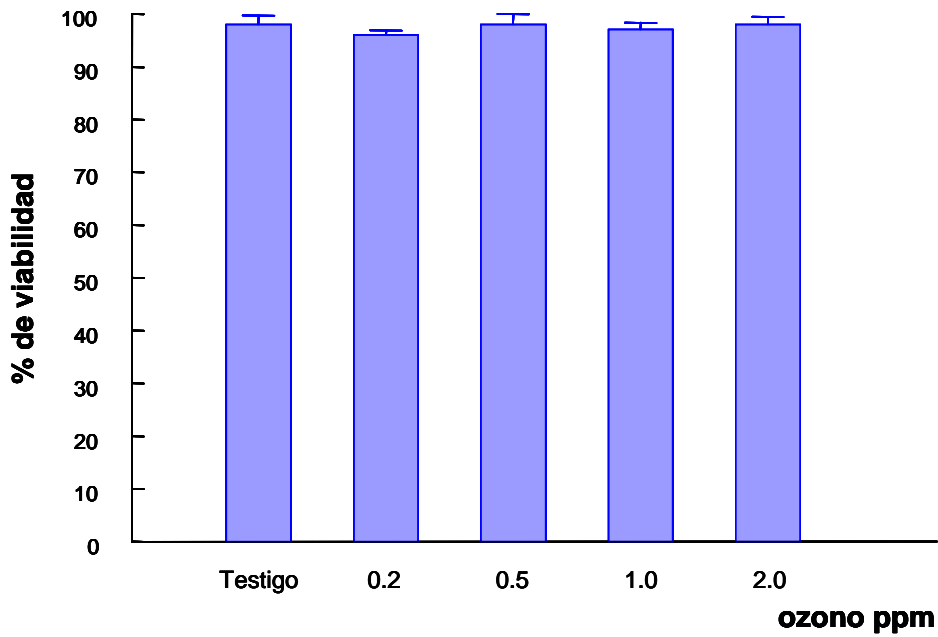
Gráfica 1. Frecuencia promedio de macrófagos alveolares con daño al ADN de cobayos expuestos a ozono



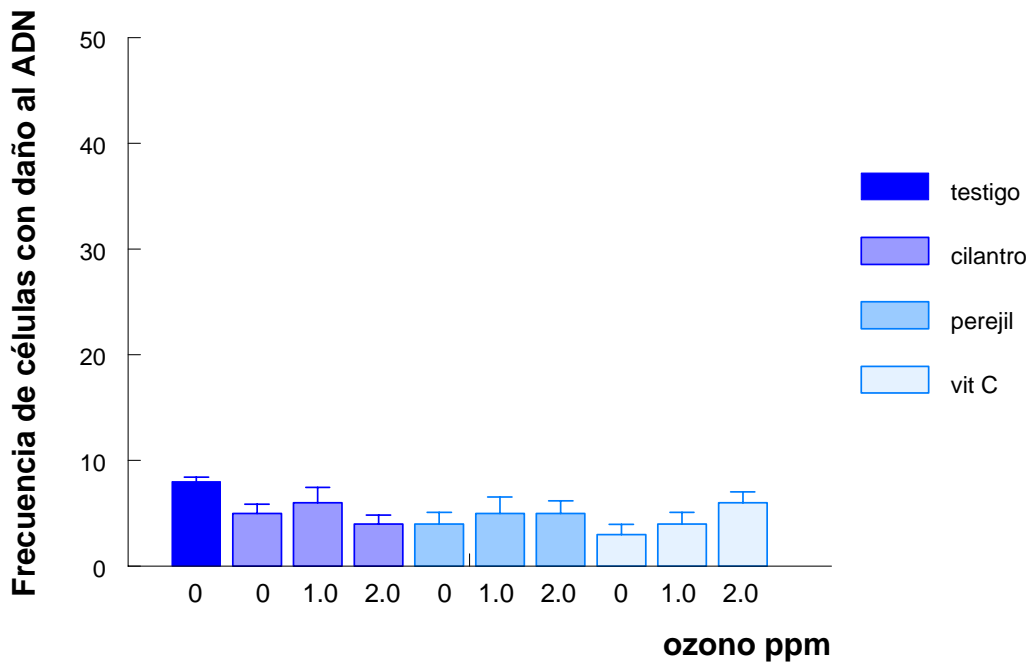
Gráfica 2. Longitud promedio de la cauda del cometa de macrófagos alveolares de cobayos expuestos a ozono



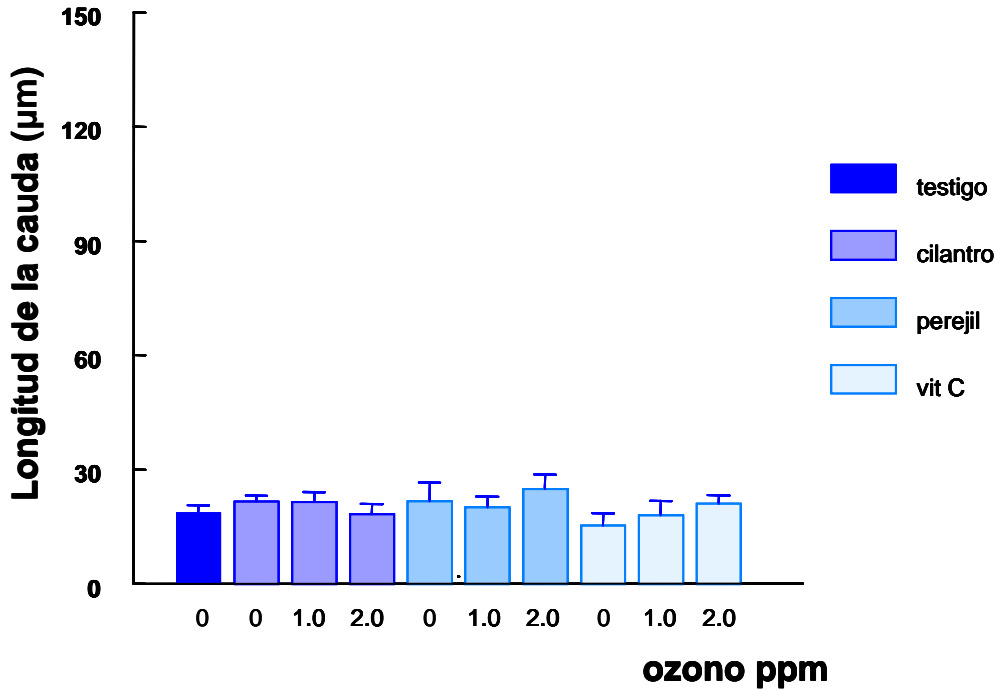
Gráfica 3. Viabilidad de macrófagos alveolares de cobayos expuestos a ozono



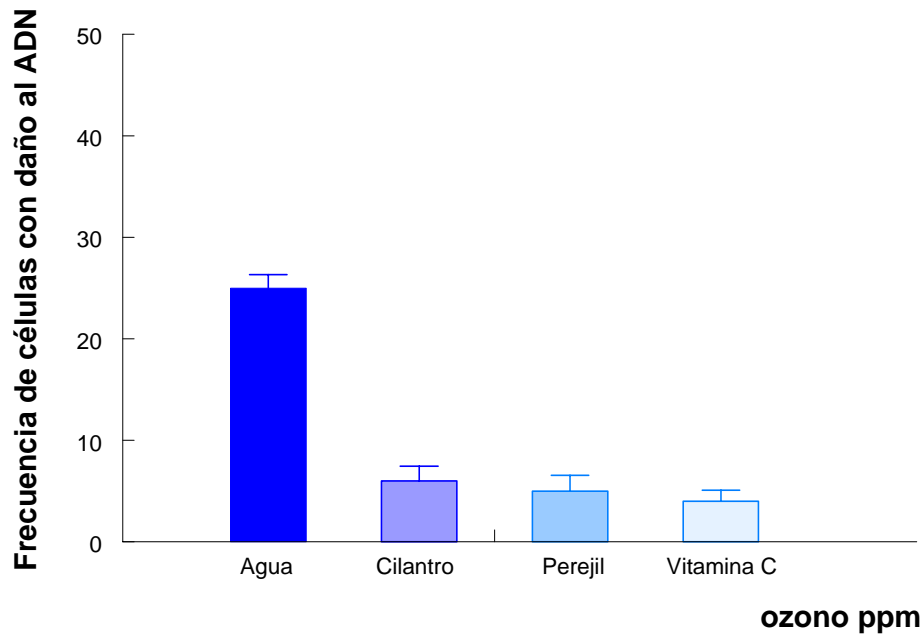
Gráfica 4. Efecto antígeno tóxico de los extractos de cilantro y perejil así como de la vitamina C en la frecuencia de macrófagos alveolares con daño al ADN de cobayos expuestos a ozono



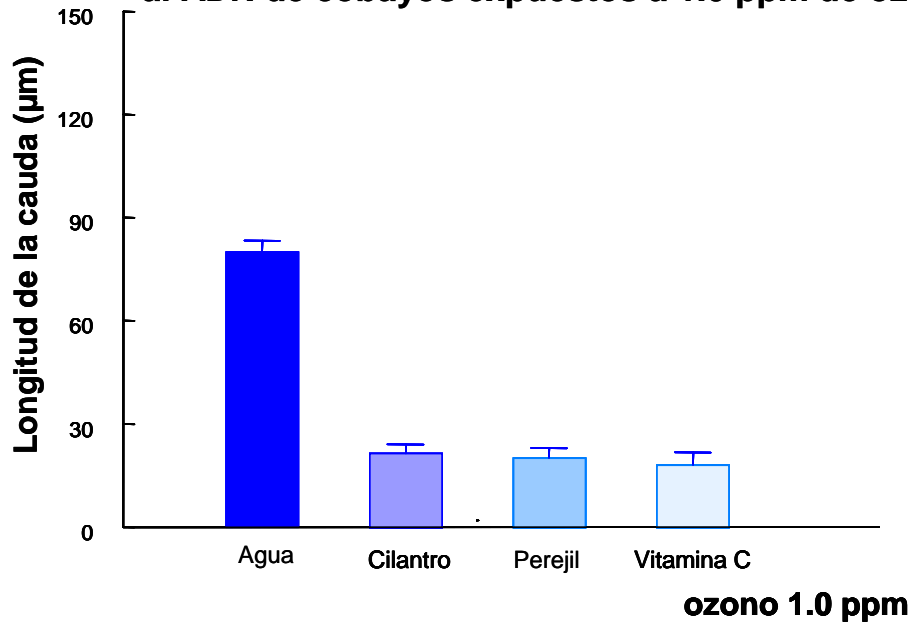
Gráfica 5. Efectoantigenotóxico de los extractos de cilantro y perejil así como de la vitamina C en la longitud de la cauda de macrófagos alveolares de cobayos expuestos a ozono



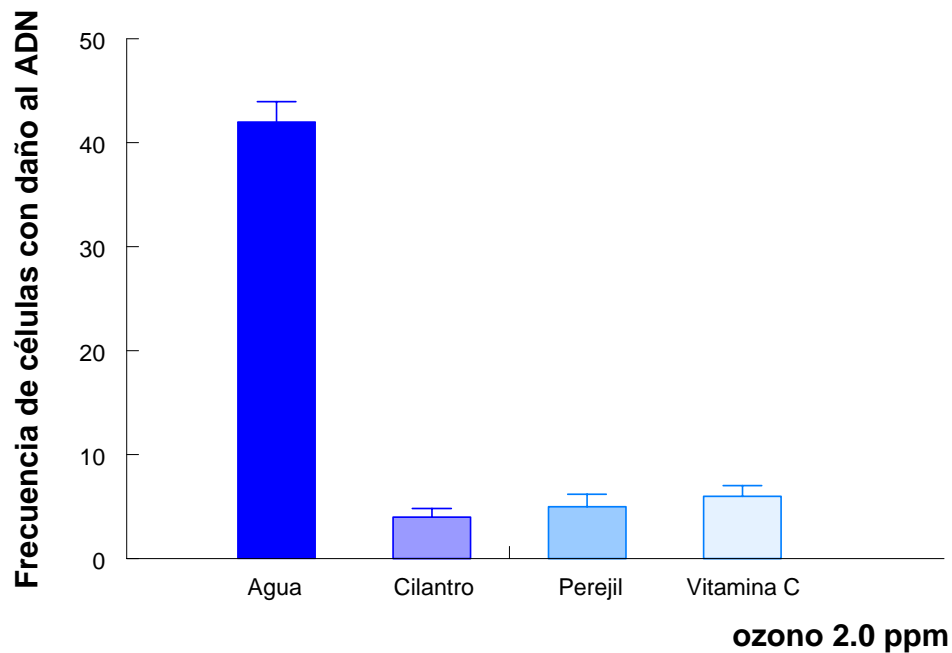
Gráfica 6. Efectos genotóxico y antigenotóxico en la frecuencia de macrófagos alveolares con daño al ADN de cobayos expuestos a 1.0 ppm de ozono



Gráfica 7. Efectos genotóxico y antigenotóxico en la longitud de la cauda de macrófagos alveolares con daño al ADN de cobayos expuestos a 1.0 ppm de ozono



Gráfica 8. Efectos genotóxico y antigenotóxico en la frecuencia de macrófagos alveolares con daño al ADN de cobayos expuestos a 1.0 ppm de ozono



Gráfica 9. Efectos genotóxico y antigenotóxico en la longitud de la cauda de macrófagos alveolares con daño al ADN de cobayos expuestos a 2.0 ppm de ozono

