



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“VARIACIONES ESTACIONALES EN LOS NIVELES DE ADUCTOS PAH-DNA Y ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE HABITANTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO, EN RELACIÓN CON LAS VARIANTES ALÉLICAS DE RIESGO CYP1A1\*2A, CYP1A1\*2C, CYP1A1\*4 CYP1B1\*3, GSTT1\*0 Y GSTM1\*0”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**WENDY ARGELIA GARCÍA SUASTEGUI**

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**  
**MÉXICO D.F.**

**FEBRERO 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

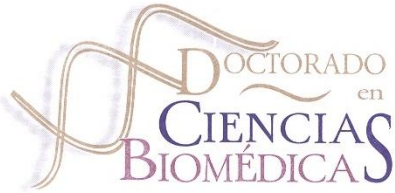


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS


PDCB/grad/065/Jur/2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR, UNAM  
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEP el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 271<sup>a</sup> del 17 de noviembre del 2010, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **WENDY ARGELIA GARCÍA SUASTEGUI**, con número de cuenta 93040114, con la tesis titulada "**VARIACIONES ESTACIONALES EN LOS NIVELES DE ADUCTOS PAH-DNA Y ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE HABITANTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO, EN RELACIÓN CON LAS VARIANTES ALÉLICAS DE RIESGO CYP1A1\*2a, CYP1A1\*2c, CYP1A1\*4 CYP1B1\*3, GSTT1\*0 Y GSTM1\*0**", dirigida por la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Presidente: Dra. Susana Helena Kofman Epstein  
Vocal: Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes  
Vocal: Dra. Beatriz Fuentes Pardo  
Vocal: Dra. Valeria Souza Saldívar  
Secretario: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Atentamente  
*"Por mi raza hablará el espíritu"*  
Ciudad Universitaria a 18 de noviembre del 2010

  
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA  
RESPONSABLE  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS

  
DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES  
COORDINADOR DEL PROGRAMA

c.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM  
Tutora Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
Coordinación de PDCB

FMM/RCC/aap

Teléfonos: 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: [pdcb@servidor.unam.mx](mailto:pdcb@servidor.unam.mx)

## **APOYO RECIBIDO**

*Para la realización de este proyecto contamos con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT No. 46341-M Dentro del proyecto: “Estimación de la dosis interna de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en habitantes de la ciudad de México y su relación con los polimorfismos metabólicos del CYP1A1\*2A, CYP1A1\*C y GSTM1\*0”.*

*Así mismo, durante mis estudios de posgrado conté con una beca otorgada por el CONACyT No. de Registro de Becario 182429*

### **Agradecimientos:**

A la UNAM, mi alma mater, por permitirme ser parte de tu espíritu, entre tus muros he pasado gloriosos momentos.

A mi tutora la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, gracias por los últimos diez años, por su apoyo incondicional en los ámbitos académico y personal, por dejar en mis manos importantes decisiones, por darme las mejores enseñanzas, por su ética y valor, por su talento creativo que hizo posible esta investigación. I found an incredible human being full of love and patience; your teachings will be with me for the rest of my life, thanks.

To PhD. Mimi Poirier, who had kindly received me in her laboratory and had shared with me her knowledge.

A mi comité tutorial; los doctores Regina Montero y Luis Enrique Eguiarte, a quienes interrumpí y cuestioné varias veces a lo largo de esta investigación y de quien siempre recibí la mejor disposición para resolver mis dudas y la solución a un gran número de dificultades. Gracias por haber aceptado ser parte de la dirección de este proyecto, sus enseñanzas quedaron plasmadas en esta tesis y en mi memoria.

A mi jurado, los doctores Susana Kofman, Tere Fortoul, Beatriz Fuentes, Valeria Souza y Javier Espinosa por el apoyo que tan amablemente me brindaron y por sus valiosos comentarios que mejoraron este trabajo.

Al posgrado en ciencias biomédicas, a la dirección general de estudios de posgrado DGEP y al CONACYT por los apoyos que me otorgaron para realizar este proyecto.

Al Dr. Pavel Petrosyan, por su asesoría técnica en la realización de los experimentos.

A María de la Luz Velasco Hernández por su asesoría en la preparación de las metafases.

A Rosa Campos Sánchez y Laura Asenjo García, por la recopilación y análisis de emisiones de contaminantes ambientales en las bases de datos de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico.

A la Dra. Julieta Rubio por su amistad, por ser un gran ejemplo de integridad y fortaleza, por sus consejos, balance, objetividad y por su forma de ser.

A todos los voluntarios habitantes de la ZMVM que amablemente accedieron a participar en el estudio

**Gracias con todo mi corazón a los seres que han compartido esta aventura conmigo...**

A mis padres por ser los cimientos de esta construcción... A mi **madre**, por tu amor, por ser mi gran ejemplo, por guiarme en el camino, por cuidarme y apoyarme siempre. ¡Ya casi llegamos! A mi **padre**, por creer en mí, por empujarme a seguir, por ayudarme a crecer y dejarme volar ¡para siempre mi reconocimiento y cariño!

A mi hermana **Minerva**, por toda tu energía y luz ¡Sabes lo mucho que significas para mí!

A mis hermosas abuelitas **Amparo** y **Margarita** por hacer siempre por mi mucho más de lo merecido, llenarme con su cariño, y por su invaluable ejemplo para superar todas las adversidades. Siempre las tengo presentes.

A mis **abuelitos** Enrique y Samuel y a mis **ti@s** por todo el cariño que he recibido en cada momento de mi vida: Sara, Sandra M., Rosa, Martín, Maru, Alejandra, Ivonne, Paty A., Vero, Paty G., Luis, Juan, Sandra, Ernesto, Clara, Sergio, Lupe F, Samuel, Adela, Jaime, Gracia, Gloria y Lupe M.

A **Karol** y **Alicia**, por su talento, entusiasmo, compromiso y largas horas de trabajo, sin ustedes esto no sería posible.

A la familia **Contreras Bautista**, por su cariño y su cálida hospitalidad, en especial a **A Gonzalo**, cómplice de mi locura, por tu amor y paciencia y por hacerme entender de lo que soy capaz. *Merci d'être avec moi à Baltimore, pour la vie partagée, le rock, l'air conditionné, les chats et grenouilles, le vin rouge et les concerts.* Si es verdad que tengo una alma gemela, **tu** eres lo más cercano a ese rumor...

To my biomédicas **school** family: Luciana, Ana Lilia, Carla G, Karla S, Pavel, César, Nydia-Berenice, Rebeca, Celeste, Miriam, Danny, Alan, Luca, Karla, Lucio, Sra delfina, Luis, Victor, Javier, Sandra, Jorge, Giovana, Karina, Ricardo, Paulina, Martín, Pablo, por las experiencias compartidas en los últimos años, por su empuje y entusiasmo para comprender los misterios de la naturaleza.

A mis **prim@s**: Elizabeth, Jessica, Omar, Jennifer, Jonathan, Mauro, Belén, Martín, Mónica, Iván, Jessie, Karen, Katia, Karla, Karina, Cintia, Josué, Gabriela, Yazmín, Miguel, Saúl, Maryfer, Nancy, Oscar, Vanessa y Monse, por su amor incondicional, por su mirada, por enseñarme a jugar y ayudarme a crecer.

To my cele **friends** Beto, Laurice and Ammin, because of your push for excellence, love affair with langues, incredible strength and inspirational lives.

A mis **amigos** de la H Facultad de ciencias: Emilia, Pedro, Carmen, Marypaz, Tzutzy, Rodrigo, Paty, Ericka, jamás olvidaré los momentos compartidos ni las interminables pláticas banqueteras y de café.

Y a **todos** los que han contribuido con un ratito de su tiempo para convertirme en lo que soy.

**El presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos:**

XXVII Congreso Nacional de Bioquímica. Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guanajuato, Guanajuato, México 12 al 17 de Noviembre **2006**, *Polimorfismos de las enzimas metabólicas CYP 1A1 y GST en población mexicana que confieren susceptibilidad para desarrollar aductos DNA-PAH y aberraciones cromosómicas.*

XII Congreso Dr. Lino Díaz de León. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM **2006** *Polimorfismos de las enzimas metabólicas CYP1A1 y GST en población mexicana que confieren susceptibilidad para formar aductos DNA-PAHs y aberraciones cromosómicas.*

VII Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental y I Congreso Colombiano de Mutagénesis y Carcinogénesis, Cartagena, Colombia 28 al 31 de Agosto **2007**. *Niveles de aductos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en adultos jóvenes habitantes de la ciudad de México y su relación con aberraciones cromosómicas y con la presencia de variantes polimórficas de riesgo*

XIV Congreso Dr. Lino Díaz de León. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM **2008** *Asociación entre los polimorfismos genéticos de las enzimas metabólicas CYP1A1\*2A y \*2C, GSTT1\*0, GSTM1\*0, con la susceptibilidad de formación de aductos DNA-PAHs y aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en habitantes de la ZMVM.”*

XXVII Congreso Nacional de Bioquímica. Sociedad Mexicana de Bioquímica, Mérida, Yucatán, México 16 al 21 de Noviembre **2008**. *Niveles de aductos de PAH-DNA en adultos jóvenes habitantes de la ciudad de México y su relación con aberraciones cromosómicas y con la presencia de variantes alélicas de riesgo*

48th Annual Meeting Society of Toxicology, Baltimore, Maryland; USA. March 15–19 **2009**. *Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-DNA adducts, chromosomal aberrations and CYP1A1 and GSTM1 risk variants in peripheral blood lymphocytes from young adults living in Mexico City.*

XV Congreso Dr. Lino Díaz de León. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM **2009** *Niveles de aductos PAH-DNA y aberraciones cromosómicas en células blancas de sangre en habitantes de la ciudad de México y su relación con variantes alélicas de enzimas de fase I y II.”*

**Publicación:**

García-Suástegui WA, Huerta-Chagoya A, Carrasco-Colín KL, Pratt MM, John K, Petrosyan P, Rubio J, Poirier MC, Gonshebbatt ME. (2010). **Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City.** Mutagenesis. 2010.

## Contenido

<b>Abstract</b>	2
Resumen	3
<b>1 Introducción</b>	4
1.1 Exposición a contaminación aérea en la ZMVM	4
1.2 Características fisiográficas de la ZMVM	7
1.3 Emisiones y distribución de contaminantes en la ZMVM	9
1.4 Exposición ambiental a PAHs	13
1.5 Activación metabólica de PAHs	14
1.6 Marcadores de exposición a contaminación ambiental	17
<b>2 Planteamiento del problema</b>	19
<b>3 Hipótesis</b>	19
<b>4 Objetivo</b>	19
<b>5 Materiales y métodos</b>	20
5.1 Monitoreo ambiental	20
5.2 Toma de muestras	20
5.3 Determinación de cotinina en orina	21
5.4 Extracción de DNA de leucocitos	21
5.5 Detección de aductos PAH-DNA	22
5.5.1 Modificación in vitro de DNA de timo de ternero con [1, 3- <sup>3</sup> H]BPDE	22
5.5.2 Cultivo y tratamientos de línea celular Hep G2 (para controles positivo y negativo)	23
5.5.3 Inmunoensayo quimioluminiscente	23
5.6 Cultivos de linfocitos y análisis de aberraciones cromosómicas	25
5.7 Selección de polimorfismos y genotipificación	26
5.8 Análisis estadístico	26
<b>6 Resultados</b>	28
6.1 Características demográficas de la muestra	28
6.2 Partículas suspendidas y calidad del aire	29
6.3 Niveles de aductos PAH-DNA en época seca y época de lluvias	31
6.4 Porcentaje de aberraciones cromosómicas	38
6.5 Frecuencias alélicas de las enzimas metabolizadoras de PAHs	39
6.6 Análisis del equilibrio genético poblacional mediante una prueba de $X^2$	41
<b>7 Discusión</b>	43
<b>8 Referencias bibliográficas</b>	48



## ***Abstract***

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous components of polluted air. The Mexico City Metropolitan Area (MCMA), one of the most densely populated areas in the world, is 2240 m above sea level. At this altitude, less oxygen is available, making combustion less efficient and therefore producing more PAH pollutants. According to the Automatic Monitoring Network in Mexico City (RAMA, for its Spanish initials; [http://148.243.232.103/imecaweb/base\\_datos.htm](http://148.243.232.103/imecaweb/base_datos.htm)), which performs environmental monitoring, the critical air pollutants in Mexico City are ozone and particulate matter (PM). PM emissions increase during the dry season (winter-spring) and decrease during the rainy season (summer-autumn). The bioactivation of some PAHs produces reactive metabolites that bind to DNA, and the presence of elevated levels of PAH-DNA adducts in tissues such as blood lymphocytes represents an elevated risk for the development of cancer. We have compared the levels of PAH-DNA adducts and the percentage of cells with chromosomal aberrations (CWA) using a matched set of peripheral blood lymphocytes obtained on two separate occasions from young non-smoking inhabitants of the MCMA (n=92) during the 2006 dry season and the following rainy season. PAH-DNA adducts were analyzed using the r7, t8-dihydroxy-t-9, 10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene (BPDE)-DNA chemiluminescence immunoassay (CIA). The percentages of CWA were determined in cultured lymphocytes from the same individuals. Both DNA adduct levels and chromosomal aberrations were tested for correlation with lifestyle and the polymorphisms of cytochromes P450 *CYP1A1* and *CYP1B1* as well as glutathione-S-transferases *GSTM1* and *GSTT1*. The levels of PAH-DNA adducts were significantly higher ( $p < 0.001$ ) in the dry season ( $10.66 \pm 3.05$  per  $10^9$  nucleotides, n=92) than during the rainy season ( $9.50 \pm 2.85$  per  $10^9$  nucleotides, n=92) and correlated with the seasonal levels of  $PM_{10}$ . The percentage of CWA was not seasonally related, however significant associations were observed between the number of risk alleles and PAH-DNA adduct levels in the dry ( $R=0.298$ ,  $p=0.048$ ) and wet ( $R=0.473$ ,  $p=0.001$ ) seasons.

## ***Resumen***

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son contaminantes ambientales ubicuos que se generan por la combustión incompleta de materia orgánica y se presentan en mayor concentración en ambientes urbanos. La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), una de las metrópolis con mayor densidad de población, se ubica a una altitud de 2240msnm; a esta altitud la concentración de oxígeno en la atmósfera es 23% menor que al nivel del mar, por lo que los procesos de combustión son menos eficientes y se genera una mayor cantidad de contaminantes ambientales como los PAHs. Según la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA), los contaminantes ambientales críticos en la ZMVM son el Ozono y las partículas suspendidas (PM) menores a  $2.5\mu\text{M}$  y a  $10\mu\text{M}$  ( $\text{PM}_{2.5}$  y  $\text{PM}_{10}$  respectivamente). Las emisiones de PM (entre las que se encuentran los PAHs) se incrementan durante la época seca (invierno-primavera) y disminuyen durante la época de lluvias (verano-otoño). Los PAHs entran al organismo por inhalación, ingestión o absorción cutánea, atraviesan fácilmente las membranas celulares por su carácter liposoluble y una vez dentro de las células son metabolizados para su eliminación en un proceso que se conoce como biotransformación. La bioactivación de algunos PAHs produce metabolitos reactivos como el benzo(a)pireno diol epóxido que pueden unirse covalentemente con el DNA formando aductos PAH-DNA. Niveles elevados de aductos en los tejidos representan un mayor riesgo para desarrollar cáncer. En un estudio longitudinal, comparamos los niveles de aductos PAH-DNA y el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas en 92 jóvenes adultos no fumadores habitantes de la ZMVM durante la época seca y la época de lluvias de 2006. Analizamos los niveles de aductos mediante un inmunoensayo de competencia (CIA) que permite la identificación de aductos PAH-DNA con un límite de detección de  $\sim 1.5$  aductos/ $10^9$  nucleótidos utilizando un anticuerpo que reconoce DNA modificado con r7, t8-dihidroxi-t-9, 10-oxi-7, 8, 9,10-tetrahidrobenzo[a]pireno. Por otro lado, determinamos el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos en las dos épocas del muestreo. Ambos biomarcadores se analizaron tomando en cuenta el estilo de vida de los individuos y así como la presencia de variantes alélicas de riesgo para enzimas de metabolismo de PAHs, citocromos P450 (CYP 1A1 \*2A, \*2C y \*4; CYP1B1\*3) y glutatión S-transferasas (GSTM1 y GSTT1). Los niveles de aductos PAH-DNA fueron significativamente más altos ( $p < 0.001$ ) en la época seca ( $10.66 \pm 3.05$  por  $10^9$

nucleótidos, n=92) que en la época de lluvias ( $9.50 \pm 2.85$  por  $10^9$  nucleótidos, n=92), lo que correlacionó con los niveles de  $PM_{10}$  en la ZMVM durante las dos estaciones. El porcentaje de células con aberraciones cromosómicas no se vio afectado estacionalmente. No se observó asociación entre las variantes polimórficas de riesgo cuando se analizaron individualmente y los biomarcadores de exposición (aductos PAH-DNA) o de efecto biológico temprano (porcentaje de células con aberraciones cromosómicas); sin embargo, observamos una asociación significativa entre el número de alelos de riesgo y los niveles de aductos tanto en la época seca ( $R=0.298$ ,  $P=0.048$ ), como en la época de lluvias ( $R=0.473$ ,  $P=0.001$ ), lo que mostró el efecto aditivo de los polimorfismos de riesgo.

## INTRODUCCIÓN.

### 1. 1 Exposición a contaminación en la ZMVM.

La contaminación ambiental es uno de los principales problemas que enfrentan las grandes ciudades como la de México. Se ha asociado la presencia de efectos adversos en la salud debido a la presencia de contaminantes aéreos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y otros compuestos orgánicos que se adsorben en las partículas respirables  $<2.5\mu\text{m}$  (Beeson, W. L., *et al.* 1998, Sram, R. J. and Binkova B. 2000, Hudson, R., *et al.*, 2006; and Calderón-Garcidueñas, L., *et al.* 2007).

El deterioro de la calidad del aire en la ciudad de México es el resultado de la interacción de la ciudad con su entorno natural. La dinámica urbana, las actividades diarias vinculadas con la actividad económica y social, el consumo de combustibles por la industria y el transporte, las condiciones naturales del valle, la expansión de la mancha urbana, el clima y las condiciones fisiográficas, entre otras, influyen notablemente en la concentración y comportamiento de los contaminantes en el aire (calidad del aire de la ciudad de México 2008).

Los diferentes programas de gestión aplicados en los últimos años en la ZMVM han contribuido a la reducción en la concentración de la mayoría de los contaminantes gaseosos. No así para las partículas suspendidas y el ozono, que en algunos días aun rebasan los valores de la NOM. En los últimos años, las concentraciones de dióxido de azufre, monóxido de carbono, dióxido de nitrógeno y plomo, se han mantenido por debajo de las concentraciones límite definidas por la NOM. Por otra parte las concentraciones de ozono y partículas suspendidas continúan superando los valores recomendados por la NOM para la protección de la salud. En el caso del ozono, sus concentraciones superaron el valor límite para una hora de 0.110 ppm en más del 50% de los días en 2006 año en el que se realizó el presente estudio. El indicador para el promedio de 8 horas, de 0.080 ppm, se rebasó en todas las estaciones de monitoreo. En el caso de las partículas suspendidas no se logro el cumplimiento de la NOM en varias de las estaciones de monitoreo. Los datos de las estaciones localizadas en los municipios conurbados del Estado de México, indican que son los más afectados por este contaminante.

El ozono y las partículas suspendidas tienen un impacto importante en la salud de la población, son responsables de diversas enfermedades y tienen una asociación directa con el incremento en la mortalidad. Los grupos más afectados por estos contaminantes son los niños y los adultos mayores. En la ciudad de México alrededor de 15.7 millones de habitantes radican en lugares en donde las concentraciones de ozono superan el valor recomendado por la NOM en más de una ocasión al año. Más de 9.6 millones de personas viven en lugares en donde los niveles de ozono superan el valor de la NOM más de 100 veces al año. Del total de la población afectada, 4.4 millones son niños menores de 14 años y 1.1 son adultos mayores de 60 años. En el caso de las partículas suspendidas, 7.3 millones de habitantes viven en lugares en donde la concentración promedio anual de  $PM_{10}$  excede los  $50\mu g/m^3$  recomendados por la NOM para la salud, de esta población 2 millones son niños y 0.6 millones son adultos mayores. Las zonas con mayor riesgo se encuentran en los municipios conurbados del Estado de México localizados en el norte y poniente de la ciudad (calidad del aire de la ciudad de México 2008)

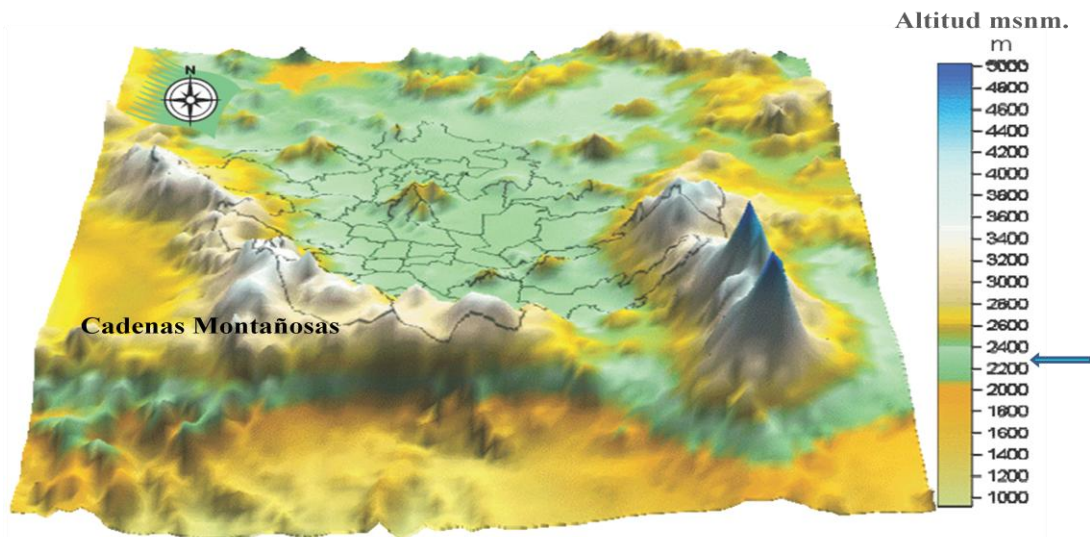
Estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente que la exposición a partículas se asocia con el incremento en mortalidad y/o morbilidad por enfermedades respiratorias, cardiovasculares y cáncer (Dockery, D.W., *et al.* 1993; Pope, C.A., *et al.* 1995; Katsouyanni, K., *et al.* 1997). Los resultados de estos estudios demuestran además, que las poblaciones expuestas a contaminación ambiental tienen niveles incrementados de varios marcadores de genotoxicidad.

Las partículas suspendidas contienen una amplia variedad de compuestos tóxicos y genotóxicos entre ellos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (EPA 1996). Los PAH son compuestos que se generan por la combustión incompleta de materia orgánica como alimentos, madera, diesel y tabaco, son componentes ubicuos en ambientes urbanos. Algunos PAH han sido clasificados como agentes carcinógenos por la USA Environmental Protection Agency (USEPA, 2006) y la International Agency for Research on Cancer (IARC, 2004). Se ha propuesto que la unión de compuestos químicos como los PAH con el DNA puede ser un evento crítico que desencadene la iniciación de la formación de tumores (Poirier, M. 2004).

## 1.2 Características fisiográficas de la ZMVM.

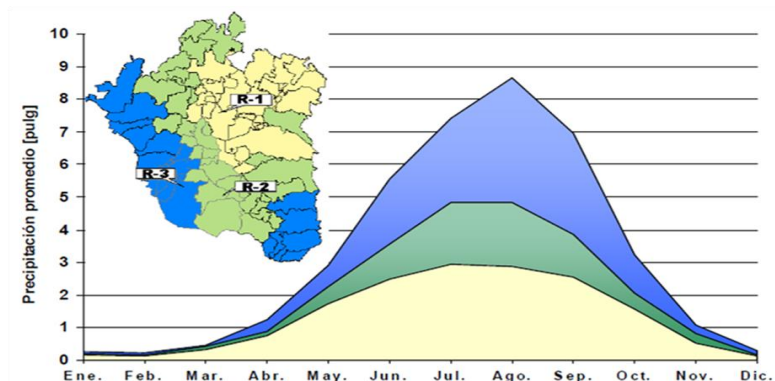
La ZMVM forma parte de una cuenca endorreica, con una altitud promedio de 2,240 msnm, abarca la totalidad del Distrito Federal y parte del Estado de México. Se ubica en la parte Este de la región conocida como Sistema Neovolcánico Transversal, formando parte del ecosistema de Bosque Templado y de la región fisiográfica del Eje Neovolcánico. Se sitúa entre los 19° 03' -19° 54' de latitud Norte, y los 98° 38' -99° 31' de longitud Oeste. La cuenca donde se ubica la ZMVM, presenta valles íntermontañosos, mesetas y cañadas, así como terrenos semiplanos, en lo que alguna vez fueron los lagos de Texcoco, Xochimilco y Chalco. También se encuentran prominencias topográficas aisladas, como el Cerro de la Estrella.

La gran altitud a la que se encuentra la ZMVM, ocasiona que los procesos de combustión operen deficientemente y emitan una mayor cantidad de contaminantes a la atmósfera; esto como consecuencia del bajo contenido de oxígeno del aire, el cual es aproximadamente 23% menor que al nivel del mar, así mismo, la cadena montañosa que la rodea, propicia el estancamiento de los contaminantes (Figura 1).



**Figura 1.** Algunas características fisiográficas de la ZMVM contribuyen al deterioro en su calidad del aire. La ZMVM se localiza a 2240 msnm, debido a su altitud, el contenido de oxígeno del aire es aproximadamente 23% menor que al nivel del mar, lo que contribuye a que los procesos de combustión sean menos eficientes y emitan una mayor cantidad de contaminantes como los PAHs a la atmósfera. Por otro lado, la ZMVM se encuentra rodeada de cadenas montañosas que impiden una adecuada dispersión de los contaminantes propiciando su estancamiento y acumulación (SMA 2006).

De acuerdo con datos climatológicos, en la ZMVM, se presentan tres subtipos de climas, como resultado de las diferencias de elevación y relieve del terreno; y cabe mencionar que estos subclimas, influyen significativamente en las condiciones meteorológicas de cada región. Se presenta un clima templado con lluvias en verano (R3), templado húmedo y subhúmedo con lluvias en verano (R2) y por último, un clima seco (R1) (gráfica 1).



**Gráfica1.** Precipitación mensual promedio por región, 2006 (SMA 2006).

Aunque en los últimos años las condiciones meteorológicas y climáticas del Valle de México han cambiado, provocando que casi no se distingan los cambios estacionales, aun se puede reconocer una estación húmeda (lluvias; mayo-octubre) y una estación seca que se caracteriza por presentar contenidos de humedad baja; sin embargo, las variaciones de temperatura de hasta 15°C que se presentan en esta última estación permiten dividirla en dos subestaciones: seca fría (noviembre a febrero) y seca caliente (marzo a mayo).

Por otro lado, la temporada de lluvias y humedad relativa alta, se presenta desde mediados de mayo, pero se vuelve más evidente entre junio y octubre, sobre todo en la primera quincena de este último mes, descendiendo con ello los niveles de algunos contaminantes. Especialmente, los niveles más altos de precipitación se registran en las zonas montañosas y los más bajos en la zona oriente, noreste principalmente (INEGI, 2005). El incremento de la precipitación pluvial propicia un efecto de “lavado troposférico”, lo cual favorece una mejor calidad del aire de la zona, puesto que mitiga la

generación de partículas. De esta manera, contaminantes críticos como los compuestos orgánicos volátiles (COV) entre ellos los PAHs y las emisiones de partículas se incrementan durante la estación seca y disminuyen considerablemente durante la época de lluvias (SMA 2006).

La zona metropolitana del valle de México (ZMVM) es una de las metrópolis más densamente pobladas del mundo con alrededor de 20 millones de habitantes, lo que representa un 18.6% de la población total en México de acuerdo al II conteo de población y vivienda en 2005 (INEGI 2005). Debido al gran número de automotores que se desplazan a lo largo de la metrópoli, así como al número de horas que circulan diariamente, la ZMVM presenta serios problemas de contaminación ambiental resultado de las emisiones de estas fuentes móviles de contaminación.

### **1.3 Emisiones y distribución de contaminantes en la ZMVM.**

La gestión de la calidad del aire de la ZMVM, cuenta con registro de la distribución espacial de las emisiones, lo que permite, por mencionar algunas de las aplicaciones: identificar los sectores con mayor aporte de emisiones, ubicar las áreas de mayor atención, evaluar los sitios con problemas de la calidad del aire, diseñar las redes de monitores atmosférico, así como coadyuvar a la planeación del uso del suelo en el establecimiento, y/o reubicación de fuentes emisoras de contaminantes.

En el inventario de emisiones de la secretaría del medio ambiente en 2006, se reporta la distribución espacial de las emisiones anuales de los contaminantes en una malla de 1km<sup>2</sup>, donde se ubican 7,826 fuentes puntuales (2,809 de jurisdicción local y 5,017 de jurisdicción federal). Las fuentes de área se distribuyen con base en las áreas geoestadísticas del INEGI (AGEBS), y las fuentes móviles se localizaron sobre las principales calles y avenidas en dicha malla.

Por último, las fuentes naturales se distribuyeron con respecto al uso de suelo y tipo de vegetación que se localiza en cada celda. Es importante mencionar que la distribución espacial de todas las fuentes contaminantes se realizó con cartografía digital del INEGI y



SEMARNAT; así como cartografía creada en la propia SMA del GDF, sobre de un sistema de información geográfica.

La distribución espacial de las emisiones de  $PM_{10}$  que se presenta en el mapa (Figura 2), nos muestra que en la región central de la ZMVM, estas emisiones son generadas principalmente por las fuentes móviles y en la periferia por las vialidades sin pavimentar. Por otro lado, en municipios cercanos al norte del D.F. se tienen emisiones de origen industrial. En el municipio de Tlalnepantla, donde se ubica un gran número de industrias, la fabricación de materiales para la construcción y la industria del hierro generan más de 330 toneladas de este contaminante al año. En el municipio de Ecatepec las emisiones más significativas son generadas por la fundición y moldeo de metales y en el municipio de Acolman por la generación de energía eléctrica.

Las delegaciones del centro y norte del D.F. presentan emisiones de  $PM_{10}$  que pueden llegar hasta 80 toneladas al año, las cuales son generadas principalmente por la intensa actividad vehicular y en algunos casos, se conjunta con la actividad industrial; como sucede en las delegaciones de Azcapotzalco, Cuauhtémoc e Iztacalco, delegaciones en las que existe una gran variedad de giros industriales, como el del hierro y acero, fundición, textil y químico, así como el de la fabricación de materiales para la construcción, por mencionar los más contaminantes. Como se mencionó anteriormente, las emisiones de las delegaciones del sur del Distrito Federal y municipios conurbados del Estado de México son generadas principalmente por las vialidades sin pavimentar, los cuales son abundantes en la periferia del área urbana.

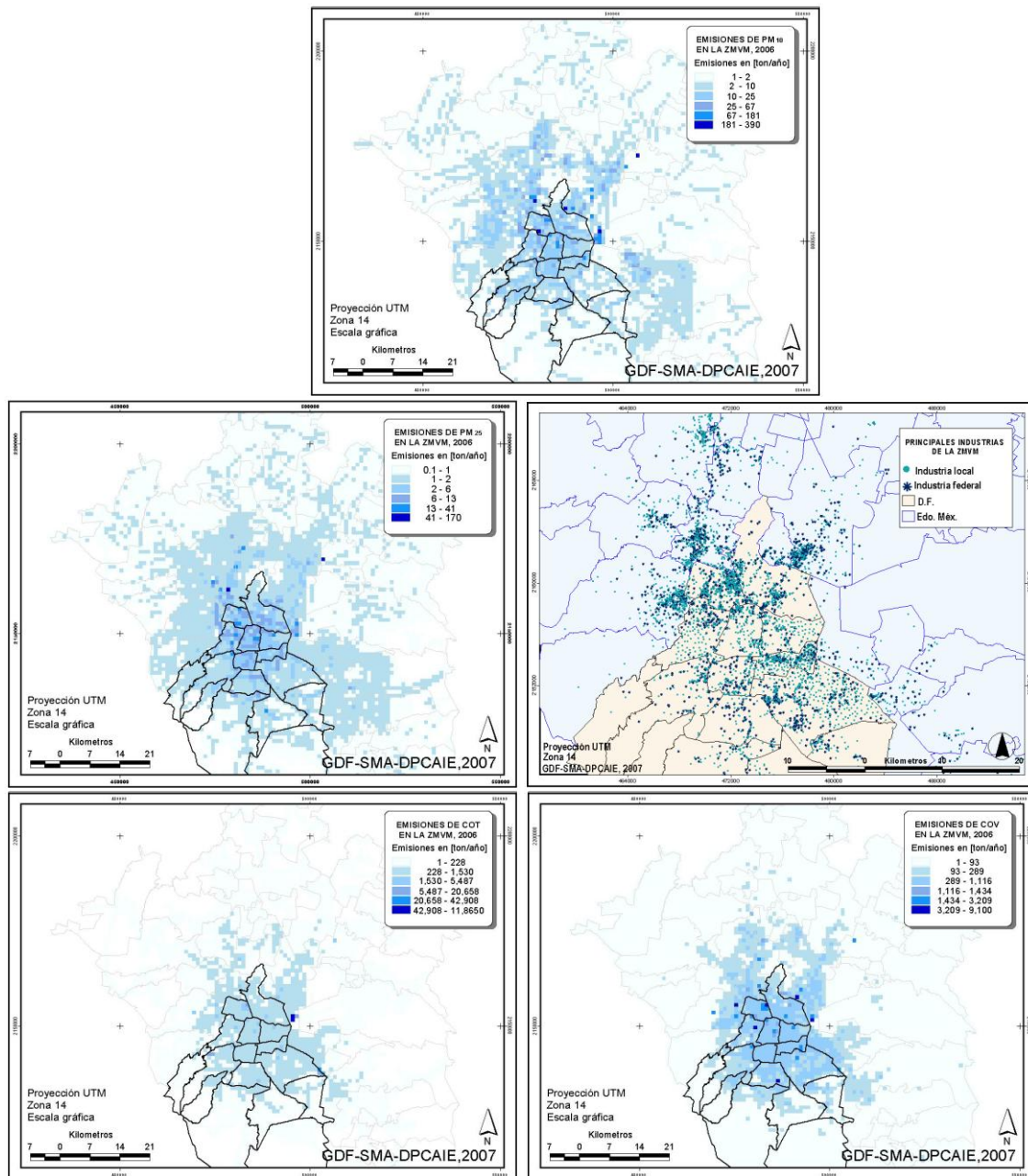
El patrón de distribución de las emisiones de partículas  $PM_{2.5}$  (Figura 2) es similar al de  $PM_{10}$ , las emisiones del centro de la zona son debidas a las fuentes móviles; las zonas de alta emisión en municipios cercanos al norte del Distrito Federal corresponden a las fuentes puntuales, presentándose las emisiones más altas en Acolman y Tlalnepantla, debido a la generación de energía eléctrica y a la industria del hierro respectivamente.

Los Compuestos Orgánicos Totales (COT) son generados en su mayoría por las fuentes de área y móviles. Dentro de las fuentes de área, el 29% de los COT es emitido

como metano por los rellenos sanitarios; debido a esto, los municipios de La Paz y Netzahualcóyotl, muestran zonas de elevada emisión, así mismo, en menor proporción la delegación Álvaro Obregón. En general, los COT son emitidos por la actividad vehicular; sin embargo, las zonas de gran emisión en ciertas delegaciones, son debidas a la actividad industrial, en particular, a los sectores de fabricación de plástico y de productos metálicos, así como a la manufactura de celulosa y papel. En el caso del Estado de México, los principales sectores generadores de COT en los municipios de Tlalnepantla, Ecatepec y Naucalpan son: el químico, el de la fabricación de plástico, así como el de celulosa y papel.

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) participan junto con los Óxidos de Nitrógeno (NOx) en la formación de ozono troposférico, de aquí la importancia de su estimación; en la ZMVM el patrón de distribución de este contaminante es atribuido principalmente a la actividad de los vehículos, y a las actividades donde se utilizan solventes y se tienen fugas de gas L.P. La parte central de la ZMVM, se caracteriza por tener una intensa circulación vial y alta densidad de población, es donde se emiten grandes cantidades de este contaminante; sin embargo, existen pequeñas zonas aisladas donde la actividad industrial es la responsable de dicha emisión.

En las delegaciones Benito Juárez e Iztapalapa, las altas emisiones en algunas zonas que presentan más de 1,500 toneladas anuales, son ocasionadas por la fabricación de plásticos, así mismo, en Azcapotzalco y Coyoacán se tiene a la industria farmacéutica y en Miguel Hidalgo la manufactura de celulosa y papel. En lo que respecta al Estado de México, en Atizapán de Zaragoza y Naucalpan se tienen emisiones de COV generadas por la producción de plásticos, y en el caso de Tlalnepantla y Tultitlan, se deben a la industria química, de conserva de alimentos e impresión (SMA 2006).



**Figura 2.** A) Distribución espacial de  $PM_{10}$ , B) Distribución espacial de  $PM_{2.5}$ , C) Ubicación de las industrias en la ZMVM, D) Distribución espacial de Compuestos Orgánicos Totales (COT), E) Distribución espacial de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV), SMA 2006.

Aunque los niveles de COV presentes en la atmósfera de la ZMVM se determinan diariamente, la red automática de monitoreo ambiental no estima emisiones individuales de PAHs. En 2004, Marr, L. C. y colaboradores reportan niveles altos de PAHs debido sobre todo al tráfico de vehículos automotores.

#### 1.4 Exposición ambiental a PAHs.

Los PAHs son contaminantes ambientales ubicuos. En ambientes exteriores se han reportado concentraciones de  $<20 \text{ ng/m}^3$  en zonas con baja a moderada contaminación ambiental y con rangos de  $20\text{-}200 \text{ ng/m}^3$  en zonas con alta contaminación ambiental (Georgiadis, P and Kyrtopoulos, S.A. 1999). En el área metropolitana del valle de México se ha reportado un rango de concentración de PAHs de  $60$  a  $910 \text{ ng/m}^3$  estos niveles son aproximadamente 5 veces más altos que las concentraciones medidas en los Estados Unidos y se encuentran entre los valores más altos reportados en la literatura (Marr, C. L., *et al.* 2004).

Los productos derivados del petróleo se consideran la principal fuente de emisión de PAHs (Snyder, R., *et al.* 1993) a través de las emisiones de vehículos de gasolina y pérdida por evaporación de gasolina en las gasolineras (Bond, 1986 and Fishbein, L., *et al.* 1998). Los oficiales de tránsito, trabajadores de estacionamientos, carteros, vendedores ambulantes y vendedores de gasolina, se han incluido en numerosos estudios (Rossi, A. M., *et al.* 1999, Verdina, A., *et al.* 2001, Carere, A., *et al.* 2002; Leopardi, P., *et al.* 2003; Avogbe, P. H., *et al.* 2005, Fustinoni, S., *et al.* 2005; Manini, P., *et al.* 2006, Chanvaivit, S., *et al.* 2007) debido al número de horas que se exponen ocupacionalmente a contaminantes ambientales incluidos los PAHs.

La otra gran fuente ambiental de exposición a PAHs es el humo de tabaco (Best, N., *et al.* 2001) tanto para fumadores activos como pasivos. Las concentraciones medias de benceno en casas sin fumadores dan un promedio de  $0.0023 \text{ ppm}$  aproximadamente, pero este valor se incrementa en un 50%, a  $0.0034 \text{ ppm}$  en casas con al menos un fumador (Wallace, L. A. 1989). Se ha estimado que el fumador recibe el 90% de los PAHs generados en un cigarro. Esto representa entre 6 y 10 veces más que un fumador pasivo. Adicionalmente se ha sugerido que algunos productos utilizados en el hogar pueden contribuir a incrementar las concentraciones de PAHs en el ambiente interior como son las pinturas, adhesivos y marcadores, los que contribuirían con entre  $0.1$  y  $140 \text{ ppm}$  de PAHs (NASA, 1999). La ingestión de PAHs a través de alimentos o bebidas se considera una fuente secundaria de exposición (Schocket, B. 1999).

En un estudio de análisis de contaminantes en la ZMVM, se observó que el benzo[ghi]perileno, coroneno e indeno[1,2,3-cd]pireno fueron los PAHs más abundantes entre los 17 PAH analizados en el suroeste de la ciudad de México, lo que indica que la principal fuente de emisiones de PAH en la fase gaseosa de esta zona fueron los vehículos de combustión de gasolina y diesel (Villalobos-Pietrini R. 2006).

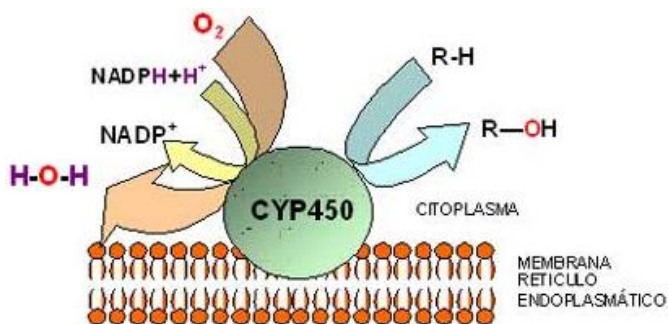
### 1.5 Activación metabólica de PAHs.

Compuestos muy hidrofóbicos como los PAHs entran a las células de forma pasiva y no requieren enzimas u otros procesos dependientes de energía. Se piensa que tanto las enzimas de metabolismo de xenobioticos (EMX) como sus receptores y transportadores evolucionaron originalmente para realizar funciones endógenas, aunque evolutivamente han desempeñado roles importantes en el proceso de desintoxicación de compuestos exógenos.

Una vez que se introducen en el organismo a través de la vía digestiva o aérea, los PAHs son metabolizados para su eliminación. Este proceso involucra principalmente a la súper familia de citocromos P450 (enzimas hemotiolatos, CYPs) y la epóxido hidrolasa que al atacar su estructura (activación metabólica) forman metabolitos reactivos. Se ha sugerido que variaciones en la susceptibilidad individual a la actividad mutagénica y carcinogénica de los PAHs, puede ser parcialmente explicada por diferencias en sus vías de activación y desactivación. Adicionalmente existe evidencia de que las variantes polimórficas en genes que codifican (EMX) confieren menor o mayor capacidad para metabolizar y eliminar estos compuestos genotóxicos (Nebert, D.W. and Dalton, T. P. 2006).

Las EMX se ubican en distintos espacios celulares, algunas de ellas como los CYPs, las flavin mono oxigenasas (FMO) y las uridin difosfato glucuronosil transferasas (UGTs), se encuentran siempre unidas a membrana predominantemente en retículo endoplásmico (Figura 3), mitocondria y ocasionalmente en membrana plasmática; otras se encuentran solo en citoplasma, por ejemplo ciertas oxidasas, hidroxilasas y reductasas, sin embargo la mayoría de las EMX (por ejemplo, epóxido hidrolasas, GSTs y sulfotransferasas (SULTs)

tienen formas tanto citosólicas como membranales. Así, los compuestos químicos hidrofóbicos que entran en las células, presumiblemente son atraídos a las membranas en las que residen la mayoría de las enzimas de fase I para ser biotransformados (Nebert, D.W. and Dalton, T. P. 2006).



**Figura 3.** La superfamilia de citocromos P450 son enzimas hemoproteínas que se encuentran unidas a las membranas de retículo endoplasmático. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción mono-oxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) en un sustrato orgánico (RH) mientras que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua.

La activación metabólica de los PAHs ha sido atribuida principalmente al producto de los genes *CYP1A1* y *CYP1B1* aunque otras isozimas de CYP como *1A2* y *3A4* también participan en la activación de los PAHs. Los CYPs codifican aril hidrocarbano hidroxilasas, enzimas responsables del primer paso oxidante en el metabolismo de muchos xenobióticos. Estos genes son de los más exhaustivamente estudiados en términos de sus variantes polimórficas y la carcinogénesis (Hayashi, S. I., *et al.* 1991). Específicamente porque el metabolito que generan, Benzo(a)Pireno Diol Epóxido (BPDE), se une al DNA formando aductos que pueden dar origen a mutaciones en genes importantes para el mantenimiento del ciclo celular como P53 y/o RAS (Keohavong, P., *et al.* 2005).

Meta-análisis recientes han ligado consistentemente a los polimorfismos CYP1A1\*2A (mutación en el sitio *MspI*), CYP1A1\*2C (mutación Ile→Val) y CYP1A1\*4 (mutación Thr →Asp) con elevados niveles de aductos PAH-DNA y aberraciones cromosómicas en personas expuestas a contaminación ambiental y humo de tabaco (Georgiadis, P., *et al.* 2005) y con elevado riesgo para padecer cáncer de pulmón (Rojas, M., *et al.* 2000). Esta asociación refleja la mayor capacidad metabólica de estas variantes como resultado de su mayor inducibilidad en el caso del \*2A o actividad catalítica \*2C y

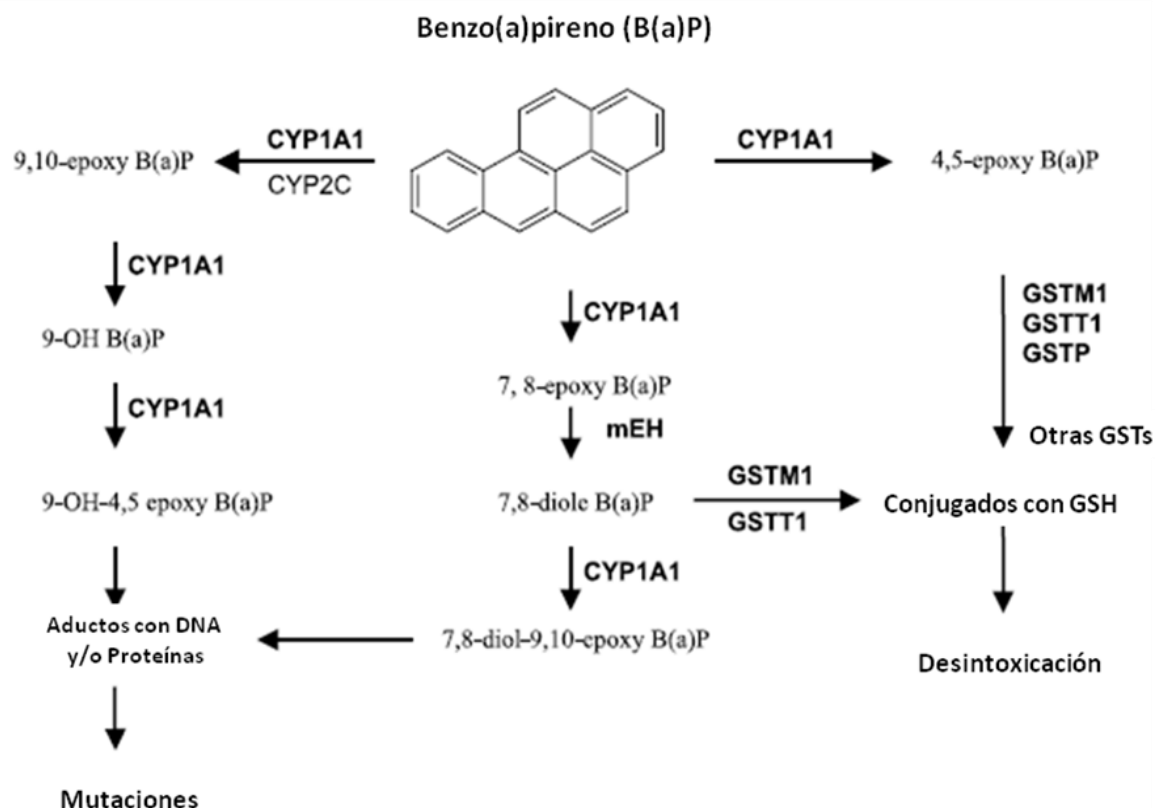
\*4, del CYP1A1 (Petersen, D., *et al.* 1991). De la misma manera se demostró que una mayor inducción de este gen en linfocitos representa un indicador de riesgo para cáncer en pulmón, laringe y la cavidad oral de fumadores.

A pesar de que su expresión no es constitutiva en la mayoría de los tejidos, los genes CYP1 son altamente inducibles por exposición a PAHs, bifenilos policlorados y otras sustancias químicas capaces de unirse y activar al receptor AhR (Ma Q. and Lu A.Y. 2007). Dada esta característica, su expresión es indicativa de exposición a los PAHs. Además del CYP1A1, otras isozimas de CYP como 1A2, 1B1 y 3A4, también participan en la activación metabólica de los PAHs.

La desactivación de los derivados de los PAHs como el Benzo(a)Pireno Diol Epóxido (BPDE) producidos por los CYPs y la Epóxido Hidrolasa ocurre por su conjugación con glutatión a través de la acción de las glutatión S transferasas (GSTs). Las GSTs forman una familia multigénica de enzimas de desintoxicación de fase II responsables de la conjugación de sustratos electrofílicos incluidos carcinógenos, drogas terapéuticas, toxinas ambientales y productos del estrés oxidante con glutatión. Isoformas como la GSTM1 (GSTclase  $\mu$ ) que tiene la habilidad de desintoxicar epóxidos como el BPDE y las GSTT1 (clase  $\theta$ ) que conjuga compuestos más pequeños, están ausentes (genotipos nulos por delección) en porcentajes elevados de muchas poblaciones, en un rango de 20 a 50% para la mayoría de las poblaciones estudiadas (Hayes, J. D. *et al.* 2005), lo que se ha ligado a un incremento de aberraciones cromosómicas en fumadores y a un mayor riesgo para cáncer en los portadores de estos polimorfismos (Ryberg, D., *et al.* 1997). En población mexicana hay reportes de genotipos nulos por delección de GSTM1\*0 de 34% (Pérez-Morales, R., *et al.* 2008) y 42.6% (Montero, R. *et al.* 2009). Para GSTT1\*0 de 9.3% (Montero, R. *et al.* 2007) y 12% (Pérez-Morales, R., *et al.* 2008).

Aunque los efectos combinados de enzimas de metabolismo de fase I y II usualmente dan como resultado la desintoxicación de compuestos exógenos, algunos metabolitos reactivos intermedios como el benzo(a)pireno trans-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, el benceno y las 0- y P-quinonas pueden unirse covalentemente con el DNA y

proteínas, por lo que se consideran mutágenos y carcinógenos en virtud de la alta reactividad de sus grupos electrofílicos (Figura 4).



**Figura 4.** Algunos CYPs participan en la desintoxicación y paradójicamente en la formación de intermediarios reactivos de cientos de compuestos que pueden dañar macromoléculas celulares como DNA, lípidos y proteínas. Los xenobióticos hidrofóbicos son sustrato de los CYPs en un proceso en donde se generan metabolitos intermediarios reactivos genotóxicos y mutagénicos y que pueden llegar a unirse covalentemente con ácidos nucleicos y proteínas. Muchos de estos agentes son considerados carcinogénicos por su capacidad para inducir tumores. (Modificado de Lodovici M., 2004)

#### 1.6 Marcadores de exposición a contaminación ambiental.

Los aductos PAH-DNA se consideran marcadores de exposición y dosis interna (Sram, R. J. *et al.* 2000; Taioli, E. *et al.* 2007; Naufal, Z., *et al.* 2009; Georgiadis, P., *et al.* 2001; Binkova, B., *et al.* 2007), diversos estudios han encontrado asociación entre mediciones de contaminantes ambientales y niveles de aductos, después de corregir la exposición por el tipo de ocupación o mediante el empleo de monitores personales, se observa que esta relación resulta dosis-dependiente. Resultados de análisis multivariados han demostrado que los principales factores que contribuyen a la formación de aductos PAH- DNA son la edad, el hábito de fumar, la etnicidad y la exposición ambiental a PAHs.



Otros marcadores que se asocian a la exposición a contaminación son las aberraciones cromosómicas estructurales, un tipo de daño genético que se manifiesta como marcador de efecto biológico temprano. Entre los factores que contribuyen a la formación de este tipo de marcador se han descrito el efecto acumulativo del tabaquismo, el tiempo de exposición a contaminación y la edad.

Para estimar los niveles de exposición a PAHs en habitantes de la ZMVM, realizamos un estudio longitudinal con el objetivo de determinar los niveles de aductos DNA-PAH, así como la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en 92 jóvenes estudiantes universitarios que habitan en áreas densamente pobladas y contaminadas de la ciudad de México y área metropolitana durante las estaciones de invierno (época seca) y verano (época de lluvias), así como su asociación con las variantes alélicas de riesgo de EMX CYP1A1 (\*2A, \*2C, y \*4), CYP1B1 (\*3) y GSTs M1 y T1 nulos. Observamos diferencias significativas entre los niveles promedio de aductos PAH-DNA durante la época seca y la época de lluvias. Los resultados son consistentes con el hecho de que los habitantes de la ZMVM están expuestos a niveles más altos de PAHs y otros compuestos genotóxicos en la época seca que en la época de lluvias.

Nuestro estudio pretende dar evidencia de los riesgos a la salud que provoca la exposición a la contaminación ambiental en la ciudad de México y área metropolitana mediante el uso de biomarcadores de exposición (Aductos DNA-PAHs) y de efecto biológico temprano (Aberraciones cromosómicas), que a pesar de ser inespecífico porque no permite identificar claramente la causa, nos da idea de la presencia de inestabilidad genética. La evidencia epidemiológica demuestra que los individuos con elevadas frecuencias de aberraciones cromosómicas tienen un riesgo significativamente mayor para desarrollar cáncer (Georgiadis, P., *et al.* 2005).

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

No existen estudios que hayan estimado los niveles de aductos PAH-DNA, en habitantes de la ciudad de México, así como tampoco su relación con polimorfismos metabólicos en los CYPs (1A1 y 1B1) y en las GSTs (M1 y T1). Dado que el daño al DNA es un evento temprano relevante en el proceso de carcinogénesis, determinar si existe relación entre los polimorfismos de enzimas metabólicas de fase I y II con la inducción de aductos PAH-DNA en personas expuestas a los altos niveles de contaminación ambiental en la ZMVM contribuirá al entendimiento del mecanismo de carcinogénesis de los PAHs, así como a optimizar las estimaciones de riesgo, por otro lado la determinación de aberraciones cromosómicas nos dará evidencia del efecto biológico temprano de la exposición a contaminantes en dos distintas épocas del año.

### **3 HIPÓTESIS.**

Los niveles de ambos biomarcadores (de exposición y efecto biológico temprano) serán más altos en la época seca que en la época de lluvias. Adicionalmente, los individuos homocigos para los polimorfismos CYP1A1\*2C, \*2A y \*4, CYP1B1\*3, GSTT1\*0 y GSTM1\*0 tendrán una mayor cantidad de aductos PAH-DNA en sus linfocitos que los heterocigos o no portadores de estos polimorfismos y una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas.

### **4 OBJETIVO.**

Conocer los niveles de PAH que han sido incorporados en los tejidos de habitantes de la ciudad de México en invierno y verano y si existen grupos más susceptibles como los portadores de variantes polimórficas de riesgo en EMX. Esta susceptibilidad se determinará no solo por los niveles de aductos sino también por la determinación del daño cromosómico en glóbulos blancos de sangre periférica.

## **5 MATERIAL Y MÉTODOS.**

Para estimar los niveles de exposición a PAHs en habitantes de la ZMVM, realizamos un estudio longitudinal en el que determinamos los niveles de aductos DNA-PAH, así como la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en jóvenes estudiantes universitarios que habitan en áreas densamente pobladas y contaminadas de la ZMVM durante las estaciones de invierno (seca) y verano (lluvias), así como su asociación con las variantes alélicas de riesgo de los citocromos CYP1A1 (\*2A, \*2C, y \*4), CYP1B1 (\*3) y Glutación-S-Transferasas GSTs M1\*0 y T1\*0 (nulos).

### **5.1 monitoreo ambiental**

Se consultaron y analizaron los datos de concentraciones de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> reportados para las cinco estaciones de monitoreo ambiental representativas de la ZMVM en la base de datos de LA Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA 2006); del noroeste (NO, Tlalnepantla), noreste (NE, Xalostoc), centro (C, Merced), Suroeste (SO, PM<sub>10</sub> Pedregal y PM<sub>2.5</sub> Coyoacán) y Sureste (SE, PM<sub>10</sub> Cerro de la Estrella o PM<sub>2.5</sub> UAM Iztapalapa). Con base en los datos reportados en la RAMA (), se estimaron las concentraciones promedio de cada 24 horas durante el invierno y verano de 2006.

### **5.2 Toma de muestras.**

Entrevistamos alrededor de 500 personas con la intención de conseguir voluntarios para participar en el estudio, una vez que se les explicó en qué consistía el proyecto, se reclutaron 113 individuos dispuestos a participar. Realizamos dos muestreos uno durante el invierno febrero-marzo y otro en el verano agosto-septiembre de 2006 entre los estudiantes de la UNAM y algunos otros voluntarios que viven en la ZMVM. Previo a la toma de muestra, se explicó los voluntarios el alcance del estudio y la necesidad de tomar muestras en dos ocasiones y después de firmar un consentimiento informado, respondieron a un cuestionario en donde se recabó información acerca de su edad, domicilio, estado general de salud, antecedentes de tabaquismo, exposición a rayos X u otro agente genotóxico en los últimos seis meses, peso, estatura, índice de masa corporal, etc.

**Criterios de inclusión**

- 1) Vivir en la ZMVM y haber permanecido aquí por lo menos 6 meses antes de la toma de las muestras.
- 2) Tener entre 19 y 40 años.

**Criterios de exclusión**

- 1) Fumar
- 2) Tener más de 40 años
- 3) Tener menos de 6 meses de haberse ausentado de la ZMVM.

Los 113 voluntarios iniciales habían permanecido en la ciudad de México al menos seis meses antes de la toma de la primera muestra, no fumadores, 58 mujeres y 55 hombres. En la segunda toma de muestra (en la época de lluvias), se obtuvieron 101 pares de muestras de las 113 iniciales. Después del análisis de cotinina (un metabolito de la nicotina) en orina se descartaron 7 que presentaban valores compatibles con el hábito de fumar. Por lo tanto, fueron finalmente 92 muestras pareadas analizadas, 50 mujeres y 42 hombres. Sus edades fluctuaron entre los 19 y los 40 años de edad.

**5.3 Determinación de cotinina.**

Puesto que nuestro estudio está enfocado solo a la exposición ambiental a PAHs. Se descartó la exposición a humo de tabaco determinando la concentración de cotinina en la orina utilizando un método semicuantitativo con el kit comercial Accutest NicAlert Strip Test (Jant Pharmaceutical Corp., CA).

El punto de corte de concentraciones de cotinina para fumadores es a partir de 100ng/mL. La exposición a humo de tabaco ambiental puede causar resultados positivos en los no fumadores, pero siempre con valores por debajo de esta concentración.

**5.4 Extracción de DNA de leucocitos.**

Se aisló DNA con el método descrito por Daly, A. K. *et al* en 1996. Con este método se desproteína DNA de más de 30kb con ácido perclórico y puede almacenarse por mucho tiempo a 4°.

Se separaron las fases de plasma, células blancas y eritrocitos de 30 ml de sangre por sedimentación y primeramente se aislaron los núcleos celulares agregando 45ml de buffer de lisis (320mM sacarosa  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , 5mM  $MgCl_2$ , 1% Tritón X-100, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) al botón de células blancas y después de mezclar vigorosamente, se centrifugó a 2000g durante 20 minutos a 4°. El botón se resuspendió en 2ml de buffer de suspensión (150mM NaCl, 60mM EDTA, 1% de SDS, 400mM Tris-HCl, pH 7.4) y 0.5 mL de perclorato de sodio ( $NaClO_4$ ) 5M. Esta suspensión se mezcló por rotación 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 65° durante 30 minutos. Se agregaron 2 mL de cloroformo frío (a -20°C) y se mezcló nuevamente por rotación a temperatura ambiente durante 10 minutos seguido por centrifugación a 1400g por 10 minutos.

La fase acuosa que contiene al DNA (la fase más alta) se transfirió a un tubo de 15mL y se agregaron 2 volúmenes de etanol frío (a 4°). El tubo se invirtió varias veces para precipitar el DNA y transferirlo a un tubo de 2 mL. El DNA se lavó 2 veces con etanol 70% y se dejó secar a temperatura ambiente al vacío para resuspenderlo en 400µL de buffer TE (10mM tris-HCl, 1mM EDTA pH 7.4) y se incubó 16 horas a 60°C, posteriormente se guardó a 4° hasta usarse para la cuantificación de aductos y la genotipificación de los alelos de enzimas metabólicas.

### **5.5 Detección de aductos PAH-DNA**

Los aductos PAH-DNA se analizaron mediante al protocolo de inmunoensayo quimio luminiscente altamente sensible BPDE-DNA CIA (Divi, R., *et al.* 2002), que tiene un límite de detección de  $\sim 1.5$  aductos/ $10^9$  nucleótidos usando 20 µg de DNA. Muestras colectadas del mismo individuo en diferentes estaciones fueron analizadas en la misma placa de ELISA para homogenizar errores de medición.

#### **5.5.1. Modificación in vitro de DNA de timo de ternero con [1,3- $^3H$ ] BPDE (para curva estándar).**

La modificación del DNA se llevó a cabo en los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés) en el grupo de la doctora Miriam Poirier. Se trataron 472 mg de DNA de timo de ternero en 400mL de Bis-Tris 5 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.1, durante dos horas con 4.2 µg [1,3- $^3H$ ]BPDE (1744 mCi/mmol) diluido en 5.9 mL de dimetil sulfóxido. La mezcla se extrajo tres veces con n-butanol y tres veces con

alcohol isoamílico, saturados previamente con Bis-Tris 50 mM, EDTA 1mM, pH 7.1; el DNA se precipitó con etanol al 70% y se resuspendió nuevamente en Bis-Tris 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.1 (Beland. F.A., *et al.* 1999). Las concentraciones del DNA se determinaron por espectroscopia UV y los niveles de modificación con BPdG radiomarcado se establecieron por conteo de centelleo en líquido, por sextuplicado.

### **5.5.2 Cultivo y tratamiento de células hepáticas HepG2 para controles positivo y negativo.**

Se cultivaron células de la línea HepG2 derivada de hepatoma humano en cajas Petri de plástico, con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM D7777-1L Sigma Aldrich México) suplementado con 8% de suero fetal bovino (Gibco BRL 16000-044), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL 11140-050) 100 U/ml de Penicilina y 100µg/ml de estreptomycin (Gibco BRL 15070-089). Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> hasta confluencia. Una vez en confluencia, las células se expusieron a 0 ó 4µM de B(a)P (en 2% de dimetilsulfoxido) durante 24h. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron 2 veces en PBS y se desprendieron de las cajas de cultivo con ayuda de un cepillo citológico, se centrifugaron a 1600 rpm durante 8 minutos, se decanto el sobrenadante (PBS) y se congelaron las células.

Para extraer el DNA que sirvió como control negativo (de células HepG2 sin tratar) ó control positivo (células HepG2 tratadas con 4µM de B(a)P), se descongeló la suspensión celular en buffer de lisis siguiendo el protocolo de Daly A. K., *et al.* en 1996, descrito anteriormente, las concentraciones del DNA se determinaron por espectroscopia UV y se almacenó a 4°C hasta usarse como control para la determinación de aductos.

### **5.5.3 Inmunoensayo quimioluminiscente.**

Las microplacas de 96 pozos para el inmunoensayo (flat botton white polystyrene high-binding greiner bio-one) se obtuvieron de Sigma Aldrich (M4686-40EA). El kit de detección quimioluminiscente ELISA con sustrato CDP-Star (ELISA-Light immunoassay System: I block (caseína), 10X assay buffer y CDP-Star with Emerald II) se obtuvo de Applied Biosystems (T-1026). El anticuerpo primario (antiserum elicited against DNA modified with (±)-7β, 8α-dihydroxy-9α,10α-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]-pyrene (BPDE)) fue elaborado por el grupo de la doctora Poirier en el departamento de

interacciones con el DNA en los institutos nacionales de salud de los Estados Unidos (NIH). El anticuerpo secundario AVIDx-AP (Alkaline Phosphatase Conjugated Streptavidin), se obtuvo de *Tropix*, Bedford, MA, (catalogo #APA10).

Se adhirieron en cada uno de los pozos de las filas B, C, D, E, F y G de la placa, 100 pg de BPDE-DNA (modificado en 35.9pmol BPdG/ $\mu$ g DNA, 1.2% de modificación) y en las filas A y H 100 pg de DNA de timo de ternero sin modificación diluido en 0.1 mL de solución reactibind (Pierce 17250). Antes de colocar el DNA en las placas, este fue sonificado para acortar su longitud (a 20% de amplitud durante 15 segundos) y desnaturalizado para obtener cadena sencilla (en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos). Las placas se mantuvieron de 2-3 días a temperatura ambiente en una plancha de agitación para favorecer la adhesión del DNA. Posteriormente se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta usarse.

Antes de usarse, las placas se lavaron tres veces con PBST (PBS con 0.05% de tween y 0.02% de  $\text{NaN}_3$  pH 7.4). Para inhibir uniones inespecíficas, la placa se bloqueó colocando 310  $\mu\text{L}$  de caseína al 0.25% en PBST en cada pozo y se incubó durante 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , previo a la colocación de la curva y muestras en dicha placa. Volúmenes iguales (de 50 $\mu\text{L}$ ) de anticuerpo anti BPDE-DNA (diluido  $1:3 \times 10^6$  en caseína al 0.25%) y diluciones seriales del BPDE-DNA estándar (0.03-27fmol del DNA modificado en 1 BPdG/ $10^6$  nucleótidos, para curva estandar) así como las muestras humanas, se mezclaron e incubaron 25 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en un termo mezclador antes de colocarse en los pozos de la microplaca de ELISA.

El contenido de DNA en los pozos de la curva estándar se mantuvo equivalente al contenido de DNA en los pozos de las muestras problema adicionando cantidades adecuadas de DNA de timo de ternero sonificado y desnaturalizado. La mezcla final de DNA y anticuerpo (dilución final  $1:6 \times 10^6$  en 0.25% de caseína) se incubó 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en la microplaca. Transcurrido el tiempo, se lavó la placa tres veces con PBST para posteriormente incubarla con 100  $\mu\text{L}$  del segundo anticuerpo en cada pozo (anti-rabbit IgG biotinilado diluido 1:5000 en caseína al 0.25%) 90 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBST se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de estreptavidin-alkalin fofatasa (dilución 1:6000 en 25% caseína) y la placa se incubó 60 minutos a temperatura ambiente,



transcurrido el tiempo de incubación se lavó tres veces con PBST y dos veces con Buffer Tris (20mM Tris, 1mM de  $MgCl_2$  pH 9.5).

Finalmente se agregaron 100  $\mu$ L de CDP-Star en cada pozo y las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y 15h a 4°C. La luminiscencia se leyó en ambos tiempos utilizando el luminómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a 542nm. El 50% de inhibición de la curva estándar (media $\pm$ DE) ocurrió en  $0.60 \pm 0.08$  fmol BPdG por pozo y el límite más bajo de detección reportado con este método utilizando 20  $\mu$ g de DNA por pozo es de 1.5 aductos/ $10^9$  nucleótidos.

#### **5.6 Cultivos de linfocitos y análisis de aberraciones cromosómicas.**

Se analizaron aberraciones cromosómicas en metafases de linfocitos mediante cultivos de sangre entera. Se colocaron 4.8ml de medio RPMI 1600 (R-4130, Sigma) suplementado con L-glutamina (25030-081 Invitrogen), aminoácidos no esenciales (M7145, Sigma, St. Louis, MO), 0.2 mL de phitohemaglutinina (10576-015 Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0.5 mL de sangre. Se incubaron a 37°C durante 72 horas (Gonsebatt, M.E., et al 1995). Noventa minutos antes de la cosecha, se agregó demecolcine (D-1925 Sigma) a una concentración final de 10 $\mu$ g/mL para detener a las células en metafase. Las células se colectaron por centrifugación y se sometieron a un tratamiento hipotónico de 20 minutos en 7.4 mM de KCl para romper las membranas de los eritrocitos y posteriormente se fijaron y lavaron solución fijadora (una mezcla de metanol: ácido acético glacial 3:1) seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos (se hicieron tres lavados en total para eliminar restos de eritrocitos). Finalmente los pellets fueron resuspendidos en 400 $\mu$ L de solución fijadora para ser goteados sobre laminillas portaobjetos frías y se dejaron secar al aire libre a temperatura ambiente. Las metafases se tiñeron con Giemsa al 2% en buffer neutro de fosfatos Sorensen a pH 7.2 y se observaron bajo microscopio óptico. Se analizaron 100 metafases bien definidas con al menos 45 cromosomas de cada individuo. Los resultados del análisis se expresan como porcentaje de células con gaps y/o rompimientos cromatídicos o cromosómicos.

#### **5.7 Selección de polimorfismos y Genotipificación.**

Todos los polimorfismos incluidos en este estudio se seleccionaron en base a su asociación con desarrollo de cáncer y/o efectos conocidos en actividad enzimática, así como por su asociación con la presencia de elevados niveles de aductos o aberraciones cromosómicas descritas en la literatura (Tabla VII). Los polimorfismos por delección de GSTM1 and GSTT1 se determinaron simultaneamente por PCR multiplex (Abdel-Rahman *et al.* 1996). Los polimorfismos de los CYPs se analizaron por PCR-RFLP: *CYP1A1\*2A* (Kawajiri *et al.*, 1990), *CYP1A1\*2C* (Hayashi *et al.*, 1991), *CYP1A1\*4* (Cascorbi *et al.*, 1996), *CYP1B1\*3* (Bailey *et al.*, 1998). Todos los primers o iniciadores se obtuvieron de Invitrogen.

#### **5.8 Análisis estadístico.**

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos analizados en la muestra poblacional y se determinó si se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba de  $X^2$ . Para comparar las diferencias estacionales en los niveles promedio de aductos y porcentajes de células con aberraciones cromosómicas entre los individuos agrupados por genotipo se utilizó la prueba Wilcoxon para datos no paramétricos pareados, mientras que para comparar las diferencias en los niveles promedio de aductos y porcentajes de células con aberraciones cromosómicas entre los grupos con distintos genotipos se utilizó la prueba U de Mann Whitney.

Se analizó la relación entre los niveles de aductos PAH-DNA y la emisión de partículas suspendidas ( $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$ ) mediante un análisis de regresión múltiple tanto en la época seca como en la de lluvias. Para observar si existe alguna relación entre los niveles de aductos y las variantes alélicas en enzimas de metabolismo de PAH a distintas tasas de exposición a PM, se realizó un análisis de regresión múltiple para lo que fue necesario agrupar a los individuos de acuerdo a su área de residencia (NW, NE, etc), y sus genotipos se codificaron numéricamente con 0 los homócigos silvestres, 1 los heterócigos y 2 los homócigos mutantes. En el caso de los genotipos de GSTM1 y GSTT1, los individuos sin delección (wild type) para uno o dos alelos se codificaron con 0 y los genotipos nulos se codificaron con 2.

Para explorar el efecto aditivo de los alelos de riesgo en los niveles de aductos PAH-DNA se hizo un análisis de regresión lineal entre la suma de alelos de riesgo que portan los individuos y sus niveles de aductos en las dos épocas de muestreo. En todas las pruebas estadísticas un valor de  $p < 0.05$  se considero como estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron empleando los programas GraphPad Prism (versión 5.01) y Stata para Windows (versión 10.1).

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Características demográficas de la muestra.

De los 113 voluntarios reclutados inicialmente, 11 estuvieron ausentes en el segundo periodo de muestreo y 10 de los 102 restantes presentaron niveles de cotinina en orina por encima de 100ng/mL por lo que fueron descartados del estudio. El número total de muestras pareadas analizadas en el estudio longitudinal fue 92, de los cuales fueron 42 hombres y 50 mujeres entre 19 y 40 años de edad (Tabla I).

**Tabla I.** Características de la muestra poblacional. Promedio  $\pm$  DS de edad, peso, estatura, índice de masa corporal (IMC). Los datos se obtuvieron a partir de los cuestionarios que respondieron los donantes después de la toma de muestras.

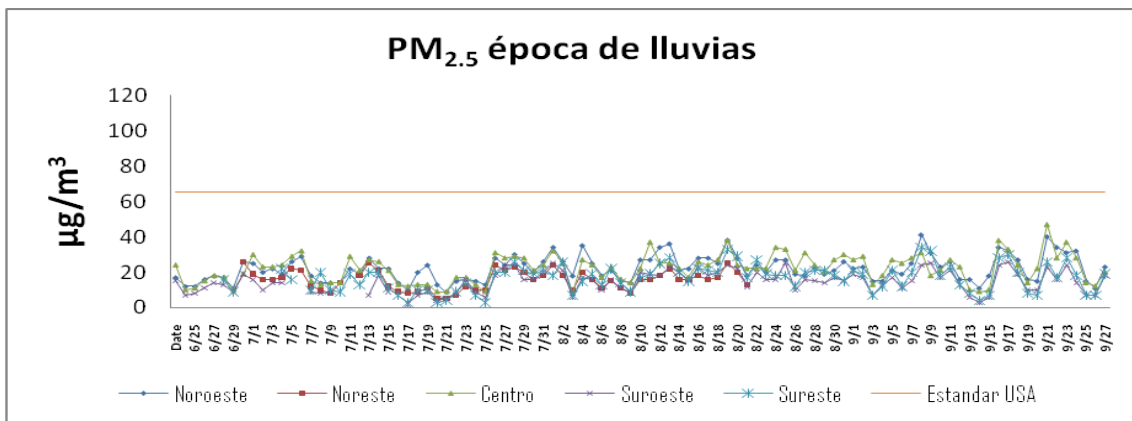
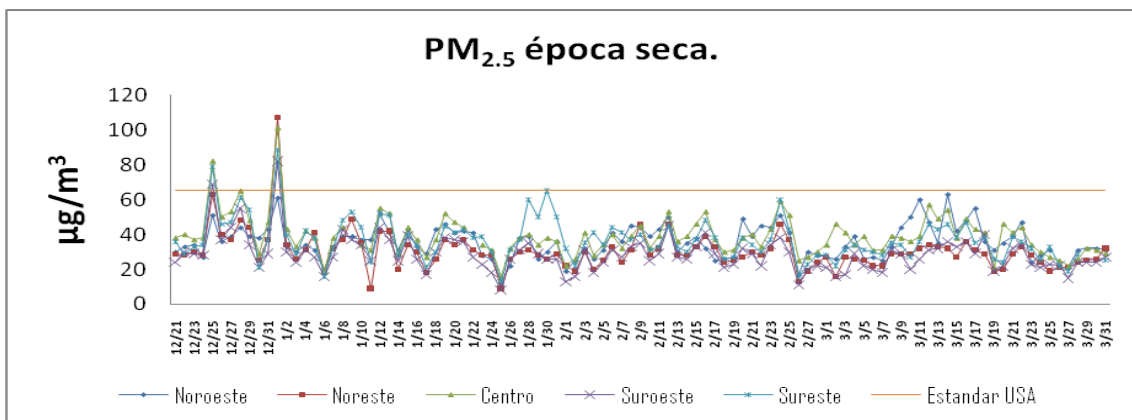
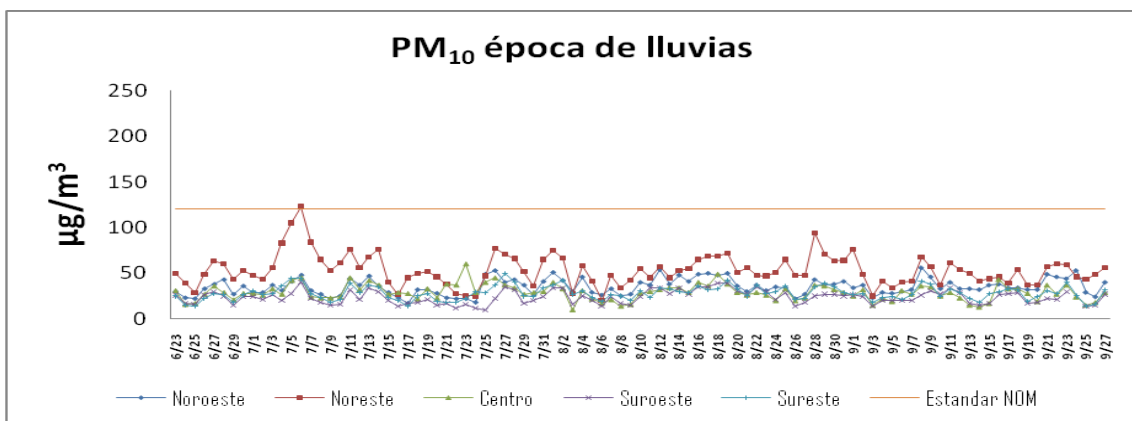
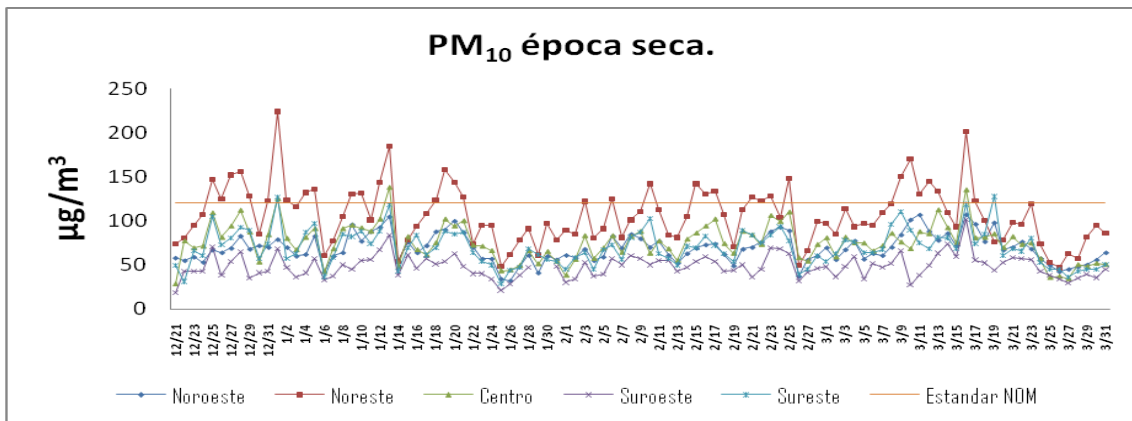
Características	Casos	
	Hombres	Mujeres
Número de voluntarios:		
Época seca	53	60
Época de lluvias	42	50
Fumadores (Excluidos)	7	2
No fumadores (ambas estaciones)	42	50
Edad	24.10 $\pm$ 4.24	25.65 $\pm$ 5.37
Peso (Kg)	72.29 $\pm$ 12.95	58.72 $\pm$ 8.95
Estatura	1.72 $\pm$ 0.08	1.61 $\pm$ 0.07
IMC	23.34 $\pm$ 3.25	22.48 $\pm$ 2.86
<b>Ocupación</b>	<b>Número de voluntarios</b>	<b>Porcentaje</b>
Estudiantes	80	86.9
Empleados	12	13.0
Exposición reportada		
Gasolina	16	17.3
Tiner	12	13.0
Pinturas	12	13.0
Aerosoles	5	5.4
Humo Leña	9	9.7
Carbón	10	10.8
Herbicidas	3	3.2
Fertilizantes	3	3.2
Insecticidas	14	15.2
Medicamentos	30	32.6
Vitaminas	26	28.2
Consumo Alcohol	56	60.8
Fumadores Pasivos	24	26.0
Exposición Hrs. Media (DS)	8.1 $\pm$ 8.38	
Gasolineras a menos de 1Km	53	57.6
Uso del transporte Público		
Duración de trayecto (Hrs.) Media (DS)	2.3 $\pm$ 0.96	
Autobús	53	57.6
Metrobús	53	57.6
Metro	50	54.3
Automóvil	29	31.5
Microbus	54	58.6
Vivienda		
Tipo de Estufa		

Gas	86	93.4
Eléctrica	1	1.0
G/E	5	5.4
Localización Boyler		
Interior	28	30.4
Exterior	78	84.7

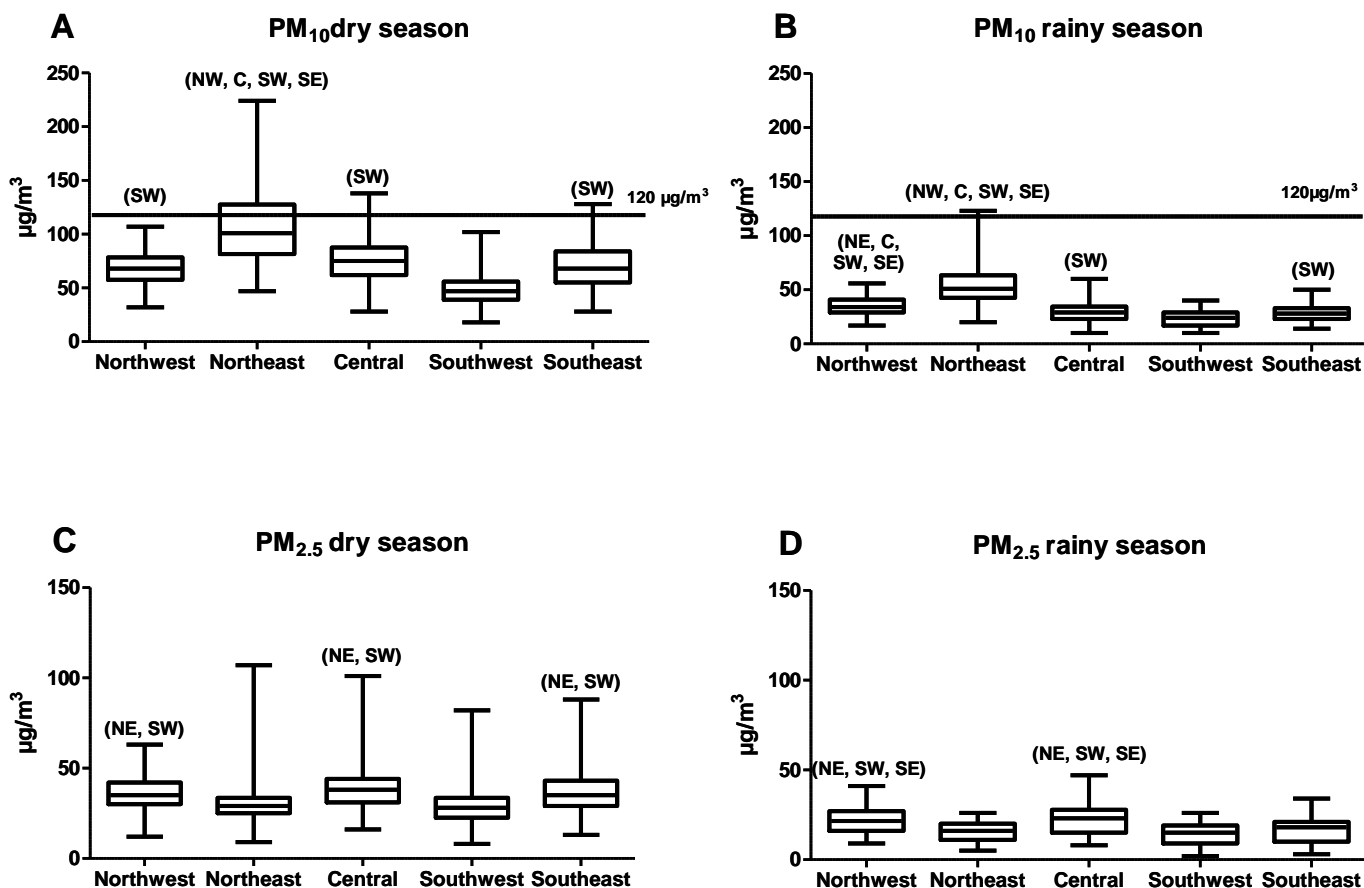
## 6.2 Partículas suspendidas y calidad del aire.

Los datos obtenidos de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA, 2006) se utilizaron para estimar los promedios cada 24 horas de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  en las cinco estaciones de monitoreo representativas de la ZMVM; durante los meses de invierno (época seca 21/12/2005 al 31/3/2006) y verano (época de lluvias 25/6/2006 al 27/9/2006) (Figuras 5).

Durante la época seca se observaron valores significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$ . El valor promedio más alto para  $PM_{10}$  se observó en la estación de monitoreo de Xalostoc en la porción NE:  $PM_{10} = 101$  (47-224)  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en la época seca y  $PM_{10} = 51$  (20-123)  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en la época de lluvias. En esta estación de monitoreo los niveles de  $PM_{10}$  durante la época seca algunas veces excedieron el límite permitido por la norma oficial mexicana (120  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Esto es consistente con la alta densidad de actividad industrial y fuentes móviles de la zona. Las porciones C, SO, SE y NO mostraron concentraciones de emisiones diarias por debajo del límite permitido, salvo las emisiones de  $PM_{2.5}$  de los primeros días de muestreo de la época seca (21/12/2005 a 2/2/2006). La variabilidad observada en las concentraciones de  $PM_{2.5}$  fue menor que la observada en las  $PM_{10}$ . Las zonas NO y C mostraron los valores más altos ( $p < 0.05$ ) y variabilidad (figura 6).



**Figura 5.** Concentraciones ambientales promedio diarias de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en cinco estaciones de monitoreo representativas de la ZMVM durante los periodos de muestreo (época seca 21 de Diciembre-21 de Marzo, época de lluvias 25 de Junio-27 septiembre).



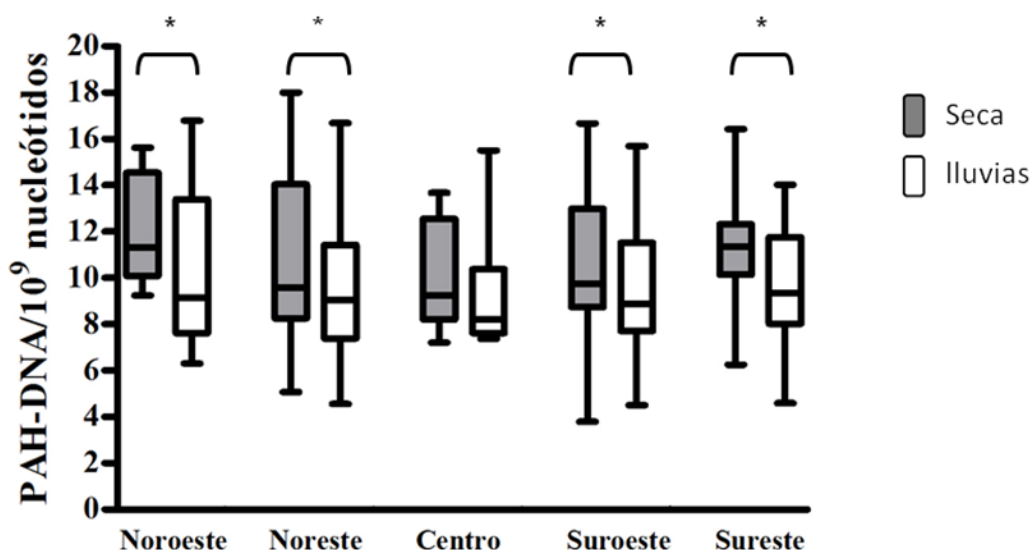
**Figura 6.** Distribución de las concentraciones promedio diarias de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  a lo largo de los periodos de muestreo en cinco estaciones de monitoreo representativas de la ZMVM: noroeste (NO), noreste (NE), centro (C), suroeste (SO), sureste (SE). Los paneles corresponden a: A)  $PM_{10}$  época seca, B)  $PM_{10}$  época de lluvias, C)  $PM_{2.5}$  época seca, D)  $PM_{2.5}$  época de lluvias. En el gráfico se observan los valores máximos y mínimos (bigotes), el primer y tercer cuartil (cajas) y la mediana (línea central). Para  $PM_{10}$ , la estación de monitoreo NO registró un valor promedio de emisiones significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) al que se registra en las otras 4 estaciones de monitoreo, mientras que en la región SO reportó el valor más bajo. Para  $PM_{2.5}$ , las estaciones del NO y C reportaron valores promedio significativamente más altos de emisiones ( $p < 0.05$ ). Las iniciales arriba de cada caja indican las regiones que son significativamente diferentes de la caja en cuestión.

### 6.3 Niveles de aductos PAH-DNA en época seca (invierno) y época de lluvias (verano).

No encontramos efectos significativos en los niveles de aductos entre grupos ordenados por lugar de residencia, edad, índice de masa corporal, hábitos alimenticios, consumo de vitaminas o fármacos. Observamos diferencias significativas en los niveles de aductos PAH-DNA promedio de las muestras obtenidas en la época seca con respecto a los niveles de aductos promedio en la época de lluvias ( $10.66 \pm 3.05$  seca vs.  $9.50 \pm 2.85$  lluvias,  $p = 0.0001$ ). Los cambios estacionales en los niveles de aductos estadísticamente significativos se observaron sobretodo en los voluntarios con niveles de aductos por encima de  $9.9$  aductos/ $10^9$  nucleótidos en la época seca. En este grupo se

encuentran 50 de los 92 sujetos analizados, lo que representa el 54% de la población estudiada. Los individuos con niveles de aductos menores a  $9.9/10^9$  nucleótidos durante la época seca muestran una menor variación en los niveles de aductos entre estaciones (8.64 en la época seca vs. 8.31 en la época de lluvias), las diferencias estacionales en este segundo grupo no fue estadísticamente significativa.

Cuando agrupamos a los individuos de acuerdo a su lugar de residencia en la ZMVM (NE, NO, etc.), los niveles de aductos no fueron diferentes entre los habitantes de las distintas áreas de la ZMVM en la misma época del año pero si se observaron niveles más altos de aductos en la época seca, en comparación con la época de lluvias en casi todas las regiones, excepto para los habitantes de la zona centro (Figura 7).



**Figura 7.** Gráfica de distribución de los niveles de aductos PAH-DNA entre los individuos agrupados por área de residencia en la ZMVM. El trazo representa los valores máximos y mínimos (bigotes), primer y tercer cuartil (cuadro) la mediana (línea intermedia). Los niveles de aductos fueron más altos en la época seca (invierno) que en la época de lluvias (verano) para las regiones NO, NE, SO y SE ( $p < 0.05$ ).

Mediante análisis de regresión múltiple encontramos correlación entre los niveles de aductos PAH-DNA y la exposición ambiental a  $PM_{10}$  en la época seca, no así con aberraciones cromosómicas (Tabla II). Al analizar las diferencias en las tasas de exposición a PM de los individuos tomando en cuenta su lugar de residencia, en la época seca se observó una correlación significativa entre emisiones de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$ , los niveles de aductos y el genotipo GSTM1 en los individuos que viven en el sureste de la ZMVM (una de las áreas que reporta menos emisiones de contaminantes en la metrópoli  $n=23$ ;  $PM_{10}$   $p=0.035$ ,  $PM_{2.5}$   $p=0.013$ ); también observamos asociación entre emisiones de  $PM_{2.5}$ , niveles de aductos y el genotipo CYP1B1 \*3 en los individuos que viven en el



noroeste de la ZMVM (área que reporta altos niveles de emisiones de contaminantes además de una alta densidad de población N=9; P=0.023) (Tabla II).

**Tabla II.** Análisis de regresión múltiple entre los niveles de PM reportados en la RAMA, niveles de aductos PAH-DNA, porcentajes de aberraciones cromosómicas y variantes alélicas en enzimas metabólicas.

	R	P	
		PM <sub>10</sub>	PM <sub>2.5</sub>
<b>Época seca</b>			
Aductos PAH-DNA (n=92)	0.209	<b>0.048</b>	0.216
NO, <i>CYP1B1</i> *3 (n=9)	0.845	0.116	<b>0.023</b>
SE, <i>GSTM1</i> nulo (n=23)	0.533	<b>0.035</b>	<b>0.013</b>
<b>Época de lluvias</b>			
Aductos PAH-DNA (n=92)	0.169	0.528	0.128
NO, <i>CYP1B1</i> *3 (n=9)	0.285	0.780	0.775
SE, <i>GSTM1</i> nulo (n=23)	0.311	0.362	0.215
<b>Época seca (n=79)</b>			
% Ab. cromosómicas	0.132	0.669	0.399
<b>Época de lluvias (n=89)</b>			
% Ab. cromosómicas	0.043	0.709	0.843

Al analizar las diferencias estacionales en los niveles de aductos, no encontramos diferencias significativas entre los portadores de las variantes alélicas *CYP1A1*\*4 +/- (n= 6), *GSTT1* nulo (n= 6) o los portadores de la combinación *GSTM1* nulo y *CYP1A1*\*4 +/- (n= 5), probablemente debido al pequeño número de individuos que representan estos genotipos (5 o 6 individuos en cada grupo). Sin embargo, los portadores de los alelos *CYP 1B1*\*3 +/- (n=42), *CYP1A1*\*2A (n=18), y \*2C (n=18) tampoco mostraron diferencias estacionales significativas en sus niveles de aductos a pesar de tener un mayor número de individuos (Tabla III).

Al analizar la influencia de los polimorfismos de riesgo en los biomarcadores de exposición y efecto temprano, no observamos diferencias en los niveles de aductos o aberraciones cromosómicas entre los portadores de las distintas variantes alélicas ni en la época seca ni en la época de lluvias (Tabla IV). Durante la época de lluvias los heterocigos portadores del genotipo *CYP1B1*\*3 mostraron una tendencia (p= 0.08) a presentar mayores niveles de aductos que los homocigos silvestres o mutantes para este alelo.

**Tabla III.** Variaciones estacionales en los niveles de aductos PAH-DNA y porcentajes de aberraciones cromosómicas en linfocitos de habitantes de la ZMVM entre los portadores de diferentes polimorfismos de enzimas metabolizadoras de PAH.

Gen	Genotipo	N	Época seca			Época de lluvias			N	Época seca			Época de lluvias		
			Aductos <sup>a</sup> (D.S)	Aductos <sup>a</sup> (D.S)	P <sup>b</sup>	% Ab.C <sup>a</sup> (DS)	% Ab.C <sup>a</sup> (DS)	P <sup>b</sup>		% Ab.C sin gaps (DS)	% Ab.C sin gaps (DS)	P <sup>b</sup>			
CYP1A1 *2A Msp I	+/+	18	11.04 (3.56)	9.69 (3.10)	0.07	17	1.76 (1.56)	1.53 (1.12)	0.38	0.35(0.61)	0.35(0.78)	0.43			
	+/-	49	10.45 (2.76)	9.31 (2.69)	0.0002	41	2.27 (1.77)	1.46 (1.36)	0.016	0.65(0.80)	0.7(0.82)	0.45			
	-/-	25	10.80 (3.28)	9.75 (3.05)	0.012	20	2.30 (1.87)	1.90 (1.74)	0.24	0.35(0.67)	0.7(0.92)	0.13			
CYP1A1 *2C Ile462Val	+/+	18	11.02 (3.57)	9.66 (3.12)	0.065	17	1.70 (1.61)	1.47 (1.12)	0.38	0.35(0.60)	0.41(0.79)	0.43			
	+/-	57	10.48 (2.97)	9.47 (2.83)	0.0003	48	2.27 (1.90)	1.68 (1.52)	0.046	0.58(0.77)	0.77(0.88)	0.19			
	-/-	17	10.87 (2.84)	9.45 (2.67)	0.0087	14	2.38 (1.26)	1.38 (1.45)	0.065	0.38(0.77)	0.38(0.65)	0.50			
CYP1A1 *4 Thr461Asn	+/+	86	10.59 (2.94)	9.51 (2.89)	0.0001	73	2.22 (1.77)	1.57 (1.40)	0.009	0.49(0.74)	0.61(0.84)	0.25			
	+/-	6	11.74 (4.47)	9.38 (2.38)	0.10	5	1.40 (1.14)	1.80 (1.79)	0.37	0.4(0.55)	0.6(0.89)	0.50			
CYP1B1 *3 Leu432Val	+/+	44	10.72 (2.90)	9.28 (2.89)	0.0001	38	2.47 (1.72)	1.53 (1.41)	0.007	0.63(0.82)	0.74(0.98)	0.40			
	+/-	42	10.51 (3.30)	10.02 (2.70)	0.13	35	1.91 (1.82)	1.71 (1.43)	0.39	0.4(0.55)	0.54(0.66)	0.20			
	-/-	6	11.28 (2.62)	7.48 (2.91)	0.015	5	1.60 (1.14)	1.20 (1.64)	0.31	0.2(0.45)	0.4(0.89)	1.00			
GSTM1	Activa	51	10.46 (2.87)	9.29 (2.93)	0.0014	44	2.20 (1.89)	1.41 (1.32)	0.01	0.57(0.82)	0.61(0.78)	0.49			
	Nula	41	10.91 (3.27)	9.76 (2.76)	0.0008	34	2.12 (1.57)	1.82 (1.53)	0.29	0.41(0.61)	0.65(0.92)	0.12			
GSTT1	Activa	86	10.69 (2.94)	9.49 (2.84)	0.0001	74	2.17 (1.75)	1.63 (1.43)	0.02	0.52(0.74)	0.65(0.85)	0.25			
	Nula	6	10.27 (4.65)	9.65 (3.18)	0.28	4	2.00 (1.83)	0.75 (0.96)	0.25	0	0.25(0.5)	0.50			
GSTM1/ CYP1B1 *3 Leu432Val	Activa (+/+, +/-)	48	10.43 (2.95)	9.48 (2.90)	0.0053	42	2.26 (1.90)	1.45 (1.33)	0.012	0.59(0.83)	0.64(0.79)	0.49			
	Nula (+/-, -/-)	25	11.22 (3.55)	9.72 (2.49)	0.0025	22	2.09 (1.63)	1.64 (1.50)	0.25	0.36(0.58)	0.36(0.58)	0.50			
GSTM1/CYP1A1 *4 Thr461Asn	Activa/(+/+, +/-)	51	10.46 (2.87)	9.29 (2.93)	0.0014	44	2.20 (1.89)	1.41 (1.32)	0.01	0.57(0.82)	0.61(0.78)	0.49			
	Nula/(+/-)	5	10.50 (3.64)	8.50 (1.09)	0.21	4	1.25 (1.26)	2.25 (1.71)	0.25	0.5(0.58)	0.75(0.96)	0.50			

+ alelo silvestre – alelo mutante.

<sup>a</sup> media aritmética de aductos por 10<sup>9</sup> nucleótidos o porcentaje medio de células con aberraciones cromosómicas.

<sup>b</sup> Derivada de la prueba de Wilcoxon para datos pareados entre las dos estaciones seca y de lluvias.

% Ab. C porcentaje de aberraciones cromosómicas (rompimientos y gaps).

**Tabla IV.** Distribución de variantes alélicas en enzimas metabólicas en la muestra analizada y su efecto en los niveles de aductos y/o % de aberraciones cromosómicas tanto en la época seca como en la de lluvias.

Gen	Genotipo	Época seca					Época de lluvias						
		N	Aductos <sup>a</sup> (SD)	<i>P</i> <sup>b</sup>	N	% Ab. C <sup>a</sup> (SD)	<i>P</i> <sup>b</sup>	N	Aductos <sup>a</sup> (SD)	<i>P</i> <sup>b</sup>	N	% Ab. C <sup>a</sup> (SD)	<i>P</i> <sup>b</sup>
CYP1A1 *2A Msp I	+/+	18	11.04 (3.56)	0.42	17	0.33 (0.59)	0.16	18	9.69 (3.10)	0.39	18	0.42 (0.76)	0.41
	+/-	49	10.45 (2.76)		41	0.63 (0.79)		49	9.31 (2.69)		49	0.65 (0.77)	
	-/-	25	10.80 (3.28)		22	0.31 (0.64)		25	9.75 (3.05)		23	0.65 (0.88)	
CYP1A1 *2C Ile462Val	+/+	18	11.02 (3.57)	0.41	17	0.35 (0.60)	0.38	18	9.66 (3.12)	0.45	19	0.47 (0.77)	0.34
	+/-	57	10.48 (2.97)		49	0.57 (0.76)		57	9.47 (2.83)		56	0.71 (0.84)	
	-/-	17	10.87 (2.84)		14	0.35 (0.74)		17	9.45 (2.67)		16	0.43 (0.62)	
CYP1A1 *4 Thr461Asn	+/+	87	10.59 (2.94)	0.24	75	0.40 (0.54)	0.92	87	9.51 (2.89)	0.47	84	0.57 (0.78)	0.95
	+/-	7	11.74 (4.47)		5	0.49 (0.74)		7	9.38 (2.38)		7	0.61 (0.80)	
CYP1B1 *3 Leu432Val	+/+	44	10.72 (2.90)	0.22	38	0.63 (0.81)	0.28	44	9.28 (2.89)	<b>0.08</b>	44	0.72 (0.92)	0.59
	+/-	42	10.51 (3.30)		37	0.37 (0.63)		42	10.02 (2.70)		40	0.52 (0.64)	
	-/-	6	11.28 (2.62)		5	0.20 (0.44)		6	7.48 (2.91)		7	0.42 (0.78)	
GSTM1	Activa	51	10.46 (2.87)	0.31	46	0.54 (0.80)	0.74	51	9.29 (2.93)	0.11	51	0.61 (0.75)	0.78
	Nula	41	10.91 (3.27)		34	0.41 (0.60)		41	9.76 (2.76)		40	0.61 (0.86)	
GSTT1	Activa	86	10.69 (2.94)	0.33	76	0.51 (0.73)	0.28	86	9.49 (2.84)	0.39	85	0.63 (0.81)	0.41
	Nula	6	10.27 (4.65)		4	0.00 (0.00)		4	9.65 (3.18)		4	0.25 (0.50)	
GSTM1/ CYP1B1*3	Activa (+/+, +/-)	48	10.43 (2.95)	0.22	44	0.38 (0.69)	0.93	48	9.48 (2.90)	0.22	47	0.77 (0.73)	<b>0.06</b>
	Nula (+/-, -/-)	25	11.22 (3.55)		22	0.36 (0.59)		25	9.72 (2.49)		25	0.31 (0.47)	
GSTM1/CYP1A1 *4	Activa/(+/+, +/-)	51	10.46 (2.87)	0.44	46	2.22 (1.87)	0.16	51	9.29 (2.93)	0.38	51	1.61 (1.55)	0.24
	Nula/(+/-)	5	10.50 (3.64)		4	1.25 (1.26)		5	8.50 (1.09)		5	2.00 (1.58)	

<sup>a</sup> Media aritmética por 10<sup>9</sup> nucleótidos o porcentaje medio de aberraciones cromosómicas.

<sup>b</sup> Derivada de la prueba U de Mann-Whitney entre homocigos para cada alelo (+/+ y -/-).

+ Alelo silvestre – alelo mutante.

% Ab. C porcentaje de aberraciones cromosómicas (rompimientos y gaps).

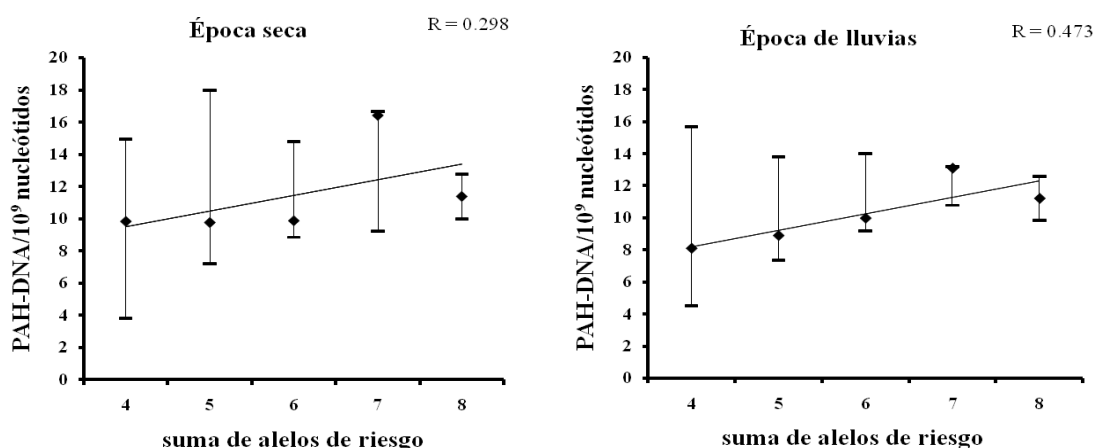
**Tabla V.** Estudios in vivo de mutaciones en genes, asociada con la exposición a contaminación ambiental y PAHs (uno de los principales componentes de contaminación).

Alteración/ Biomarcador molecular estudiado.	Tipo celular/tejido estudiado.	Tipo de exposición asociada.	Comentarios.	Referencias.
<i>Mutaciones Génicas</i> Mutaciones en los genes p53 y K-ras en ratas.	Tejido tumoral de pulmón.	Exposición por inhalación durante 24 meses a escapes de diesel y carbono.	Infrecuente.	Swafford et al. 1995. Belinsky et al. 1997.
Mutaciones en el gen K-ras en ratas.	Adenomas y adencarcinomas pulmonares.	Exposición intra traqueal a partículas liberadas por escapes de diesel	Frecuente después de exposición intratraqueal, pero no incremento después de exposición por inhalación.	Iwai et al 1997.
Mutaciones en el transgen lambda/lacI en ratones transgénicos.	Tejido Pulmonar	Escapes de Diesel (inhalación durante 4 semanas).	Incremento en el número de aductos medidos con posmarcaje con <sup>32</sup> P y también incrementaron los niveles de 8-0x0-dG.	Sato et al. 2000.
Mutaciones en gen HPRT en niños Sanos recién nacidos.	Linfocitos de sangre del cordón Umbilical.	Contaminación de aire urbano.	La presencia de mutaciones correlaciona con la presencia de aductos DNA-PAHs.	Perera et al. 2002.
Mutaciones en genes P53 y/o RAS en fumadores y no fumadores sin evidencia de cáncer de pulmón.	Células epiteliales de pulmón de esputo.	Emisiones ricas en PAHs	Mutaciones en P53 abundantes en tejido tumoral de pulmón, pero poco abundantes en células no malignas.	Keohavong et al. 2005.
P <sup>un</sup> Deleciones alélicas en embriones de ratón.	Epitelio pigmentario retinal.	Partículas de escapes de diesel (exposición tras placentaria en embriones de 10.5 a 15.5 días seguidos de exposición oral a las hembras preñadas).	70Kb de deleciones a lo largo de los exones 6-18 del alelo P <sup>un</sup> en un ratón P <sup>un</sup> / P <sup>un</sup> Aductos medidos por posmarcaje con <sup>32</sup> P y niveles de 8-0x0-dG no incrementaron significativamente.	Reliene et al. 2005.

**Tabla VI.** Reportes de niveles de aductos de PAH con DNA o proteínas en poblaciones humanas expuestas a distintos niveles de contaminación ambiental.

País	Población	Medición	Niveles	Valor P	Notas	Referencias
Polonia	Habitantes de áreas altamente industrializadas.	Aductos PAH-DNA	30.4/10 <sup>8</sup> invierno vs 4.2/10 <sup>8</sup> verano	P<0.05	Se compararon por estación del año y por lugar de residencia.	Perera, F., <i>et al.</i> 1992.
Dinamarca	Habitantes de áreas rurales Conductores de autobuses. Habitantes de áreas rurales.	Aductos PAH-DNA <sup>32</sup> P- Postlabeling	11/10 <sup>8</sup> en áreas rurales en invierno (0.51-1.2) fmol/μg 0.58fmol/μg	0.04	Controles rurales: 0.07 P<0.001	Nielsen P.S., <i>et al.</i> 1996.
Italia	Oficiales de Policía. Empleados de oficina.		1.3/10 <sup>8</sup> (0.1-5.5) vs 2.8/10 <sup>8</sup> (0.7-5.5)verano 0.9/10 <sup>8</sup> (0.1-3.7)vs 0.8/10 <sup>8</sup> (0.1-1.8)verano	P<0.001		Peluso, M., <i>et al.</i> 1998.
Italia	Vendedores de periódicos.	Aductos BP-Hemoglobina Cromatografía de gases y espectroscopia de masas	0.3fmol/mg vs 0.1 fmol/mg	0.09		Pastorelli , R., <i>et al.</i> 1996.
Italia	Trabajadores de la vía pública. Residentes de Florencia	Aductos PAH-DNA <sup>32</sup> P- Postlabeling	1.37/10 <sup>8</sup> 1.10/10 <sup>8</sup>	0.10	Los aductos tienden a ser más en trabajadores de la vía pública pero la diferencia no es significativa.	Palli, D., <i>et al.</i> 2001.
Grecia	Estudiantes expuestos a distintos niveles de contaminación: En la ciudad de Atenas En la ciudad de Halkida	Aductos PAH-DNA <sup>32</sup> P- Postlabeling	1.25/10 <sup>8</sup> (DS 1.19) 1.54/10 <sup>8</sup> (DS 1.19)	<0.001	Se observó correlación positiva entre niveles de aductos y exposición personal a b(a)p	Georgiadis, P. <i>et al.</i> 2001
Alemania	Niños en poblados con distintos niveles de contaminación.	Aductos 4-ABP-hemoglobina. Cromatografía de gases y espectroscopia de masas	Los niños de Munich tuvieron 1.5 y 1.2 veces más aductos que los niños de Eichstätt y Augsburg.	<0.001	Los aductos de aminas aromáticas con hemoglobina fueron fuertemente influenciados por el lugar de residencia.	Richter, E., <i>et al.</i> 2001.
Tailandia	Oficiales de Policía de transito Oficiales de policía de oficina	Aductos PAH-DNA <sup>32</sup> P- Postlabeling	1.6±0.9/10 <sup>8</sup> (0.4-4.3) 1.2±1.0/10 <sup>8</sup> (0.2-4.9)	0.029	Los policías de tránsito se expusieron 20 veces más a PAH que los de oficina 74.25ng/m3 vs 3.11, p=0.001	Ruchirawa, M. <i>et al</i> 2002
Dinamarca	Estudiantes expuestos a distintos niveles de contaminación.	8-oxo-dG en DNA	0.27(0.15-0.33)/10 <sup>5</sup> dG invierno 0.58(0.47-0.70)/10 <sup>5</sup> dG verano	0.0001	La exposición personal a PM <sub>2.5</sub> correlacionó con 8-oxo-dG en DNA de linfocitos p=0.007	Sorensen, M. <i>et al.</i> 2003.
Florencia (Italia)	Trabajadores de la vía publica Residentes de Florencia	Aductos PAH-DNA <sup>32</sup> P- Postlabeling	15.2 ±14.9 10.4±11.6	P<0.05		Palli, D., <i>et al</i> 2008
México	Estudiantes de la ZMMV expuestos a contaminación	Aductos PAH-DNA Inmunoensayo luminiscente	10.66±3.05/10 <sup>9</sup> invierno 9.5±2.85/10 <sup>9</sup> verano	0.001	Época seca vs época de lluvias. Los niveles de aductos en invierno correlacionaron con las PM <sub>10</sub>	García-Suastegui, W. <i>et al.</i> 2010

Cuando investigamos el efecto aditivo de los alelos de riesgo mediante una regresión lineal, se observó correlación entre la suma de dichos alelos y los niveles de aductos entre los individuos que portan 4 o más alelos de riesgo tanto en la época seca ( $R=0.298$ ,  $p=0.048$ ), como en la época de lluvias ( $R=0.473$ ,  $p=0.001$ ; Figura 8).



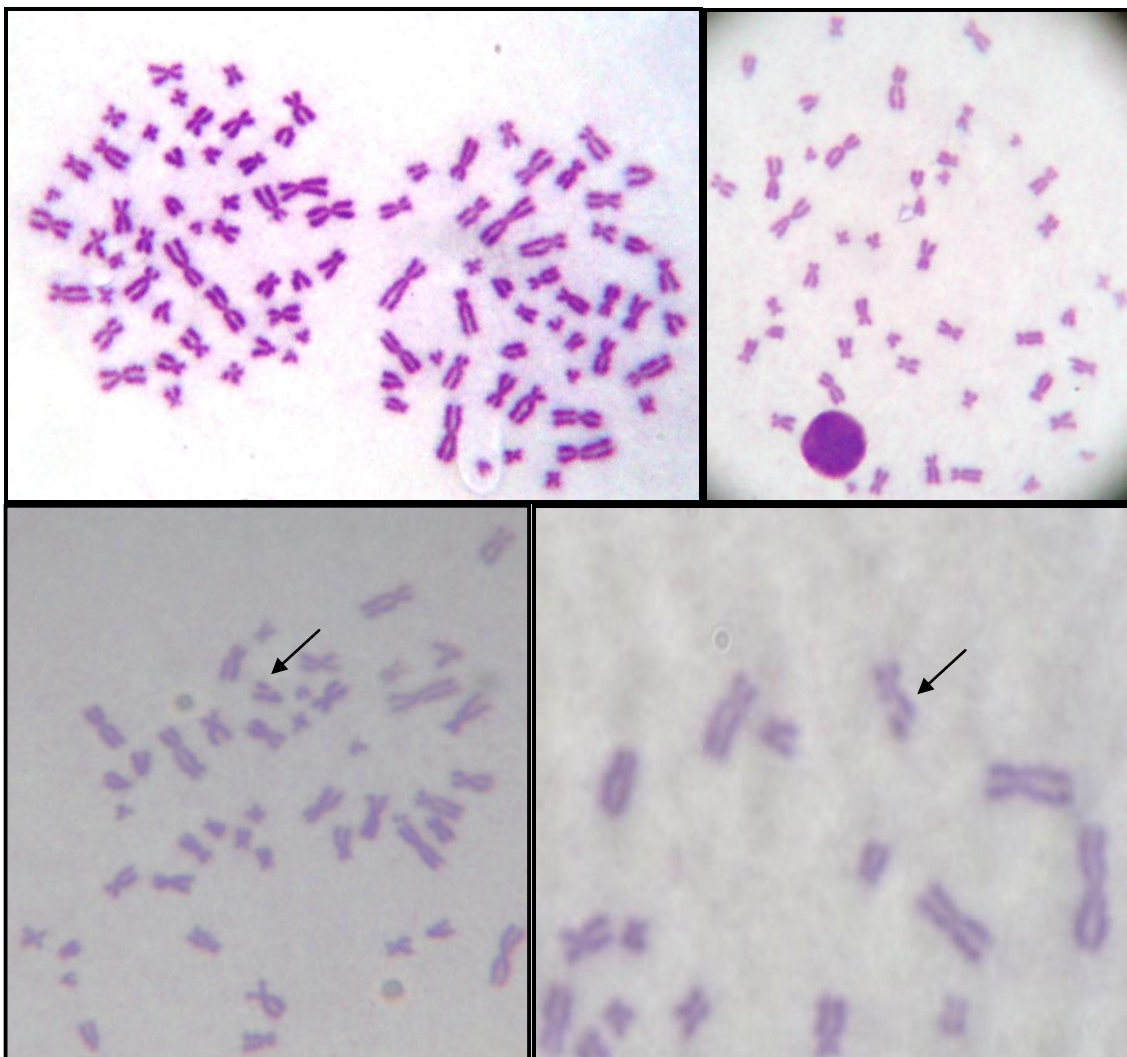
**Figura 8.** Efecto aditivo de las variantes polimórficas de riesgo. Los puntos representan el valor de la mediana, los bigotes los valores mínimos y máximos del rango, N es el número de individuos en cada grupo. La suma de alelos de riesgo por individuo es el número de variantes polimórficas que incrementan el riesgo de formación de aductos. Observamos una correlación positiva entre niveles de aductos PAH-DNA y la suma de alelos de riesgo en habitantes de la ZMVM entre los portadores de 4 o más alelos de riesgo durante la época seca ( $R=0.473$ ,  $p=0.001$ ) y la época de lluvias ( $R=0.298$ ,  $p=0.048$ ).

### 6.3 Porcentaje de aberraciones cromosómicas.

Mediante un análisis citogenético convencional, determinamos los porcentajes de células con aberraciones cromosómicas, en metafases de cultivos de linfocitos (Figura 9). Obtuvimos 79 cultivos por duplicado de las muestras obtenidas en la época seca y 89 cultivos por duplicado de muestras obtenidas en la época de lluvias. Se realizó un análisis estadístico tomando en cuenta tanto gaps como rompimientos (cromosómicos y cromatídicos) y otro análisis sin tomar en cuenta los gaps. Al considerar los gaps en el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas en los % de Ab entre los portadores de los genotipos silvestres, con excepción de los polimorfismos CYP1A1\*2A y \*2C, donde se observaron diferencias estacionales únicamente entre los heterocigos para estos polimorfismos ( $p<0.05$ , Tabla III). En el análisis sin tomar en cuenta los gaps, no observamos diferencias significativas en los porcentajes de daño cromosómico entre las muestras colectadas en la época seca y las colectadas en la época de lluvias (Tabla III).

Para determinar el efecto de las variantes polimórficas en el daño cromosómico, se hizo un análisis de correlación entre % de Ab. C y genotipos. Los valores promedio

de % de Ab. C observados entre grupos de individuos con distinto genotipo se describen en la Tabla IV. No observamos interacciones entre variantes polimórficas y % de Ab. C en ninguna de las dos épocas del estudio. Durante la época de lluvias, la combinación de genotipo homocigo o heterocigo GSTM activo, más CYP1B1\*3 heterocigo mostró mayor daño cromosómico marginalmente significativo ( $p=0.06$ , Tabla IV), en comparación con los individuos con genotipo GSTM1 nulo y CYP1B1\*3 heterocigos.



**Figura 9.** Cromosomas metafásicos de cultivos de linfocitos teñidos con giemsa observados bajo microscopio de luz en aumento 100X, las flechas señalan rompimientos cromatídicos.

#### 6.4 Frecuencias alélicas de los polimorfismos de enzimas metabolizadoras de PAH

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos CYP1A1\*2A, \*2C y \*4; CYP1B1\*3; GSTM1 y GSTT1 de los 113 donadores iniciales que participaron en el estudio. Las frecuencias obtenidas se describen en las tablas VII (frecuencias alélicas) y VIII (frecuencias genotípicas).

Para el alelo CYP1A1\*2A, se observó una frecuencia de 54%, un valor mayor que el reportado por Ishibe N. *et al* 1997 de 37%, Fragoso J.M. *et al* 2005 de 40% Montero R. *et al* en 2007 de 40% para población mexicana. Para el alelo CYP1A1\*2C, la frecuencia que encontramos fue 48%, un valor menor que el reportado previamente de 56.7% por Montero R. *et al* en 2007, y de 54% por Pérez-Morales en 2008 para población mexicana. Para el alelo CYP1A1\*4 observamos una frecuencia de 4%. Para el alelo CYP1B1\*3 encontramos una frecuencia de 32%, no hay reportes para población mexicana para estos dos alelos.

Para el alelo GSTM1 nulo la frecuencia que observamos fue 42%, similar a la reportada por Montero R *et al* en 2007 de 42.6% y mayor a la reportada por Pérez-Morales en 2008 de 34% en población mexicana. Para GSTT1 nulo encontramos una frecuencia de 7%, valor menor a lo reportado por Montero *et al* 2007 de 9.3% y Pérez-Morales en 2008 de 12%.



**Tabla VII.** Localización de los polimorfismos analizados y frecuencias alélicas.

Alelo	Cambio de Nucleótido	Cambio de Aminoácido	Localización	Frecuencia alélica.	Frecuencia reportada p/población mexicana		Referencias
CYP1A1*2A	T6235C	Ninguno	3' no codificante río abajo del sitio de poliadenilación.	T= 0.46 C= 0.54	T=0.63 T=0.599 T=0.60	C=0.37 C=0.401 C=0.40	Ishibe N. 1997 Fragoso J.M. 2005 Montero R. 2007
CYP1A1*2C	A4889G	Ile→Val	Exón 7 codón 462 (región unida a grupo hemo).	A= 0.52 G= 0.48	A=0.66 A=0.43 A=0.46	G=0.34 G=0.57 G=0.54	Fragoso J.M. 2005 Montero R. 2007 Pérez-Morales 2008
CYP1A1*4	C4887A	Thr→Asp	Exón 7 codón 461 (región unida a grupo hemo)	C= 0.96 A= 0.04			
CYP1B1*3	C4326G	Leu→Val	Codón 432 sitio catalítico.	C=0.68 G=0.32			
GST T1	Delección	Delección	Región Codificante	GSTT1=0.93 GSTT1*0=0.07	GSTT1=0.91 GSTT1=0.88	GSTT1*0=0.09 GSTT1*0=0.12	Montero R. 2007 Pérez-Morales 2008
GST M1	Delección	Delección	Región Codificante	GSTM1=0.58 GSTM1*0=0.42	GSTM1=0.57 GSTM1=0.66	GSTM1*0=0.43 GSTM1*0=0.34	Montero R. 2007 Pérez-Morales 2008

### 6.5 Análisis del equilibrio genético poblacional mediante una prueba de $X^2$

Todas las frecuencias de los locus analizados se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg al presentar valores de  $X^2$  menores al valor crítico (el valor crítico de  $X^2$  para nuestro análisis con dos grados de libertad y una  $\alpha=0.05$  es 3.84), lo que nos indica que la composición genética de nuestra población permanece en equilibrio, es decir, no está actuando sobre ella la selección natural y por lo tanto no se está generando un cambio evolutivo (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Análisis mediante  $\chi^2$  de las frecuencias genotípicas de los locus analizados.

Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia genotípica observada	Frecuencia genotípica esperada	$\chi^2 = \sum (O - E)^2 / O$
CYP1A1*2c	Ile/Ile	26	30.5	0.66
	Ile/Val	65	56.4	1.31
	Val/Val	22	26	0.72
				<b>2.69</b>
CYP1A1*2a	T/T	23	23.9	0.03
	T/C	59	56.1	0.15
	C/C	31	32.9	0.10
				<b>0.28</b>
CYP1A1*4	Thr/Thr	104	104.1	0.0
	Thr/Asp	9	8.7	0.01
	Asp/Asp	0	0.18	0.18
				<b>0.19</b>
CYP1B1*3	Leu/Leu	50	52.2	0.09
	Leu/Val	53	49.2	0.29
	Val/Val	10	11.6	0.22
				<b>0.60</b>
GSTM1	M1/M1 + M1/*0	66	14.6 + 52.07	0.01
	*0/*0	47	46	0.02
				<b>0.03</b>
GSTT1	T1/T1 + T1/*0	105	61.88 + 43.48	0
	*0/*0	8	7.6	0.02
				<b>0.02</b>

La ley de Hardy-Weinberg afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. También especifica que esas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos **A** y **a**, con frecuencias alélicas de  $p$  y  $q$  respectivamente, el equilibrio de Hardy-Weinberg predice que la frecuencia genotípica para el homocigo dominante **AA** es  $p^2$ , la del heterocigo **Aa** es  $2pq$  y la del homocigo recesivo **aa**, es  $q^2$ . El principio de Hardy-Weinberg es una expresión de la noción de una población que está en "equilibrio genético".

## 7. DISCUSIÓN.

Observamos variaciones estacionales en los niveles de aductos PAH-DNA en células blancas de sangre periférica en no fumadores habitantes de la ZMVM. Los valores más altos en los niveles de aductos se observaron en las muestras colectadas en la época seca (Tabla III, Figura 7), esto coincide con la presencia de altos niveles de contaminantes ambientales (Inventario de emisiones 2006) y material particulado PM (Figuras 5 y 6). Los niveles de aductos correlacionan significativamente con los niveles ambientales de PM<sub>10</sub> (Tabla II), lo que sugiere que los niveles de aductos tienen una fuerte relación con la intensidad de exposición a la contaminación ambiental. Resultados similares han sido reportados en poblaciones expuestas a distintos niveles de contaminación, ya sea ocupacional o ambiental como los que se mencionan en la tabla VI.

El anticuerpo que utilizamos en el inmunoensayo quimioluminiscente reconoce DNA modificado con diferentes PAH (Poirier, M. 2004; Weston, A. *et al* 1989), por lo que nuestros resultados sugieren que durante la época seca (noviembre-mayo) los habitantes de la ZMVM están expuestos a niveles más altos de PAH que durante la época de lluvias (junio-octubre), lo que coincide con las determinaciones de las concentraciones de PM<sub>10</sub> reportadas para la fase gaseosa atmosférica de la ciudad de México durante 2008 (Mugica, V., *et al* 2010). En las que la concentración de benzo[a]pireno en PM<sub>10</sub> reportada fue casi tres veces mayor durante la época seca (invierno) que durante la época de lluvias (0.81 vs. 0.29 ng/m<sup>3</sup>, respectivamente).

Por otro lado, el aumento en la exposición a PAH durante el invierno no se encontró asociado con el daño cromatídico o cromosómico, cuando no se tomaron en cuenta los sitios frágiles (gaps) (Tabla III). Se observaron resultados similares al comparar porcentajes de aberraciones cromosómicas entre un grupo de policías que trabajan durante al menos 8 horas al aire libre en la ciudad de Praga y voluntarios sanos que pasan el 90% de su tiempo en interiores; pareados por edad y sexo, empleando el método citogenético convencional (Sram, R.J., *et al* 2007).

Estudios previos en cultivos celulares han documentado la presencia de PAHs clastógenos y mutágenos en material particulado ambiental tanto en áreas industriales como

residenciales en la ZMVM (Villalobos-Pietrini, R., *et al* 2006; Roubicek, D. A., *et al* 2007), adicionalmente se han desarrollado estudios in vivo que muestran mutaciones en genes, asociadas a exposición a contaminantes ambientales como los PAHs (tabla V), lo que enfatiza el riesgo a la salud que conlleva la exposición a la contaminación ambiental en la ciudad de México

Adicionalmente, se han reportado efectos respiratorios y sistémicos por exposición crónica a contaminación ambiental en niños que viven en la ciudad de México (Calderón-Garcidueñas, L., *et al* 2007), larga exposición a ozono, PM<sub>10</sub>, y NO<sub>2</sub> se ha asociado con deficiencias significativas en la función pulmonar medidas por espirometria (CVF: capacidad vital forzada; máximo volumen de aire que se puede expulsar durante una espiración forzada, tras una inspiración máxima. FEV1: volumen espirado en el primer segundo de una espiración forzada tras una inspiración máxima. Índice de Tiffenau: FEV1/CVF; el FEV1 expresado como porcentaje de CVF es un índice muy útil para determinar la limitación al flujo aéreo) en niños de edad escolar habitantes de la ciudad de México (Rojas-Martinez, R. *et al* 2007).

Adicional a las diferencias estacionales en los niveles de aductos, observamos un amplio rango de variaciones interindividuales en los niveles de aductos PAH-DNA y % de aberraciones cromosómicas en la población de estudio (Figura 7). Estas amplias variaciones interindividuales ya se han reportado en otros estudios (Nebert, D. W. and Dalton T. P. 2006; Whyatt, R. M., *et al* 2000; Gyorffy, E., *et al* 2008). Factores como la exposición acumulada y/o polimorfismos en enzimas de metabolismo que biotransforman los PAHs en metabolitos electrofílicos capaces de provocar daños en DNA, o polimorfismos en enzimas que conjugan dichos metabolitos con glutatión y los hacen hidrosolubles para ser excretados pueden afectar el rango de biomarcadores de exposición en las poblaciones.

Investigamos la edad como posible factor confusor puesto que se han reportado correlaciones positivas entre edad y niveles de aductos PAH-DNA en experimentos con animales (Randerath, K., *et al* 1986) y en tejido cerebral humano de individuos con rango de edad desde recién nacidos y hasta 100 años (Randerath, K., *et al* 1993). El rango de edad de los donantes de este estudio fue relativamente pequeño (19-40 años), y no encontramos correlación entre niveles de aductos y edad. Por otro lado, hay reportes de diferencias en las

tasas de formación y remoción de aductos entre hombres y mujeres (Ryberg, D., *et al* 1994). En nuestro análisis, no observamos diferencias por género, posiblemente debido a los niveles de exposición relativamente bajos en ambos grupos. Para eliminar o minimizar las variables confusoras tales como estilo de vida, polimorfismos genéticos, dieta y otras posibles variables que surgen cuando se analizan distintas cohortes, en este estudio longitudinal se colectaron las muestras de los mismos individuos en dos épocas del año distintas, de manera que cada individuo actuó como su propio control.

Al analizar el impacto de los alelos de riesgo, observamos que los individuos nulos para *GSTM1* que habitan en la porción SE mostraron asociación entre niveles de exposición a PM, y niveles de aductos en la época seca (Tabla II). Esta asociación resultó significativa probablemente debido al número de voluntarios que viven en esta región y sus niveles altos de exposición a PM en comparación con lo reportado en la región SO, que se exponen a un nivel significativamente menor de PM. Resultados similares de asociación entre genotipo, exposición y niveles de aductos se observaron en individuos ocupacionalmente expuestos (Schoket, B. *et al* 2001), fumadores (Ketelslegers, H. B., *et al* 2006) y población expuesta a contaminación ambiental (Binkova, B., *et al.* 2007). De igual forma, los voluntarios con genotipo *CYP1B1*\*3 que viven en la zona Noroeste (NO) mostraron una correlación significativa entre exposición a PM<sub>2.5</sub> y niveles de aductos a pesar del pequeño tamaño de muestra de este grupo, esta asociación refleja el impacto de la exposición en el trayecto, ya que de acuerdo con los datos recaudados en los cuestionarios, este grupo de voluntarios viaja diariamente de norte a sur a través de corredores en los que se han reportado altos niveles de PAHs. Hay reportes que indican que la mayor exposición a contaminantes ambientales ocurre durante el desplazamiento a través de avenidas de alto tránsito vehicular, en el trabajo de Marr, L. C., *et al* en 2004, se reportan concentraciones de PAH de entre 60 y 910 ng/m<sup>3</sup> en tres trayectos por diferentes rutas de exposición, todas partiendo del NO (Cuautitlán Izcalli). La ruta que reportó la mayor concentración de PAH fue de Cuautitlán a Tacuba (910 ng/m<sup>3</sup>), mientras que la ruta de menor concentración fue Cuautitlán Huauchinango, un poblado a 3h de la ciudad de México (170 ng/m<sup>3</sup>), donde el tráfico es menos denso que en la ZMVM.

Estas observaciones sugieren que los polimorfismos *GSTM1* nulo y *CYP1B1\*3* son relevantes en los niveles de aductos de DNA en leucocitos. La enzima *GSTM1* está involucrada en la conjugación de dihidro dioles epóxido de hidrocarburos aromáticos policíclicos con glutatión (Hayes, J. D., *et al* 2005), la variante alélica nula se asocia con la falta de expresión de una proteína funcional (Seidegard, J., *et al* 1990; Pemble, S., *et al* 1994), lo que incrementa las concentraciones de los dioles epóxido que forman aductos con el DNA. El alelo nulo de *GSTM1* es un polimorfismo relativamente frecuente en la población mexicana (Montero, R., *et al* 2007; Pérez-Morales, R., *et al* 2008). La enzima *CYP1B1* juega un papel importante en la oxidación de una variedad de carcinógenos como los PAHs y arilaminas (Shimada, T., *et al* 1996). El cambio del aminoácido leucina por valina en el codón 432 (*CYP1B1\*3*) se ha asociado con elevados niveles de aductos de DNA en leucocitos (Schoket, B., *et al* 2001).

Similar a lo reportado por Martullo, G. *et al* en 2003 y Ketelslegers H. B. *et al.* en 2006, observamos un efecto aditivo de los alelos de riesgo en la formación de aductos al correlacionar aductos con la sumatoria de los alelos de riesgo (Figura 8). Estos resultados enfatizan la importancia de estudiar la contribución simultánea de varios genotipos.

Diversos reportes (Binkova, B., *et al.* 2007; Nebert D. 2006; Rojas M. 2000; Schoket B. 2001; Ketelslegers 2006; Martullo 2003) sugieren que un solo gen (o polimorfismo) no puede explicar las variaciones interindividuales en los niveles de aductos. En este trabajo nos enfocamos en la combinación de los polimorfismos *CYP1A1\*2a*, *CYP1A1\*2c*, *CYP1A1\*4*, *CYP1B1\*3*, *GSTM1* y *GSTT1*, los cuales en la mayoría de los casos no tuvieron influencia en los niveles de biomarcadores en el análisis univariado, pero fueron significativos al explorar múltiples polimorfismos simultáneamente en un análisis multivariado, probablemente como consecuencia de sus interacciones.

Los datos de esta investigación indican que las interacciones de múltiples polimorfismos genéticos pueden explicar parte de las variaciones interindividuales en los niveles de aductos y que el análisis de varios genotipos simultáneamente es importante para obtener mejores evidencias de los mecanismos que modulan los niveles de aductos. Nuestros resultados se basan en observaciones en un número relativamente pequeño de individuos y se observa claramente que los valores de aductos PAH-DNA entre individuos

agrupados por variantes alélicas en enzimas metabólicas se sobrelapan, aun considerando que se trata de marcadores relevantes en el metabolismo de PAHs. Sin embargo se observaron claras y significativas diferencias estacionales en los niveles de aductos y aberraciones cromosómicas totales estimados en la mayoría de los grupos con los polimorfismos analizados (*CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP1A1\*4*, *CYP1B1\*3*, *GSTM1*, y *GSTT1*), así como una evidente correlación positiva entre niveles de aductos y la suma de alelos de riesgo en las dos épocas del año.

Aun faltan estudios de índices de contaminación ambiental y biomarcadores de exposición en poblaciones latinoamericanas con las que compartimos gran parte de nuestra historia evolutiva. La mayoría de los estudios enfocados a efectos de los contaminantes en la salud se han llevado a cabo en poblaciones europeas y de norteamérica (tabla VI), y sus frecuencias alélicas en enzimas de desintoxicación no se asemejan a las nuestras, por lo que las interacciones reportadas para otras poblaciones tienen que ser analizadas en otros grupos étnicos para establecer asociaciones metabólicas.

Por otro lado, en la ciudad de México no existen estándares de calidad del aire en relación con PAH o B(a)P, por lo que información referente a la presencia de estos compuestos en el ambiente de la ZMVM es escasa. Nuestro estudio longitudinal correlaciona exposición a estos compuestos carcinógenos con riesgo a la salud en la época seca (noviembre a mayo), debido sobre todo a la presencia de altas concentraciones de PM<sub>10</sub> y PAH en el ambiente (Tabla II). Estas observaciones podrían contribuir a implementar y mejorar medidas de prevención y protección para los habitantes del valle de México, como minimizar las emisiones vehiculares que son la principal fuente de PAH en la ZMVM (Marr, L. C., *et al* 2004).

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Beeson, W. L., Abbey, D. E. and Knutsen, S. F. (1998) Long-term concentrations of Ambient Air Pollutants and Incident Lung Cancer in California Adults: Results from the AHSMOG Study. *Environ. Health Perspect*, **106**, 813-22.
2. Sram, R. J. and Binkova, B. (2000) Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens. 1997–1999. *Environ. Health Perspect*. **108**, 57–70.
3. Hudson, R., Arriola, A., Martínez-Gómez, M. and Distel, H.(2006) Effect of air pollution on olfactory function in residents of Mexico City. *Chem Senses*, **31**, 79-85.
4. Calderón-Garcidueñas, L., Vincent, R., Mora-Tiscareño, A., Franco-Lira, M. Henríquez-Roldán, C., Barragán-Mejía, G., Garrido-García, L., Camacho-Reyes, L., Valencia-Salazar, G., Paredes, R., Romero, L., Osnaya, H., Villarreal-Calderón, R., Torres-Jardón, R., Hazucha, M. J. and Reed, W. (2007) Elevated Plasma Endothelin-1 and Pulmonary Arterial Pressure in Children Exposed to Air Pollution. *Environ Health Perspect*, **115**, 1248–1253.
5. Calidad del Aire de la Ciudad de México. 2008. Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México. Gobierno del Distrito Federal. Available from: <http://es.calameo.com/read/0001237272d928058fdee>
6. Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., Ferris, B. G., Speizer, F. E. (1993) An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1753–1759.
7. Pope, C. A., Thun, M. J., Namboodiri, M. M., Dockery, D. W., Evans, J. S., Speizer, F. E., Heath, C. W. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U. S. adults. (1995) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 669–674.
8. Katsouyanni, K., Samet, J. M., Anderson, H. R., Atkinson, R., Le Tertre, A., Medina, S., Samoli, E., Touloumi, G., Burnett, R. T., Krewski, D., Ramsay, T., Dominici, F., Peng, R. D., Schwartz, J., Zanobetti, A.; HEI Health Review Committee. (2009) Air pollution and health: a European and North American approach (APHENA). *Res Rep Health Eff Inst*Oct. **142**, 5-90.
9. Environmental Protection Agency, *Air Quality Criteria for Particulate Matter*. EPA/600/p-95/001aF-001cF, Office of Research and Development, Washington, DC, 1996.



10. USEPA. Integrated Risk Information System (IRIS) 2006. Available at EPA electronic database [www.epa.gov/ncea/iris](http://www.epa.gov/ncea/iris).
11. IARC. International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. IARC, Lyon, France, 2004.
12. Poirier, M. C. (2004) Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 630-637.
13. Inventario de emisiones de contaminantes tóxicos 2006. Available at: ([http://www.sma.df.gob.mx/inventario\\_emisiones/index.php?op=pub#](http://www.sma.df.gob.mx/inventario_emisiones/index.php?op=pub#))
14. INEGI 2005. (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Available at INEGI electronic database [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
15. Georgiadis, P. and Kyrtopoulos, S. A. (1999) Molecular epidemiological approaches to the study of the genotoxic effects of urban air pollution. *Mutation Res*, **428**, 91-98.
16. Marr, L. C., Grogan, L. A., Wöhrnschimmel, H., Molina, L. T. and Molina, M. J. (2004) Vehicle Traffic as a Source of Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure in the Mexico City Metropolitan Area. *Environ Sci Technol*, **38**, 2584–2592.
17. Snyder, R., Witz, G. and Goldstein, B. D. (1993) The toxicology of benzene. *Environ. Health Perspect.* **100**, 293–306.
18. Bond, A. E. (1986) *Self-service station vehicle refueling exposure study*. In: Proceedings of the 1986 EPA/APCA Symposium on Measurement of Toxic Air Pollutants, Air pollution Control Association, Pittsburgh, PA, 458–466.
19. Fishbein, L. (1998). Benzene: uses, occurrence, and exposure. In: Fishbein, L., O'Neill, O.K. (Eds.), *Environmental Carcinogens: Methods of Analysis and Exposure Measurement. Benzene and Alkylated Benzenes*, vol. 10. IARC Sci Publ No. 85, Lyon, France, pp. 67–108.
20. Rossi, A. M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G., Barale, R. (1999) Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics*. **9**, 445–451.
21. Verdina, A., Galati, R., Galasca, G. (2001) Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A* **64**, 607–18.

22. Carere, A., Andreoli, C., Galati, R., Leopardi, P., Marcon, F., Rosati, M. V., Rossi, S., Tomei, F., Verdina, A., Zijno, A., Crebelli, R. (2002) Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat. Res.* **518**, 215–224.
23. Leopardi, P., Zijno, A., Marcon, F., Conti, L., Carere, A., Verdina, A., Galati, R., Tomei, F., Baccolo, T. P., Crebelli, R. (2003) Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: Effects of exposure metabolic genotypes and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ. Mol. Mutagen.* **41**, 126–130.
24. Avogbe, P. H., Ayi-Fanou, L., Autrup, H., Loft, S., Fayomi, B., Sanni, A., Vinzents, P., Møller, P. (2005) Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis.* **26**, 613–620.
25. Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori A. C, Bonzini M, Bertazzi P. A, Foà V, Garte S, Farmer P. B, Levy L. S, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo D. F.(2005) Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**, 2237-44
26. Manini, P., De Palma, G., Andreoli, R., Poli, D., Mozzoni, P., Folesani, G., Mutti, A., Apostoli, P. (2006) Environmental and biological monitoring of benzene in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicol. Lett.* **167**, 142–151.
27. Chanvaivit, S., Navasumrit, P., Hunsonti, P., Autrup, H., Ruchirawat, M. (2007) *Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms.* *Mutat. Res.* **62**, 679–87.
28. Best, N., Cockings, S., Bennett, J., Wakefield, J., Elliott, P. (2001) Ecological regression analysis of environmental benzene exposure and childhood leukaemia: sensitivity to data inaccuracies, geographical scale and ecological bias. *J. R. Stat. Soc: Ser. A* **164**, 155–174.
29. Wallace, L. A. (1989) Major sources of benzene exposure. *Environ. Health Perspect.* **82**, 165–169.
30. NASA, 1990–1999. Spacecraft maximum allowable concentration. NASA, Johnston Space Center, Houston, TX.
31. Schoket B. (1999). DNA damage in humans exposed to environmental and dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res*, **424**, 143-153

32. Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colina, Z., Gómez-Arroyo, S., Bravo-Cabrera, J.L. and Frías-Villegas, A. (2006) Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles  $\leq 10 \mu\text{m}$  in southwest Mexico City. *Atmospheric Environ*, **40**, 5845-5857.
33. Nebert, D. W. and Dalton, T. P. (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis, *Nature Reviews Cancer*, **6**, 947-960.
34. Hayashi, S. I., Watanabe, J., Nakachi, K. and Kawajiri, K. (1991) PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acids Research*, **19**, 4797.
35. Keohavong, P., Lan, Q., Gao, W. M., Zheng, K. C., Mady, H. H., Melhem, M. F., Mumford, J. L. (2005) Detection of p53 and K-ras mutations in sputum of individuals exposed to smoky coal emissions in Xuan Wei County, China. *Carcinogenesis*. **26**, 303-8.
36. Georgiadis P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G, Atrup H, Demopoulos NA, Katsouyanni K, Sram R, Kyrtopoulos SA. (2005) Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis*. **26**, 93-101.
37. Rojas, M., Cascorbi I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G., Mayer, L., Kopp-Schneider, A., Roots, I. and Bartsch H. (2000) Modulation of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Carcinogenesis*. **21**, 135-41
38. Petersen, D. D., McKinney, C. E., Ikeya, K., Smith, H. H., Bale, A. E., McBride O. W., Nebert, D. W. (1991) Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *Am J Hum Genet*. **48**, 720-5.
39. Ma Q. and Lu A. Y. (2007) CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos*. **35**, 1009-16.
40. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, **45**, 51-88.
41. Ryberg, D., Skaug, V., Hewer A., Phillips, D. H., Harries, L. W., Wolf, C. R., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P., Haugen, A. (1997) Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* **18**, 1285-9.

42. Pérez-Morales, R., Castro-Hernández, C., Gonsebatt, M. E. and Rubio, J. (2008) Polymorphism of CYP1A1\*2C, GSTM1\*0, and GSTT1\*0 in a Mexican Mestizo Population: A Similitude Analysis. *Human Biology*, **80**, 457-465.
43. Montero, R., Araujo, A., Carranza, P., Mejía-Loza, V., Serrano, L., Albores, A., Salinas, J. E., Camacho-Carranza, R. (2007). Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol.* **79**, 299-312.
44. Taioli, E., Sram, R. J., Garte, S., Kalina, I., Popov, T. A. and Farmer, P. B. (2007) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage (EXPAH project): Description of the population under study. *Mutation Res*, **620**, 1-6.
45. Naufal, Z., Zhiwen, L., Zhu, L., Zhou, G-D., McDonald, T., Yu He, L., Mitchell, L., Ren, A., Zhu, H., Finnell, R. and Donnelly, K. C. Biomarkers of exposure to combustion by-products in a human population in Shanxi, China. (2009) *J of Exp Sci and Environ Epidemiol*, **20**, 310-319.
46. Georgiadis, P, Topinka, J, Stoikidou, M, Kaila S, Gioka M, Katsouyanni K, Sram, R, Autrup, H, Kyrtopoulos, S. A.; AULIS Network.(2001) Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis*. **9**: 1447-57.
47. Binkova, B., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Milcova, A., Tulupova, E., Farmer, P. B. and Sram, R. J. (2007) PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutation Res*, **620**, 49-61.
48. RAMA (Red Automática de Monitoreo ambiental) 2006. Available at: [www.sma.df.gob.mx/simat/pnrama2.htm](http://www.sma.df.gob.mx/simat/pnrama2.htm); <http://148.243.232.103/imecaweb/base datos.htm>)
49. Swafford, D. S., Nikula, K. J., Mitchell, C. E., Belinsky, S. A. (1995) Low frequency of alterations in p53, K-ras, and mdm2 in rat lung neoplasms induced by diesel exhaust or carbon black. *Carcinogenesis* **16**, 1215-21.
50. Belinsky, S. A., Swafford, D. S., Finch, G. L., Mitchell, C. E., Kelly, G., Hahn, F. F., Anderson, M. W., Nikula, K. J.(1997) Alterations in the K-ras and p53 genes in rat lung tumors. *Environ Health Perspect.* **105**, 901-6.

51. Iwai, K., Higuchi, K., Udagawa, T., Ohtomo, K., Kawabata, Y. (1997) Lung tumor induced by long-term inhalation or intratracheal instillation of diesel exhaust particles. *Exp Toxicol Pathol.* **49**, 393-401.
52. Sato, H., Sone, H., Sagai, M., Suzuki, K. T., Aoki, Y. (2000) Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis.* **21**, 653-61.
53. Perera, F., Hemminki, K., Jedrychowski, W., Whyatt, R., Campbell, U., Hsu, Y., Santella, R., Albertini, R., O'Neill, J. P. (2002) In utero DNA damage from environmental pollution is associated with somatic gene mutation in newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **10**, 1134-7.
54. Keohavong, P., Lan, Q., Gao, W. M., Zheng, K. C., Mady, H. H., Melhem, M. F., Mumford, J. L. (2005) Detection of p53 and K-ras mutations in sputum of individuals exposed to smoky coal emissions in Xuan Wei County, China. *Carcinogenesis.* **26**, 303-8.
55. Reliene, R., Hlavacova, A., Mahadevan, B., Baird, W. M., Schiestl, R. H. (2005) Diesel exhaust particles cause increased levels of DNA deletions after transplacental exposure in mice. *Mutat Res.* **570**, 245-52.
56. Perera, F. P., Hemminki, K., Gryzbowska, E., Motykiewicz, G., Michalska, J., Santella, R. M., Young, T. L., Dickey, C., Brandt-Rauf, P., De Vivo, I. (1992) Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature*, **360**, 256-8.
57. Nielsen, P.S., de Pater, N., Okkels, H., Autrup, H. (1996) Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers--effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. *Carcinogenesis.* **17**, 1021-7.
58. Peluso, M., Merlo, F., Munnia, A., Valerio, F., Perrotta, A., Puntoni, R., Parodi, S. (1998) <sup>32</sup>P-postlabeling detection of aromatic adducts in the white blood cell DNA of nonsmoking police officers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **7**, 3-11.
59. Pastorelli, R., Restano, J., Guanci, M., Maramonte, M., Magagnotti, C., Allevi, R., Lauri, D., Fanelli, R., Airoidi, L. (1996) Hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene diol-epoxide in newspaper vendors: association with traffic exhaust. *Carcinogenesis.* **17**, 2389-94.
60. Palli, D., Russo, A., Masala, G., Saieva, C., Guarrera, S., Carturan, S., Munnia, A., Matullo, G., Peluso, M. (2001). DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer.* **94**, 121-7.

61. Georgiadis, P., Topinka, J., Stoikidou, M., Kaila, S., Gioka, M., Katsouyanni, K., Sram, R., Autrup, H., Kyrtopoulos, S. A.; AULIS Network. (2001) Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis*, **22**, 1447-57.
62. Richter, E., Rösler, S., Scherer, G., Gostomzyk, J. G., Grübl, A., Krämer, U., Behrendt, H. (2001) Haemoglobin adducts from aromatic amines in children in relation to area of residence and exposure to environmental tobacco smoke. *Int Arch Occup Environ Health* **74**, 421-8
63. Sørensen, M., Autrup, H., Hertel, O., Wallin, H., Knudsen, L. E. and Loft, S. (2003) Personal Exposure to PM<sub>2.5</sub> and Biomarkers of DNA Damage *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **12**, 191–196.
64. Palli D, Russo A, Masala G, Saieva C, Guarrera S, Carturan S, Munnia A, Matullo G, Peluso M. (2001) DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer*. 94, 121-7.
65. Daly, A. K., Steen, V. M., Fairbrother, K. S. and Ilde, J. R. (1996) CYP2D6 multiallelism. *Methods Enzymol*, **272**, 199-210.
66. Divi, R. L., Beland, F. A., Fu, P. P., Von Tungeln, L. S., Schoket, B., Camara, J. E., Ghei, M., Rothman, N., Sinha, R. and Poirier, M.C. (2002) Highly sensitive chemiluminescence immunoassay for benzo[a]pyrene-DNA adducts: validation by comparison with other methods, and use in human biomonitoring. *Carcinogenesis*, **23**, 2043-2049.
67. Beland, F. A., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Poirier, M. C., Schoket, B. and Marques, M. M. (1999) Synthesis, characterization, and quantitation of a 4-aminobiphenyl–DNA adduct standard. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 68–77.
68. Gonsebatt, M. E., Salazar, A. M., Montero, R., Díaz Barriga, F., Yáñez, L., Gómez, H. and Ostrosky-Wegman, P. (1995) Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in Mexico. *Environ Health Perspect*, **103** suppl. 1, 111–113.
69. Abdel-Rahman, S. Z., El-Zein, R. A., Anw, W. A. and Au, W. W. (1996) A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*, **107**, 229-233.

70. Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N. and Watanabe, J. (1990). Identification of genetically high individuals to lung cancer by DNA polymorphism of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS*, **263**, 131-133.
71. Cascorbi, I., Brockmöller, J. and Roots, I. A (1996) C4887A Polymorphism in Exon 7 of Human CYP1A1: Population Frequency, Mutation Linkages, and Impact on Lung Cancer Susceptibility, *Cancer Res*, **56**, 4965-4969.
72. Bailey, L. R., Rood, N., Dupont, W. D. and Parl, F. F. (1998) Association of Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) Polymorphism with Steroid Receptor Status in Breast Cancer. *Cancer Res*, **58**, 5038-5041.
73. Weston, A., Manchester, D. K., Poirier, M. C., Choi, J. S., Trivers, G. E., Mann, D. L., and Harris, C. C. (1989) Derivative fluorescence spectral analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta. *Chem Res Toxicol*, **2**, 104- 108.
74. Mugica, V., Hernández, S., Torres, M. and García, R. (2010) Seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure levels in Mexico City. *J of Air & Waste Management Ass*, **60**, 548-55.
75. Sram, R. J., Beskid, O., Rossnerova, A., Rössner, P., Lnenickova, Z., Milcova, A., Solansky, I. and Binkova, B. (2007) Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons—The interpretation of cytogenetic analysis by FISH. *Toxicology Letters*, **172**, 12–20.
76. Roubicek, D. A., Gutiérrez-Castillo, M. E., Sordo, M., Cebrián-García, M. E. and Ostrosky-Wegman, P. (2007) Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutation Res*, **631**, 9-1.
77. Rojas-Martinez, R., Perez-Padilla, R., Olaiz-Fernandez, G., Mendoza-Alvarado, L., Moreno-Macias, H., Fortoul, T., McDonnell, W., Loomis, D. and Romieu, I. (2007) Lung Function Growth in Children with Long-Term Exposure to Air Pollutants in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med*, **176**, 377-384.
78. Gyorffy, E., Anna, L., Kovács, K., Rudnai, P. and Schoket, B. (2008) Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. *Mutagenesis*, **23**, 1-18.
79. Randerath, K., Reddy, M. V. and Disher, R. M. (1986) Age- and tissue-related DNA modifications in untreated rats: detection by <sup>32</sup>P-postlabeling assay and possible significance for spontaneous tumor induction and aging. *Carcinogenesis*, **7**, 1615-1617.

80. Randerath, K., Putman, K. L., Osterburg, H. H., Johnson, S. A., Morgan, D. G. and Finch, C. E. (1993) Age-dependent increases of DNA adducts (I-compounds) in human and rat brain DNA. *Mutation Res*, **295**, 11-18.
81. Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H. and Haugen, A. (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res*, **54**, 5801-5803.
82. Schoket, B., Papp, G., Lévy, K., Mracková, G., Kadlubar, F. F. and Vincze, I. (2001) Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutation Res*, **482**, 57-69.
83. Ketelslegers, H. B., Gottschalk, R. W., Godschalk, R. W., Knaapen, A. M., van Schooten, F. J., Vlietinck, R. F., Kleinjans, J.C. and van Delft, J. H. (2006) Interindividual variations in DNA adduct levels assessed by analysis of multiple genetic polymorphisms in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**, 624-9.
84. Seidegard, J., Pero, R. W., Markowitz, M. M., Roush, G., Miller, D. G. and Beattie, E. J. (1990) Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class A) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis*, **11**, 33-6.
85. Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hallier, E., Bolt, H. M., Ketterer, B. and Taylor, J. B. (1994) Human glutathione S-transferase u (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, **15**, 271-6.
86. Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich. F. P. and Sutter, T. R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.*, **56**, 2979-2984.
87. Martullo, G., Peluso, M., Polidoro, S., Guarrera, S., Munnia, A., Krogh, V., Masala, G., Berrino, F., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P. and Palli, D. (2003). Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 674-7.
88. Ishibe, N., Wiencke, J K., Zuo, Z., McMillan, A., Spitz, M. and Kelse, K. T. (1997) Susceptibility to Lung Cancer in Light Smokers Associated with *CYP1A1* Polymorphisms in Mexican- and African-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **6**, 1075-80.
89. Whyatt, R. M., Perera, F. P., Jedrychowski, W., Santella, R. M., Garte, S. and Bell, D. A. (2000) Association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct levels in maternal and newborn white blood cells and glutathione S-



transferase P1 and CYP1A1 polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 207-212.

90. Wang, S., Chanock, S., Tang, D., Li, Z., Jedrychowski, W. and Perera, F. P. (2008) Assessment of interactions between PAH exposure and genetic polymorphisms on PAH-DNA adducts in African American, Dominican, and Caucasian mothers and newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **17**, 405–413.
91. Lodovici, M., Luceri, C., Guglielmi, F., Bacci, C., Akpan, V., Fonnesu, M.L., Boddi, V., Dolara, P. (2004). Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **13**, 1342-8.