



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE POSGRADO EN
CIENCIAS DE LA TIERRA**

**“MEDICIÓN DEL POTENCIAL OXIDANTE DE PM₁₀ DE LA
ZONA METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO POR
RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA
SOMETIDAS A CALENTAMIENTO Y SU RELACIÓN CON
LA OXIDACIÓN DE LDL”**

T E S I S

Que como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA TIERRA
(Fisicoquímica de la Atmósfera)

P R E S E N T A

IQ. Raúl Omar Quintana Belmares

JURADO EXAMINADOR

Dr. Álvaro Román Osornio Vargas (Director de Tesis)
Dra. Irma Aurora Rosas Pérez (Presidente)
Dra. Telma Gloria Castro Romero (Vocal)
Dr. Ricardo Torres Jardón (Suplente)
MC. Virginia Gómez Vidales (Suplente)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO EXAMINADOR

DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ (Presidente)

DRA. TELMA GLORIA CASTRO ROMERO (Vocal)

DR. ÁLVARO R. OSORNIO VARGAS (Secretario)

DR. RICARDO TORRES JARDÓN (Suplente)

MC. VIRGINIA GÓMEZ VIDALES (Suplente)

DIRECTOR DE TESIS

DR. ÁLVARO R. OSORNIO VARGAS

SUSTENTANTE

IQ. RAÚL OMAR QUINTANA BELMARES

DEDICATORIA

A mis hijos Oriol y Fabrizio, y a mi esposa Fabiola, por su amor,
deben saber que son una parte muy importante en mi vida
y me dan ese aliento para trascender, los amo.

A mi madre María Luisa y a mi hermano Saúl Armando,
porque siempre salimos adelante, los amo.

A toda mi gran familia.

A todos mis maestros.

A mi siempre Gloriosa UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Álvaro R. Osornio Vargas, por todo su apoyo, tiempo y dedicación al desarrollo y dirección de este trabajo de investigación, siendo un excelente maestro y amigo, y por quien tengo gran admiración por su trayectoria.

En la parte técnica agradezco ampliamente las aportaciones de la Biol. Laura Sevilla Tapia en la obtención y cuantificación de LDL y a la QFB. M. Inés Vázquez López por su ayuda en la técnica oxidación de LDL.

Al jurado por aceptar ser parte y por las valiosas aportaciones que hicieron para enriquecer esta tesis: Dra. Irma A. Rosas Pérez, Dra. Telma Castro Romero, Dr. Ricardo Torres Jardón, MC. Virginia Gómez Vidales y Dr. Álvaro Osornio.

Al Instituto Nacional de Cancerología y a sus autoridades, por permitirme ser parte de su plantilla de investigadores y por las facilidades para realizar este trabajo en el Laboratorio de Toxicología Ambiental. Así mismo a los investigadores Dra. Claudia García Cuéllar, Dra. Natalia Manzano León, Dra. Angélica Montiel Dávalos y en especial al Dr. Ernesto Alfaro Moreno, por brindarme su apoyo y conocimientos en el desarrollo y conclusión de mi trabajo de tesis.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, por permitirme ser parte del posgrado: a todos sus profesores, en especial a la Dra. Irma Rosas, por su apoyo incondicional, y a mis compañeros MC. José García Yee y MC. Hugo Barrera.

Al Instituto de Química, UNAM, por las facilidades para trabajar en el Laboratorio de Resonancia Paramagnética Electrónica, y en especial a la MC. Virginia Gómez Vidales, por su valiosa experiencia para lograr esta tesis.

Al Instituto de Física, UNAM, al Dr. Javier Miranda Martín del Campo y al Dr. Valter A. Barrera López por su ayuda con la parte experimental de PIXE.

Al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, al Dr. Jaime Mas Oliva, por las facilidades para trabajar en su laboratorio.

A la campaña MILAGRO, en especial a la Dra. Luisa T. Molina y al Dr. Benjamin de Foy por sus aportaciones a este trabajo.

Al CONACyT, por el apoyo económico para la realización de esta investigación durante mis estudios de maestría (212696 y M43138).

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	10
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	24
5. MÉTODOS	25
5.1. MUESTREO Y RECUPERACIÓN DE PARTÍCULAS	25
5.2. ANÁLISIS ELEMENTAL DE PM₁₀ POR PIXE	27
5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPECIES PARAMAGNÉTICAS EN PM POR RPE	27
5.4. GENERACIÓN DEL RADICAL HIDROXILO (•OH) PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD OXIDANTE DE LAS PM POR EL MÉTODO DE RPE	29
5.5. CÁLCULO DE LA INTENSIDAD DEL POTENCIAL OXIDANTE	30
5.6. OBTENCIÓN DE LDL A PARTIR DE PLASMA HUMANO	30
5.7. OXIDACIÓN DE LDL EXPUESTAS A PM₁₀	32
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
6. RESULTADOS	35
6.1. COMPOSICIÓN ELEMENTAL	35
6.2. ESPECIES PARAMAGNÉTICAS PRESENTES EN LAS PM₁₀	36
6.3. POTENCIAL OXIDANTE	41
6.4. OXIDACIÓN DE LDL EXPUESTAS A PM₁₀	43
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIONES	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51
10. ANEXOS	56
ANEXO 1. ARTÍCULO	35
ANEXO 2. SITIOS DE MUESTREO	36
ANEXO 3. LABORATORIOS	41
ANEXO 4. ESPECTROS RPE	43

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BHT	3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
CE	Carbono Elemental
CO	Carbono Orgánico
DMPO	5,5-Dimetil-1-Pirrolina N-Oxido
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad, del inglés <i>High Density Lipoproteins</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDL	Lipoproteínas de Intermedia Densidad, del inglés <i>Intermediate Density Lipoproteins</i>
IMP	Instituto Mexicano del Petróleo
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad, del inglés <i>Low Density Lipoproteins</i>
MDA	Malondialdehído
MILAGRO	Iniciativa Megaciudades: Observaciones de Investigación Locales y Globales, del inglés <i>Megacities Initiative: Local And Global Research Observations</i>
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, del inglés <i>National Institute of Standards and Technology</i>
•OH	Radical Hidroxilo
PBS	Búfer de Fosfato Salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	Análisis de Componentes Principales, del inglés <i>Principal Component Analysis</i>
PIXE	Inducción de Partículas por Emisión de Rayos X, del inglés <i>Particle-Induced X-ray Emission</i>
PM	Material particulado, del inglés <i>Particulated Material</i>
PM ₁₀	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤ 10 μM
PM _{2.5}	Material particulado con diámetro aerodinámico ≤ 2.5 μM
PO	Potencial Oxidante
PUFA	Ácido graso poliinsaturado, del inglés <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>

RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
T ₀	Tiempo 0, zona urbana
T ₁	Tiempo 1, sitio receptor zona suburbana
TBA	Ácido Tiobarbitúrico, del inglés <i>Thiobarbituric Acid</i>
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad, del inglés <i>Very Low Density Lipoproteins</i>
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

1. RESUMEN

Diversos estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han demostrado que el material particulado (PM) produce diversos daños biológicos. Algunos estudios sugieren que esto podría deberse a la capacidad oxidante de dicho PM. Podemos mencionar, por ejemplo, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis secundaria a la exposición a PM. Dentro de los múltiples componentes presentes y posibles responsables de su potencial oxidante (PO), están los metales de transición y algunos componentes orgánicos.

El objetivo de esta investigación fue evaluar, por medio de RPE, la variación del PO de PM₁₀ de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) tratadas a diferentes temperaturas como una alternativa para conocer la posible influencia de los metales pesados, material orgánico, su relación con la composición elemental y con la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un modelo biológico. Las PM₁₀ se sometieron a calentamiento usando diferentes temperaturas para determinar si el tratamiento alteraría a los compuestos que pudieran ser responsables del PO de las PM₁₀.

Se tomaron muestras de PM₁₀ en membranas de nitrocelulosa todos los días de marzo de 2006, utilizando muestreadores de alto volumen, esto como parte de la campaña MILAGRO. Dicho procedimiento se llevó a cabo en dos sitios, uno urbano (T₀), ubicado en el Instituto Mexicano del Petróleo (D.F.), y un receptor semiurbano (T₁), en la Universidad Tecnológica de Tecámac (UTTEC, en el Estado de México). Las muestras diarias, fueron recuperadas de las membranas por medios físicos y, se agruparon en una sola muestra de acuerdo con el sitio de muestreo. Se realizó el análisis elemental por PIXE (Peletrón de 3 MeV) utilizando 1 mg de PM₁₀. Se identificaron 17 elementos; con ellos se realizó un análisis de componentes principales y de este se obtuvo como resultado dos componentes: **C1** (Al, Si, P, S, K y Ni) y **C2** (Zn y Cu).

Para explorar la participación de algunos compuestos semivolátiles y volátiles en el PO de las PM, se sometieron alícuotas de las muestras de PM₁₀ a diferentes temperaturas (25, 37, 50, 100 y 175 °C por 30 min). Se midieron las especies paramagnéticas de metales y compuestos orgánicos antes y después del tratamiento con temperatura. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de Resonancia Paramagnética Electrónica JEOL JES-TE-300 en presencia de un atrapador de radicales •OH (DMPO 0.2M) y de H₂O₂ (0.5M). La señal de las especies paramagnéticas aumentó hasta 50 % después del tratamiento con temperatura a 175°C (p<0.05). Los resultados de RPE en presencia de DMPO y H₂O₂ indican que la generación de •OH por PM₁₀ fue mayor para T₀ que T₁ (p<0.05). El tratamiento térmico no modificó la concentración de •OH generado.

Para estudiar el PO de las PM₁₀ en un sistema biológico, se obtuvieron LDL de plasma humano, las cuales se expusieron a 80 µg de PM₁₀/mg de proteína durante 24 horas y se cuantificó el grado de oxidación por el ensayo de malondialdehído (MDA). Las LDL fueron oxidadas mayormente por las PM₁₀ de T₀ (p<0.05); no se observaron diferencias después del tratamiento térmico de las partículas.

Estos resultados indican que el PO de PM₁₀ se vincula con los componentes no volátiles, y que los metales tienen una injerencia importante, ya que la generación de •OH (radical hidroxilo) por PM₁₀ es dependiente de H₂O₂. La oxidación de las LDL inducida por PM₁₀ se correlaciona con lo encontrado por RPE: en ambos casos la oxidación es mayor en las partículas de la zona urbana (T₀) que las de la zona semiurbana (T₁).

Parte de este trabajo de investigación ha sido publicado en: Quintana, R., *et al.*, 2011. *The oxidative potential and biological effects induced by PM₁₀ obtained in Mexico City and at a receptor site during the MILAGRO Campaign.* Environmental Pollution. 159: 3446-3454. (ver "Anexo 1").

2. INTRODUCCIÓN

PARTÍCULAS SUSPENDIDAS (PST, PM₁₀ Y PM_{2.5})

Las partículas contaminantes se dividen en PST (Partículas Suspendidas Totales), que contienen, a su vez, cada una de las siguientes fracciones: PM₁₀ (aquéllas con diámetros aerodinámicos promedio igual o menor que 10 μm); partículas gruesas o PM_{10-2.5} (que tienen diámetros aerodinámicos promedio entre 10 y 2.5 μm), las cuales se depositan en vías aéreas profundas como bronquios y bronquiolos; partículas finas o PM_{2.5} (presentando diámetros aerodinámicos promedio iguales o menores que 2.5 μm), que pueden llegar hasta los alveolos; finalmente, las partículas ultrafinas o PM_{0.1} (con diámetros aerodinámicos promedio iguales o menores que 100 nm), que incluso pueden penetrar y pasar al torrente sanguíneo (Krewski *et al.* 2009; Pope *et al.*, 2002, Alfaro-Moreno *et al.*, 2002).

Las principales fuentes de emisión de partículas a la atmósfera son las antropogénicas: industrias, quema de combustibles y móviles ligadas al transporte, además de aquéllas de origen geológico: erosión del suelo, por vientos o tolveneras, suspensión de partículas provenientes de las zonas agrícolas, calles sin pavimentar, etc.

Las PM no sólo varían en cuanto al tamaño, sino también en cuanto a su composición. Esta cuestión depende básicamente de las fuentes de emisión y de las características geográficas de la región. La mayor parte de los registros que se hacen rutinariamente son de masa y tamaño de las PM.

Las PM₁₀ son contaminantes, criterio de gran importancia en la ZMVM debido a que durante la temporada de secas se excede frecuentemente su norma de 120 µg/m³ promedio en 24 horas (previsto por la NOM-025-SSA1-1993). En este sentido, existen técnicas de monitoreo que permiten identificar cuándo se rebasa dicha norma para, subsecuentemente, aplicar alguna medida para aminorar la exposición por parte de la población a dichas PM. Uno de los procedimientos más utilizados para la captación y muestreo de contaminantes sólidos es la retención de partículas por inercia (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009).

EFFECTOS DE LAS PM EN LA SALUD

Se ha demostrado que la contaminación atmosférica por PM tiene una correlación importante con el aumento de la mortalidad y la morbilidad cardiopulmonar, incluyendo cáncer de pulmón. Estudios experimentales indican que los efectos biológicos inducidos por las PM están relacionados con su PO. Entre los efectos de PM que se relacionan con el mencionado PO se encuentran: daño en el DNA y la peroxidación lipídica (LDL), efectos que han sido vinculados con la masa y el tamaño de las PM, ya que éstas son las variables que se monitorean rutinariamente en los entornos urbanos (Krewski *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2009; Osornio-Vargas *et al.*, 2003).

La gran variación que existe en la mezcla de los compuestos presentes en las PM hace que su composición sea muy diferente de acuerdo con el sitio de muestreo. Asimismo, se ha observado que los efectos inducidos por ellas son heterogéneos y varían de acuerdo con la temporada y estación del año (Atkinson

et al., 2010; Tong *et al.*, 2010; Alfaro-Moreno *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2009; Zanobetti *et al.*, 2009; Bell *et al.*, 2007, 2008).

Estudios ambientales en diferentes ciudades del mundo muestran una asociación directa entre el aumento de las concentraciones de PM y el incremento de visitas a salas de emergencia de hospitales. Esto se debe, principalmente, a agravamientos de afecciones pulmonares y cardiovasculares preexistentes, lo cual trae como consecuencia la muerte en personas que padecen dichas afecciones (Pope *et al.*, 2002). Otros estudios sugieren un incremento de enfermedades respiratorias en niños y adultos durante episodios con altas concentraciones de PM. En niños, estas enfermedades pueden tener consecuencias a largo plazo (Schwartz *et al.*, 2001).

Un estudio relacionado con la concentración, composición y efectos en la salud realizado en Londres indicó que los efectos cardiovasculares están asociados con las concentraciones de partículas, mientras que los efectos en las vías respiratorias están asociados con sodio, nitrato de amonio, sulfato, cloruro y el carbono orgánico (CO) presente en las PM (Atkinson *et al.*, 2010). La mayor parte de la evidencia existente sobre la composición de PM y su toxicidad está relacionada con los efectos nocivos para la salud basados en dicha composición de acuerdo con la temporada y las fuentes locales.

El transporte a larga distancia de PM es un factor adicional que puede afectar la mezcla compleja de las partículas. Estudios realizados en España indican que el polvo proveniente del Sahara puede enriquecer la mezcla de las PM muestreadas en Barcelona. Esto puede aumentar el riesgo de mortalidad a causa de la influencia del Sahara (Pérez *et al.*, 2008). Otro punto más que se puede

mencionar se encuentra en Asia, específicamente en China, donde la nube amarilla formada por el polvo del desierto continental mezclado con contaminantes antropogénicos y biológicos puede llegar a distintas regiones orientales, relacionándose también con un aumento de la mortalidad e ingreso a hospitales por enfermedades cardiovasculares y respiratorias (Chen *et al.*, 2010; Hashizume *et al.*, 2010).

CAMPAÑA MILAGRO

Como parte de investigación de campo, cuyos esfuerzos se concentraron en estudiar el impacto de la pluma de contaminación en la ciudad de México a niveles local, subregional y regional, la campaña MILAGRO se dedicó a estudiar la atmósfera de una megaciudad, la cual se define como aquella con más de 10 millones de habitantes y de gran extensión, sin importar sus barreras físicas, políticas o geográficas, unida una con otra principalmente por cuestiones comerciales (Molina *et al.*, 2007). En esta campaña participaron científicos provenientes de varias partes del mundo, y para su realización se utilizaron aviones, globos, torres meteorológicas, muestreadores de partículas y otros instrumentos para analizar la atmósfera.

La contaminación del aire que se genera en las megaciudades es lo suficientemente potente como para afectar los estados del clima en todo el planeta, de ahí la importancia de tales estudios. En conjunto, esta campaña ha proporcionado la caracterización más completa en cuanto a la composición y química de la atmósfera de la ZMVM, así como de su impacto regional. Se

requerirán de años para analizar y evaluar en su totalidad las mediciones obtenidas. (Molina *et al.*, 2010).

Para citar ejemplos de las mediciones realizadas durante la campaña MILAGRO, fueron mediciones en la meteorología y la dinámica atmosférica, emisiones de gases y partículas, fuentes y concentraciones de compuestos orgánicos volátiles, fotoquímica urbana y regional, propiedades radiactivas de aerosoles, la caracterización de la pluma urbana y los estudios de la salud (Molina *et al.*, 2010; Salcedo *et al.*, 2006).

Particularmente en este estudio se realizaron experimentos *in vitro* relacionados con los cambios en la composición de PM₁₀, el PO y los efectos toxicológicos (hemólisis, degradación del DNA, oxidación de LDL) (Quintana *et al.*, 2011).

Se determinaron dos sitios de muestreo con las denominaciones T₀ (tiempo cero) y T₁ (tiempo uno), las cuales hacen referencia al transporte de la pluma urbana de diferentes puntos del espacio y el tiempo (Kleinman *et al.*, 2008).

El sitio T₀ se encuentra en la parte norte de la ciudad de México: latitud 19°29' N, longitud 99°09' E, y a una altitud de 2 240 m sobre el nivel del mar. El IMP es un complejo de alrededor de 30 edificios situado en una zona industrial, residencial y comercial, circundado por avenidas altamente transitadas por vehículos ligeros a gasolina y autobuses a diesel (Marley *et al.*, 2009).

El sitio T₁, por su parte, se localiza a 38.5 km al noroeste respecto de T₀ (latitud 19°43' N y longitud 98°58' E), en la UTTEC. Dicha universidad es un complejo de 5 edificios rodeado por pastizales y terracería y una carretera federal, por la cual transitan vehículos particulares a gasolina, además de otros tantos a

diesel, que son principalmente para el transporte de pasajeros y de carga. La institución se encuentra en el municipio de Tecámac. Es una zona comercial, con algunas industrias, considerada una zona semiurbana, ya que cuenta con algunas calles sin pavimentar (Marley *et al.*, 2009).

Si bien uno de los objetivos de la campaña MILAGRO consistía en observar el impacto de la pluma de contaminantes del sitio T_0 sobre T_1 , en el presente estudio sólo se evaluó el comportamiento de las PM_{10} en estos dos puntos, para de esta manera , poder diferenciar la composición de elementos y algunos efectos toxicológicos de cada sitio. Como parte adicional a este trabajo, en otro estudio publicado con anterioridad, evaluamos la influencia de la pluma contaminante de T_0 sobre T_1 , y los resultados indicaron que los patrones de ventilación tuvieron poco efecto en la composición de las PM_{10} , así como en los efectos biológicos (Quintana *et al.*, 2011). Ver “Anexo 1”.

De Foy *et al.* (2008) realizaron la clasificación y agrupamiento de los patrones de viento durante la campaña de campo utilizando WRF-FLEXPART. En general, todos los días presentaban flujos similares de ventilación en la ZMVM. Hubo un predominio del transporte desde el norte y noreste; en estos episodios la pluma urbana fue trasladada al sur y no a T_1 durante los periodos del 1-7, 14-17 y 22-30 de marzo. En los días en influencia de T_0 sobre T_1 , el transporte avanzaba desde el este y sureste por la mañana, y desde el sur y suroeste por la tarde hacia T_1 en dos periodos, del 8-13 y 18-21 de marzo.

En general, la influencia durante el día se mostraba más homogénea, comprendida por fuertes vientos del suroeste; dicha influencia llevó los vientos de superficie sobre la cuenca, lo cual trajo como resultado una zona de convergencia

norte-sur. Esta zona de convergencia correspondía a una región de mayor carga contaminante que movía la pluma hacia el noreste durante la tarde. Por el contrario, los días de no influencia eran más heterogéneos, subdivididos en tres modelos diferentes: un fuerte flujo hacia el sur a lo largo de la cuenca, vientos del noroeste que fueron asociados con el transporte de superficie hacia el sur, y un componente débil de viento del norte con lluvias en el sur de la cuenca (De Foy *et al.*, 2009 y 2008).

Lo anterior es consecuencia de que el transporte del viento en la cuenca de México es muy complejo, con fuertes variaciones diurnas todos los días y que exceden la magnitud de las variaciones de escala sinóptica de un día a otro.

POTENCIAL OXIDANTE

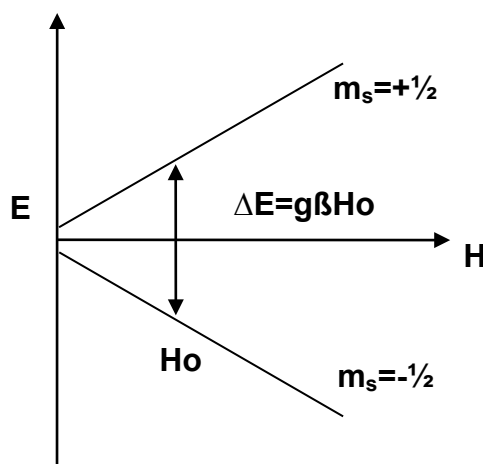
El PO se relaciona con la generación de las ROS como HO₂ (perhidróxilo), O₂^{•-} (radical superóxido), •OH (radical hidroxilo), ¹O₂ (oxígeno singulete). Las ROS son generadas por reacciones Red-Ox en las que las especies paramagnéticas (metales, compuestos orgánicos) podrían tener una participación importante como donadores de electrones. Bajo estas consideraciones, la medición de las especies paramagnéticas o las ROS relativas a las PM pueden ser utilizadas como marcador de su PO.

Entre los componentes de las PM, se encontraron metales de transición y compuestos orgánicos que pueden ser fácilmente identificados con el análisis de RPE. Cuando una especie paramagnética no es estable (como las que se encuentran en las ROS), ésta puede ser fácilmente detectadas mediante técnicas alternativas, como el uso de “atrapadores de espín”: el más utilizado es el DMPO

(Shi *et al.* 2003^a). En el presente estudio se utilizó un análisis cuantitativo de las especies paramagnéticas PM₁₀ y el PO (generación de •OH) y su correlación con la oxidación de LDL (*in vitro*) y el contenido elemental.

RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

La RPE es una técnica espectroscópica que se basa en el efecto Zeeman electrónico (Figura 1), el cual consiste en el desdoblamiento de los estados de espín del electrón por efecto de un campo magnético, por lo tanto, sólo es aplicable a muestras que contengan electrones desapareados. Esta técnica también permite caracterizar de manera magnética todo tipo de compuestos con metales de transición que por su estructura electrónica contengan electrones desapareados en capas d o f y que dependen directamente de su estado de oxidación; los más comúnmente detectados son: Cr⁺³, Fe⁺³, Mn^{+2,+4}, Co⁺², Ni⁺², Cu⁺², V^{+2,+4}; el Ni en alguna geometría octaédrica (Rojo *et al.*, 1997).



$E = h\nu$

$h =$ constante de Planck

$\nu =$ frecuencia

Figura 1. Efecto Zeeman electrónico. Transición dipolar magnética de un electrón libre en un campo magnético H: E (energía), H y H₀ (campo magnético), g (constante giromagnética), β (constante de Boltzman), m_s (espín magnético).

Una gran ventaja de la técnica de RPE es que las muestras pueden medirse en cualquier estado físico de la materia utilizando cantidades relativamente pequeñas de partículas: alrededor de 1 mg para sólidos, y 0.3 mL en el caso de líquidos; es una técnica no destructiva, además de que puede abordar problemas de control del medio ambiente gracias a su sensibilidad y gran capacidad analítica, pues tiene la capacidad de detectar productos que pueden encontrarse en muestras de aire: metales de transición, radicales libres, orgánicos estables del tipo semiquinonas y ROS capaces de ser generados por PMs (Shi 2003^a; Valavanidis *et al.*, 2000).

La RPE se basa en la interacción entre el campo magnético externo aplicado y el momento magnético intrínseco que posee el electrón (Abragam, 1970). Los espectros de RPE consisten en líneas provenientes de diferentes transiciones electrónicas, las cuales en algunos casos pueden dividirse en subgrupos debido a la interacción con el momento magnético nuclear del ion paramagnético.

Cuando el centro paramagnético contiene uno o más núcleos con un espín nuclear distinto de cero ($I \neq 0$), la interacción entre el electrón desapareado y el núcleo con $I \neq 0$ da origen a posteriores desdoblamientos de las energías Zeeman y, consecuentemente, a nuevas transiciones responsables de la llamada estructura hiperfina de espectro de RPE. Para el caso del Hidrógeno, el valor de espín nuclear es $\frac{1}{2}$ ($I_H = \frac{1}{2}$), por lo que puede asumir dos posibles orientaciones $M_{I_H} = +\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$.

Así, el momento magnético nuclear desdobla posteriormente cada nivel Zeeman en dos subniveles de acuerdo con la regla de selección de RPE $\Delta M_S = \pm 1$, $\Delta M_I = 0$, y permite únicamente dos transiciones; y por lo tanto, el espectro de

RPE del átomo de hidrógeno está compuesto por dos líneas resonantes separadas por aproximadamente 508 gauss. La espectroscopia de RPE detecta la energía de microondas absorbida por espines electrónicos que se encuentran en el estado basal al pasar al estado excitado (Figura 2A); finalmente, el espectro obtenido representa la primera derivada de la curva de absorción (Figura 2B), para fines prácticos, ya que de esta manera es más preciso obtener la medida de constantes de acoplamiento (A). A partir de lo dicho anteriormente, es importante conocer los valores de espín nuclear para los átomos más comunes, por ejemplo: $I_{Cu} = 3/2$, $I_{Fe} = 5/2$, $I_{Mn} = 5/2$, $I_N = 1$, $I_H = 1/2$.

Con la siguiente expresión puede calcularse de manera práctica el número de líneas esperadas dada la interacción del electrón con un núcleo: $2nI + 1$

n = número de núcleos que interaccionan

I = espín nuclear del núcleo

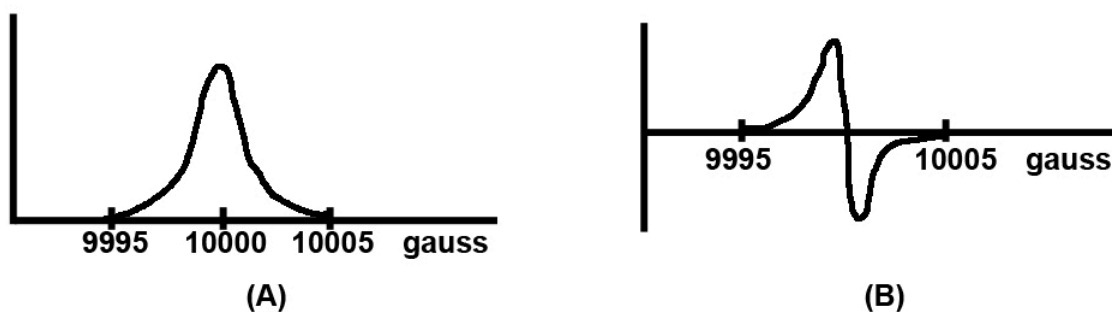


Figura 2. (A) absorción (B) 1ª derivada.

Para que un radical libre pueda detectarse por el método convencional de RPE, necesita ser estable, y tal estabilidad se le confiere al estar en sistemas insaturados conjugados, por ejemplo, semiquinonas (Figura 3).

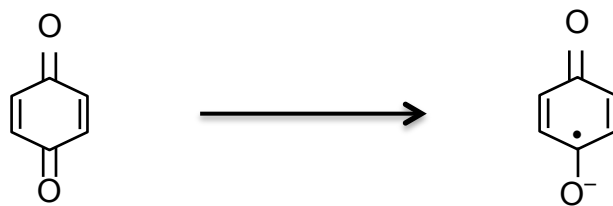


Figura 3. Benzoquinona (semiquinona).

Cuando no hay este tipo de sistemas, por ejemplo en las ROS, es necesario utilizar atrapadores de espín. Los atrapadores de espín son compuestos diamagnéticos del tipo N-óxidos que son capaces de reaccionar con las ROS y formar aductos de radicales más estables, que, además de detectar su presencia, posibilitan su identificación, ya que los espectros obtenidos para cada caso tienen patrones de acoplamiento bien caracterizados para cada especie. El atrapador de espín más utilizado es el DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), el cual permite identificar radicales libres de vida media-corta, y los atrapadores de espín permiten tener el tiempo suficiente para su detección (Shi 2003^b).

Como se ha expuesto, el uso de atrapadores de radicales libres (como el DMPO) en la RPE permite la detección de ROS también por medio de la reacción de tipo Fenton (Figura 4), que permite evidenciar el PO de las PM (Uchida 1999; Schurath 1998).

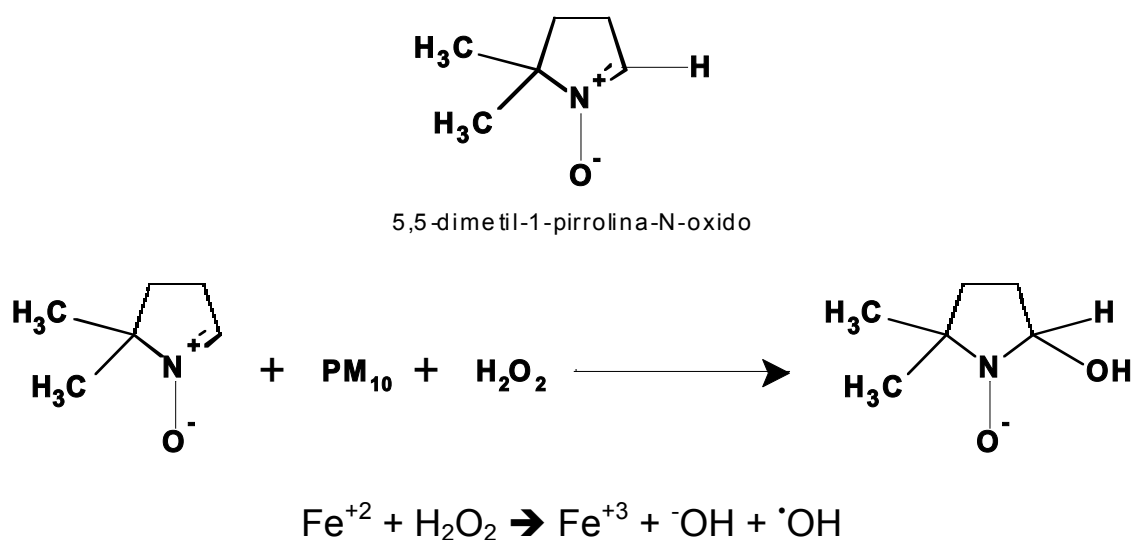


Figura 4. Reacción tipo Fenton. Se muestra la participación de las PM en dicha reacción.

Este método fue seleccionado para evaluar el PO sobre la base de metal de los efectos relacionados con reacciones tipo Fenton y similares, con el propósito de que dicho método coincida con las condiciones experimentales utilizadas para medir el PO de las PM₁₀.

OXIDACIÓN DE LDL EXPUESTAS A PM₁₀

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Ox-LDL) desempeña un papel clave en la iniciación y progresión de la aterosclerosis. Y un posible mecanismo para la modificación por oxidación de las LDL es la exposición a las PM. En el presente estudio se exploró la oxidación de LDL por PM₁₀ como indicador del PO.

Estudios previos señalan que las PM₁₀ inducen daño al DNA, hemólisis y PO (Chirino *et al.*, 2010;. García-Cuellar *et al.*, 2002;. Knaapen *et al.*, 2000; Wessels *et*

al., 2010), algunos de ellos relacionados principalmente con la participación de metales (Lloyd & Phillips, 1999, Shi *et al.*, 2006).

La exposición a PM₁₀ es un factor de riesgo en patologías como el aumento en la presión arterial, aumento de la viscosidad sanguínea y alteraciones en los niveles de fibrinógeno (Peters *et al.*, 2000) y el consecuente desarrollo de la aterosclerosis. La propuesta de esta investigación consiste en que las PM, a causa de su PO, pueden contribuir al desarrollo y progresión de la aterosclerosis mediante la oxidación de LDL, haciéndolas susceptibles a ser internalizadas por los receptores *scavenger* de los macrófagos.

Diferentes investigaciones han relacionado la mortalidad cardiovascular y las complicaciones de la enfermedad aterosclerótica preexistente a la exposición a PM (Kang 2002; Braga *et al.*, 2001; Zanobetti *et al.*, 2000).

Se han efectuado, igualmente, estudios con animales de laboratorio con problemas hereditarios que fomentan la formación de placas ateroscleróticas en aorta. Tras hacer una subdivisión de estos animales en dos grupos, uno que ha sido expuesto a PM₁₀ y otro que no, se ha observado que los primeros, en comparación con el segundo grupo (control no expuesto), presentaron un mayor número de células que contenían una mayor concentración de lípidos intracelulares, lo cual implica una mayor concentración de lípidos totales en las lesiones de la aorta (Suwa *et al.*, 2002)

Asimismo, resultados de nuestro grupo de trabajo indican que las PM tienen el PO de LDL, favoreciendo su interiorización a través del receptor *scavenger* (Sevilla 2011; Manzano *et al.* 2009). Adicionalmente, existen varias observaciones indicando que la exposición a PM está relacionada con el desarrollo de la

ateroesclerosis en humanos (Diez Roux *et al.*, 2008; Künzli *et al.*, 2005) y en animales (Araujo *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2005; Suwa *et al.*, 2002), sin que se conozcan completamente los mecanismos implicados.

Como se ha mencionado, las PM son una mezcla compleja, por lo que es difícil indicar con exactitud cuáles de sus componentes están involucrados en los diferentes efectos tóxicos que producen. El simple muestreo no permite establecer criterios para evaluar sus efectos nocivos específicos. Se requiere ahondar en investigaciones acerca de estos temas para mejorar la comprensión sobre el impacto de estos contaminantes, como la concentración o la composición y su influencia en los riesgos para la salud en las regiones del tipo a las anteriormente señaladas: T₀ y T₁.

3. HIPÓTESIS

El calentamiento de las PM_{10} a diferentes temperaturas permitirá determinar si los compuestos orgánicos volátiles son responsables del PO de las PM, fenómeno evidenciado por análisis de RPE y de oxidación de las LDL, comparando muestras obtenidas en dos sitios con diferentes fuentes de emisión de contaminantes de la ZMVM.

4. OBJETIVOS

➤ El objetivo general de este estudio consistió en evaluar, por medio de RPE, la variación del PO de las PM_{10} de la ZMVM después de ser tratadas a diferentes temperaturas. Se buscó también una relación con la composición elemental y el potencial para oxidar LDL expuestas a estas PM tratadas.

Los objetivos específicos fueron:

- Colectar muestras de PM_{10} en un sitio emisor dentro de la ZMVM (T_0) y un sitio receptor (T_1) ubicado en las afueras de la ZMVM.
- Caracterizar la composición elemental de PM_{10} por PIXE.
- Medir el PO de PM_{10} por RPE.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre las PM_{10} , en el PO.
- Evaluar la capacidad oxidante de las PM_{10} (tratadas y no tratadas) sobre las LDL.
- Determinar si las PM_{10} tratadas a diferentes temperaturas son capaces de oxidar LDL y tener un PO.
- Encontrar diferencias en la composición y capacidad oxidante de las PM_{10} colectadas en ambos sitios de muestreo (T_0 y T_1).
- Analizar la relación entre la composición de PM_{10} y sus efectos biológicos.

5. MÉTODOS

5.1 MUESTREO Y RECUPERACIÓN DE PARTÍCULAS

Se realizaron muestreos de PM₁₀ diariamente durante el mes de marzo de 2006 en dos sitios de la ZMVM dentro de la campaña MILAGRO (Molina *et al.*, 2010). Como ya se señaló líneas arriba, se eligió para este proyecto un sitio representativo del ambiente urbano (T₀), en el IMP, y un sitio representativo del ambiente suburbano (T₁) con influencia del sitio urbano, situado en la UTTEC, en el Estado de México, la cual se encuentra a 30 km NO del sitio T₀ (Figura 5).

Se muestrearon partículas con un diámetro aerodinámico promedio menor o igual a 10 µm (PM₁₀), utilizando muestreadores de altos volúmenes con un flujo de 1.13 m³/min durante 24 horas (Tisch TE6070V, Roswell, GA, USA). Se utilizaron membranas modificadas de nitrocelulosa con poro nominal de 3 µm (Sartorius 11302-131, Göttingen, Alemania). Las modificaciones introducidas en los filtros consistieron en hacerles perforaciones con ayuda de una máquina de coser usando una aguja del número 90/14, para mejorar el flujo de aire y, más importante incluso, mantener la eficiencia del muestreo, evitando así que la membrana se tapara y el motor del muestreador se dañara (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009). La calibración de los equipos de muestreo (Hi-Vol) se llevó a cabo conforme a la NOM-035-SEMARNAT-1993, que establece los métodos de medición para determinar la concentración de partículas suspendidas totales en el aire ambiente y el procedimiento para la calibración de los equipos de medición.

Para poder realizar los estudios *in vitro*, las partículas se removieron de los filtros con una hoja de bisturí por medio de un barrido suave sobre la superficie de

la membrana, evitando al máximo el raspado directo de la matriz de los filtros. Las PM recuperadas se mezclaron por zona y se almacenaron en viales de vidrio libres de endotoxinas previamente horneados durante 4 horas a 200 °C y se guardaron en un desecador dentro de un refrigerador a 4 °C hasta su uso (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009).

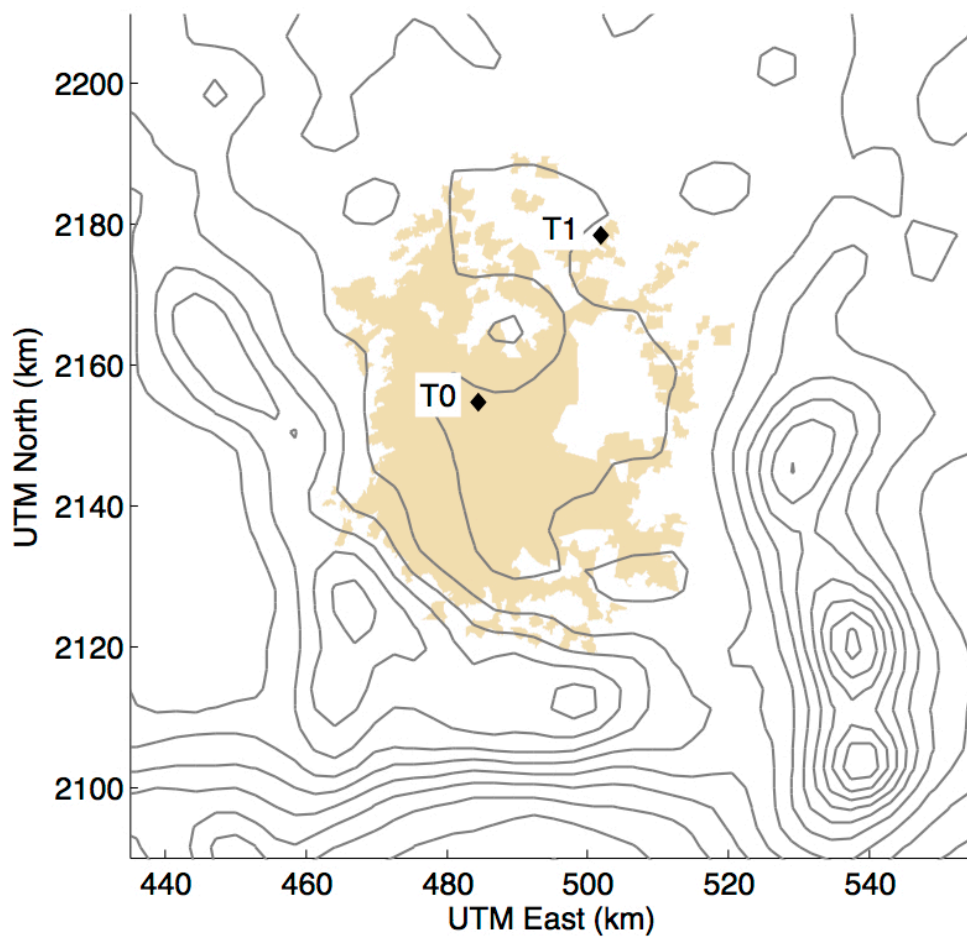


Figura 5. Mapa de la ZMVM. El área urbana está sombreada y se indica la ubicación de los sitios donde se colectaron las PM_{10} utilizadas en este estudio: T₀ (IMP) y T₁ (UTTEC), (De Foy *et al.* 2009).

5.2 ANÁLISIS ELEMENTAL DE PM₁₀ POR PIXE

El análisis elemental de PM₁₀ fue realizado por el método de PIXE (del inglés *Particle-Induced X-ray Emission*). Aproximadamente 1 mg de PM₁₀ de cada una de las muestras diarias de cada sitio fue molido en un mortero de ágata y colocado en laminillas de Maylar de 3.5 µm de espesor. Los experimentos se llevaron a cabo con el acelerador Peletrón del Instituto de Física (UNAM) para determinar la presencia de elementos ($Z \geq 19$). Los rayos X característicos se captaron con un detector del tipo LEGe (marca Canberra, con resolución de 150 eV a 5.9 keV) usando el dispositivo descrito por Miranda *et al.* (2000). Las señales recibidas en el detector fueron procesadas por métodos estándar y los espectros fueron colectados utilizando un analizador multicanal Oxford PCA3 (Oxford Industries-Tennelec, Oak Ridge, TN, USA). Los espectros, a su vez, fueron analizados utilizando el código de computadora QXAS (IAEA 1995). La determinación de la exactitud en los análisis PIXE se realizó utilizando un conjunto diferente de normas MicroMatter, resultando un error ≤ 0.7 % para los elementos detectados en este estudio. Las concentraciones elementales se expresan en unidades de µg/mg.

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESPECIES PARAMAGNÉTICAS EN PM₁₀ POR RPE

Para determinar la concentración de especies paramagnéticas por medio de RPE, se utilizó aproximadamente 1 mg de PM₁₀ pesado y colocado para su evaluación en un tubo de cuarzo (cuarzo sintético suprasil: DE 4 mm, DI 2.4 mm y L 250 mm, Wilmad).

La medición se realizó en el espectrómetro de RPE JEOL JES TE-300 con los siguientes parámetros para las especies paramagnéticas de metales: centro de campo magnético 330 +/- 250 mT, frecuencia 9.4 GHz, potencia 1 mW, *sweep time* 2 min, *modulation width* 50 mT, amplitud 160, constante de tiempo 0.1 s. Para las especies paramagnéticas de orgánicos se modificó el *sweep width* (+/- 10 mT) y el *modulation width* (100); los demás parámetros fueron iguales (Quintana, 2007).

Las muestras de PM₁₀ se midieron en el instrumento RPE a diferentes temperaturas 25 (ambiente), 37, 50, 100 y 175 °C.

Previamente se realizaron pruebas de calentamiento en intervalos de 15, 30, 60 y 120 min y no se observó pérdida significativa de PM₁₀ en peso. También se observó que el tiempo de calentamiento no influyó en la estabilidad de las especies paramagnéticas. Es por esto que se optó por trabajar con el intervalo de 30 min.

En primer lugar, la muestra se midió a temperatura ambiente (25 °C) bajo las condiciones indicadas. En seguida, se hizo la primera rampa de temperatura, se calentó hasta 37 °C y se esperó 30 minutos para estabilizar; a continuación se realizaron las mediciones con los mismos parámetros. El análisis para las temperaturas restantes se realizó de la misma forma.

Los experimentos para la determinación de las especies paramagnéticas de las PM₁₀ secos se efectuaron por triplicado.

Una vez que se realizó la medición de las especies paramagnéticas, las PM₁₀ se dejaron enfriar a temperatura ambiente para realizar la evaluación de la capacidad oxidante con la trampa de espín por RPE y las LDL.

5.4 GENERACIÓN DEL RADICAL HIDROXILO •OH PARA LA EVALUACIÓN DEL PO DE PM POR EL MÉTODO DE RPE

En tubos Eppendorf se colocaron muestras de PM₁₀ previamente tratadas a diferentes temperaturas para ser resuspendidas en PBS a una concentración de 3 mg/mL.

A una alícuota de 100 µL de la suspensión de partículas, se le añadieron 200 µL de DMPO (0.2 M en agua desionizada, Dojindo) y 100 µL de H₂O₂ (0.5 M en PBS, Fluka), y la muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos con agitación continua. Después de este tiempo, la mezcla se pasó por un filtro de 0.2 µm (Sartorius. Minisart-RC Syringe). El filtrado se colocó en un tubo capilar de cuarzo (Wilmad. Cuarzo sintético suprasil para RPE: DE 1.8 mm, DI 1.5 mm y L 100 mm), el cual se selló con resina epóxica (Clay Adams Parsippany) para evitar la contaminación se dejó una burbuja de aire entre la muestra y la resina.

La medición se realizó en el espectrómetro de RPE JEOL JES TE-300 con los siguientes parámetros: centro de campo magnético 335 mT, frecuencia 9.4 GHz, potencia 1 mW, *sweep width* +/- 5 mT, *sweep time* 0.5 min, *modulation width* 0.04 mT, amplitud 100, constante de tiempo 0.1 s. Tres acumulaciones en total.

Estos experimentos se realizaron para cada una de las muestras y las diferentes temperaturas de calentamiento, y cada uno de ellos fue efectuado por triplicado.

Como blanco se utilizó una mezcla con 100 µL de PBS, 200 µL de DMPO (0.2 M en agua) y 100 µL de H₂O₂ (0.5 M en PBS). La mediciones se realizaron

utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente (Quintana *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2003^b; Knaapen *et al.*, 2000).

5.5 CÁLCULO DE LA INTENSIDAD DEL PO.

La intensidad del PO de las especies paramagnéticas se calculó mediante la doble integral de la amplitud de la señal con el programa ESPRIT-382 v.196 (JEOL, Japón). Para la altura (h) se tomó el valor absoluto cresta-valle y para el ancho (W) la distancia de cresta-valle. La intensidad se expresa en unidades arbitrarias relacionadas con los valores instrumentales. En el caso del DMPO-OH, se calculó midiendo las amplitudes de los cuatro picos (1:2:2:1 cuadruplete característico) (Valavanidis *et al.*, 2000; Quintana *et al.*, 2011).

Al normalizarlas, se obtuvieron las intensidades de las PM₁₀, analizadas a diferentes temperaturas con respecto a la intensidad de la señal medida a temperatura ambiente, y dicha intensidad se comparó con cada una de las restantes.

Los análisis de las evaluaciones de la capacidad oxidante se realizaron, al menos, por triplicado para cada muestra de partículas y para cada una de las diferentes temperaturas empleadas.

Este método en particular para evaluar el PO de PM₁₀ se centró en metales relacionados con los efectos y reacciones de tipo Fenton (Valavanidis *et al.*, 2000).

5.6 OBTENCIÓN DE LDL A PARTIR DE PLASMA HUMANO

Las LDL fueron aisladas a partir de paquetes de plasma humano libres de VIH, sífilis, Brucella, Hepatitis B y C y Chagas, y que fueron donados por el Dr.

José Gutiérrez Salinas del laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental de la División en Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, del ISSSTE. El aislamiento de LDL se realizó por un método modificado de gradiente de densidad por ultracentrifugación vertical (Pitas *et al.*, 1980; Aguilar-Gaytán, 2003; Sevilla-Tapia, 2011).

Se tomaron 2 paquetes de plasma (180 mL aproximadamente), se agregó gentamicina 80 mg/paquete, benzamidina al 0.01%, inhibidor de tripsina al 0.01%, DNTB 1.5mM, PMSF 1mM, KBr para ajustar la densidad a 1.019 g/mL (mL Plasma X 0.01906). Esta mezcla se dejó en agitación constante por 60 min a 4°C.

Posteriormente, se llenaron los tubos Quick Seal® (39.2 mL aproximadamente), los cuales se centrifugaron a 177,000 G durante 20 horas a 4°C. Se obtuvieron dos fases amarillas, la superior con lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), y la inferior con LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés). Los tubos se dividieron con un cortador para tubos Beckman® para obtener la parte inferior (50% del volumen aproximadamente).

Debido a que es un método de ajuste de gradiente por densidad, ésta se ajustó por etapas. La primera, a 1.05 g/mL con KBr (mL Plasma X 0.0436). La mezcla se dejó en agitación constante por 60 min a 4 °C. Se llenaron los tubos y se centrifugaron durante 24 horas bajo las mismas condiciones. Se obtuvieron dos fases amarillas, la superior con HDL y la inferior con LDL (35 % del volumen aproximadamente).

En la segunda etapa se ajustó la densidad a 1.063 g/mL (final) con KBr (mL Plasma X 0.034). La mezcla se dejó en agitación constante por 60 min a 4 °C. Se llenaron los tubos y se centrifugaron durante 18 horas bajo las mismas condiciones. Se obtuvieron dos fases amarillas: la superior con LDL y la inferior con HDL (20% del volumen aproximadamente).

En la tercera etapa, las LDL obtenidas se dializaron en una membrana tubular de celulosa (Cellu Sep®), ésta se introdujo en 10 L de amortiguador de diálisis (NaCl 150 mM–EDTA 0.24 mM) durante 48 horas a 4 °C; se hizo un cambio del amortiguador luego de transcurridas las 24 horas. Una vez dializadas las LDL, se filtraron (0.45 µm Millipore®) y se cuantificó la concentración de proteína de LDL por medio del método del ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985). Las LDL se guardaron a 4 °C hasta su uso.

5.7 OXIDACIÓN DE LDL EXPUESTAS A PM₁₀

Previamente se realizó una curva a diferentes concentraciones de PM₁₀: 20, 40, 80 y 160 µg/mg para exponerlas a las LDL. Finalmente, se determinó trabajar con la de 80 µg/mg, ya que a esa concentración se logró ver un efecto significativo, además de que las dosis utilizadas de PM han sido probadas en la exposición a células (Alfaro-Moreno *et al.*, 2010).

Para llevar a cabo la oxidación de LDL, se realizó una mezcla de LDL [1 mg/mL] + PM₁₀ [80 µg/mL], la cual se incubó durante 24 horas a 37 °C en agitación constante.

Esto se realizó con cada una de las muestras de cada sitio (T_0 y T_1), y con aquellas muestras tratadas a diferentes temperaturas (25, 37, 50, 100 y 175 °C).

Como controles se utilizaron LDL nativas incubadas a 37 °C durante 24 horas, y para controles positivos se utilizaron LDL + H_2O_2 (1 mM) y LDL + $CuSO_4$ (5 mM) + H_2O_2 (1 mM) (Reacción Tipo Fenton) (Gilch *et al.*, 2010).

Para determinar la oxidación de LDL expuestas a PM_{10} se siguió el procedimiento del kit *Malondialdehyde Assay* (NWK-MDAO1 NWLSS™). Esta técnica cuantifica la oxidación de lípidos midiendo la concentración de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés); en este kit se mide la concentración de malondialdehído (MDA), un producto secundario de la oxidación de lípidos (Halliwell & Chirico, 1993).

Se tomaron 6 mL BHT (3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) + 150 μ L de la muestra + 150 μ L H_3PO_4 + 150 μ L TBA (Ácido Tiobarbitúrico). Se agitó en un vórtex durante 5 segundos; posteriormente se incubó durante 1 hora a 60 °C en un termoblock. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 minutos; los sobrenadantes se leyeron en un lector de placas (Genios Plus TECAN, Suiza) a 540 nm. La concentración MDA/mg proteína se determinó con base en una curva estándar.

Las muestras fueron evaluadas por triplicados internos y el experimento se realizó tres veces.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados muestran el promedio de 3 experimentos independientes, y cada uno de ellos se realizó por triplicado; su promedio se utilizó

para calcular el promedio y la desviación estándar producto de dichos experimentos. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA, además seguido de la prueba de comparación múltiple Bonferroni con el software GraphPad Prism 5 para Mac Os X V 5.0a. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa para valores de $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. COMPOSICIÓN ELEMENTAL.

El muestro de PM₁₀ se realizó del miércoles 1 al viernes 31 de marzo de 2006, obteniendo 31 filtros para T₀ y 16 para T₁. La suma total de las PM₁₀ recuperadas para cada sitio fue de 568 mg para T₀ y 353 mg para T₁.

Se identificaron un total de 17 elementos contenidos en distintas concentraciones en cada uno de los sitios. El elemento Cloro (Cl) se eliminó de los análisis debido a que no se encontró en todas las muestras. Los análisis indican que la composición elemental realizada por PIXE muestra claramente una diferencia en la concentración de los elementos presentes en las PM₁₀ del sitio emisor (T₀) y del sitio receptor (T₁) (Tabla 1).

Los datos fueron normalizados y se encontró que los elementos Cu y Zn estaban en mayor concentración en T₀ que en T₁ (p<0.05). Para el sitio semiurbano T₁ los elementos que estuvieron en mayor concentración fueron Al, Si, P, S y K (p<0.05) (Figura 6).

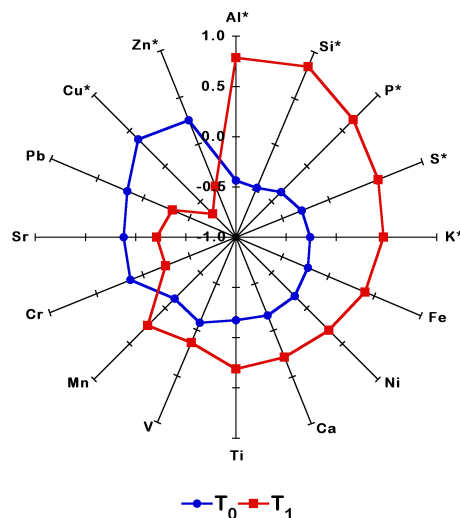


Figura 6. Valores normalizados de las concentraciones de elementos encontrados en PM₁₀. Las marcas indican en los elementos que hubo diferencia significativa entre ambos sitios (*p<0.05).

Tabla 1. Concentraciones promedio de los elementos analizados por PIXE y su proporción respecto al sitio.

Elemento	T ₀			T ₁			T ₀ vs T ₁	
	Promedio µg/mg	%	D.E.	Promedio µg/mg	%	D.E.		p
Al	25.00	9.40%	13.78	51.03	10.78%	22.60	-	0.001
Si	119.92	45.07%	62.09	262.10	55.36%	115.41	-	< 0.001
P	10.00	3.76%	6.70	17.89	3.78%	7.00	-	0.001
S	19.27	7.24%	13.97	32.22	6.81%	15.64	-	0.013
K	2.75	1.03%	1.28	3.89	0.82%	1.78	-	0.04
Ca	37.28	14.01%	15.52	45.78	9.67%	23.62	=	0.225
Ti	4.29	1.61%	2.10	5.38	1.14%	2.39	=	0.153
V	1.20	0.45%	0.61	1.34	0.28%	0.65	=	0.522
Cr	0.24	0.09%	0.16	0.19	0.04%	0.11	=	0.194
Mn	0.89	0.33%	0.44	1.07	0.23%	0.53	=	0.269
Fe	36.14	13.58%	17.53	48.58	10.26%	22.55	=	0.077
Ni	0.03	0.01%	0.02	0.05	0.01%	0.07	=	0.238
Cu	1.08	0.40%	0.70	0.38	0.08%	0.26	+	<0.001
Zn	7.19	2.70%	6.61	3.06	0.65%	2.42	+	0.006
Sr	0.12	0.04%	0.09	0.09	0.02%	0.05	=	0.244
Pb	0.67	0.25%	0.70	0.37	0.08%	0.36	=	0.077

D.E. Desviación Estándar. Valor p de significancia.

6.2 ESPECIES PARAMAGNÉTICAS PRESENTES EN LAS PM₁₀.

Las muestras de PM₁₀ fueron sometidas a calentamiento a diferentes temperaturas (25, 37, 50, 100 y 175 °C) durante 30 minutos *in situ* en la cavidad del instrumento de RPE, con la intención de evaporar algunos compuestos orgánicos y conservar la mayoría de compuestos inorgánicos, a lo que se le denominó fracción inorgánica. En la siguiente tabla se muestran los pesos iniciales

y finales de las muestras de partículas, con alrededor del 1% en pérdida de PM₁₀ (Tabla 2).

Tabla 2. Masa de PM₁₀ de T₀ y T₁ antes y después del tratamiento térmico.

Muestra	T ₀				T ₁			
	[°C]	mg inicial	mg final	% Diferencia	[°C]	mg inicial	mg final	% Diferencia
1	25	0.87	0.87	0.0%	25	1.02	1.01	1.0%
2	37	1.20	1.20	0.0%	37	1.04	1.04	0.0%
3	50	0.91	0.90	1.1%	50	1.09	1.07	1.8%
4	100	1.13	1.13	0.0%	100	1.01	0.99	2.0%
5	175	1.90	1.86	2.1%	175	1.07	1.06	0.9%
6	25	1.32	1.31	0.8%	25	1.00	0.99	1.0%
7	37	1.07	1.07	0.0%	37	1.05	1.03	1.9%
8	50	1.00	0.98	2.0%	50	1.02	1.01	1.0%
9	100	0.95	0.94	1.1%	100	1.00	0.99	1.0%
10	175	0.99	0.97	2.0%	175	1.00	0.98	2.0%
11	25	0.96	0.95	1.0%	25	0.99	0.98	1.0%
12	37	1.07	1.07	0.0%	37	1.00	1.00	0.0%
13	50	1.05	1.03	1.9%	50	1.02	1.00	2.0%
14	100	1.14	1.12	1.8%	100	1.00	0.98	2.0%
15	175	1.05	1.03	1.9%	175	1.01	1.00	1.0%

En los espectros de RPE de las muestras sólidas se encontraron señales correspondientes a metales de transición. Estos espectros muestran una señal muy ancha en todo el campo magnético, tipo anisotrópica con $g \approx 2.00$, atribuida a un acoplamiento dipolar dada una alta concentración de metales, los cuales

pueden corresponder a V^{+4} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+3} . También se identificó una señal fina en $g = 2.005$ asignada a radicales orgánicos estables del tipo semiquinona.

Para el análisis de RPE de especies paramagnéticas relacionadas a metales y orgánicos se demostró que el tiempo de calentamiento no afectaba el tratamiento de cada muestra, ya que se realizaron algunas pruebas con PM_{10} de T_0 sometiéndolas a distintos tiempos (Figuras 7 y 8); en dichas pruebas se puede observar que a intervalos de 15, 30, 60 y 120 minutos la señal permanece constante. Por tal motivo, se determinó entonces trabajar con intervalos de 30 minutos para el calentamiento de las muestras restantes.

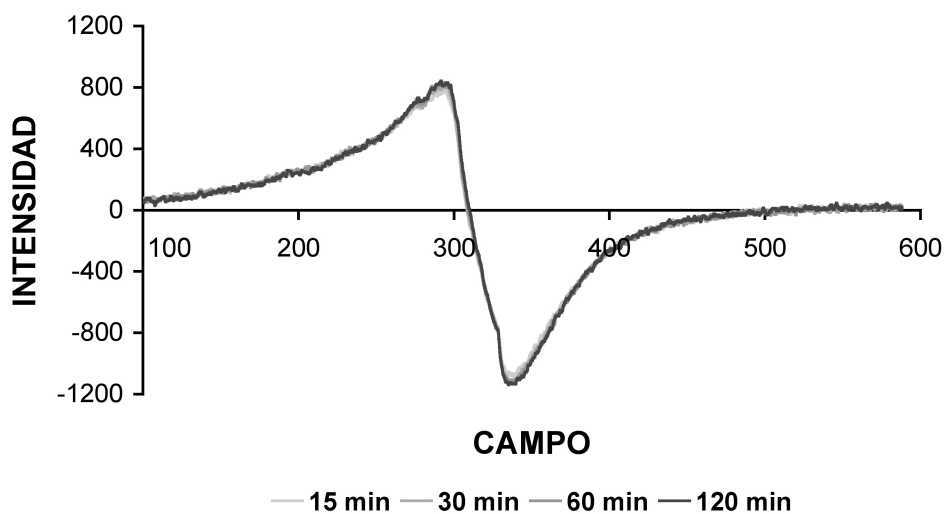


Figura 7. Intensidad de especies paramagnéticas de metales en T_0 PM_{10} a $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a diferentes tiempos.

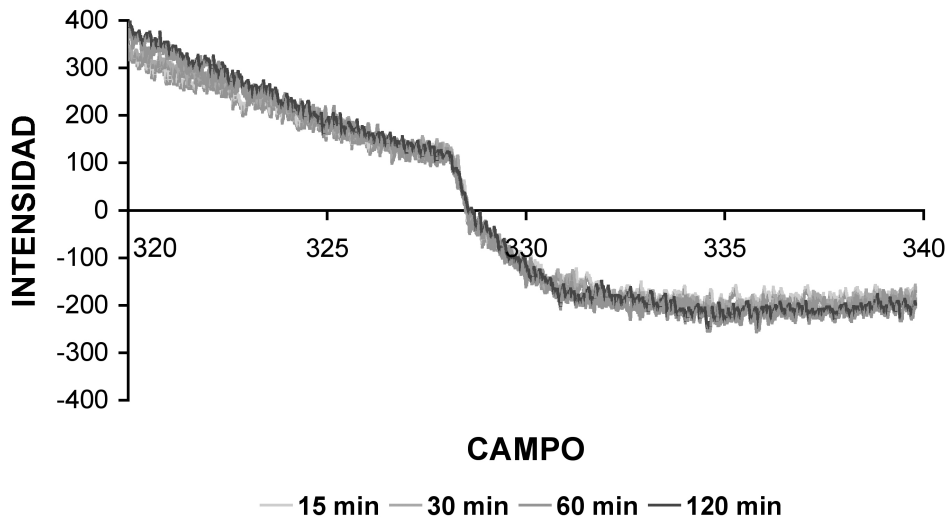


Figura 8. Intensidad de especies paramagnéticas de orgánicos en T_0 PM_{10} a 175 °C y a diferentes tiempos.

Por otro lado, se demostró que hubo un incremento en la intensidad y la amplitud de la señal relacionado con el aumento de la temperatura. En las Figuras 9 y 10 se muestra cómo aumenta la señal de las especies paramagnéticas de metales y orgánicos conforme se incrementa la temperatura: menor intensidad en la señal para temperatura ambiente (25 °C) y mayor para la temperaturas de 100 y 175 °C respectivamente.

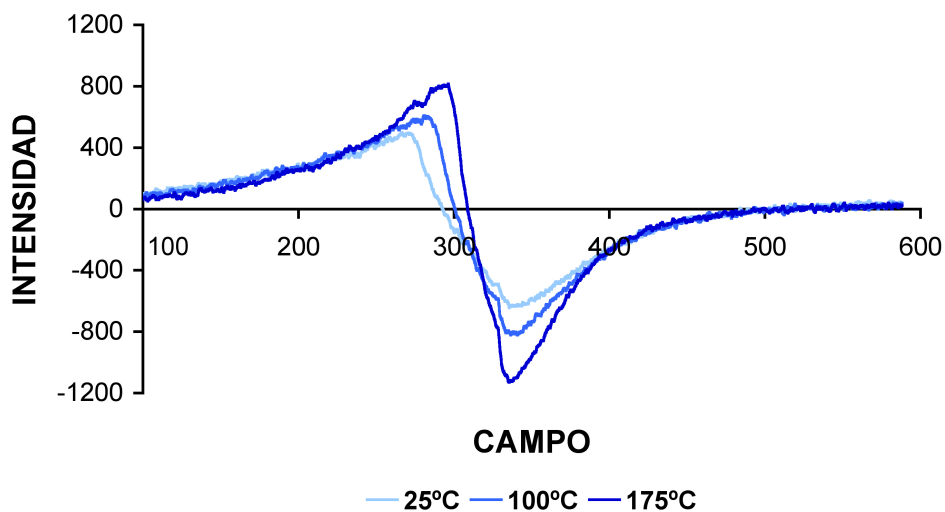


Figura 9. Intensidad de especies paramagnéticas de metales de T_0 PM_{10} a diferentes temperaturas, durante 30 min.

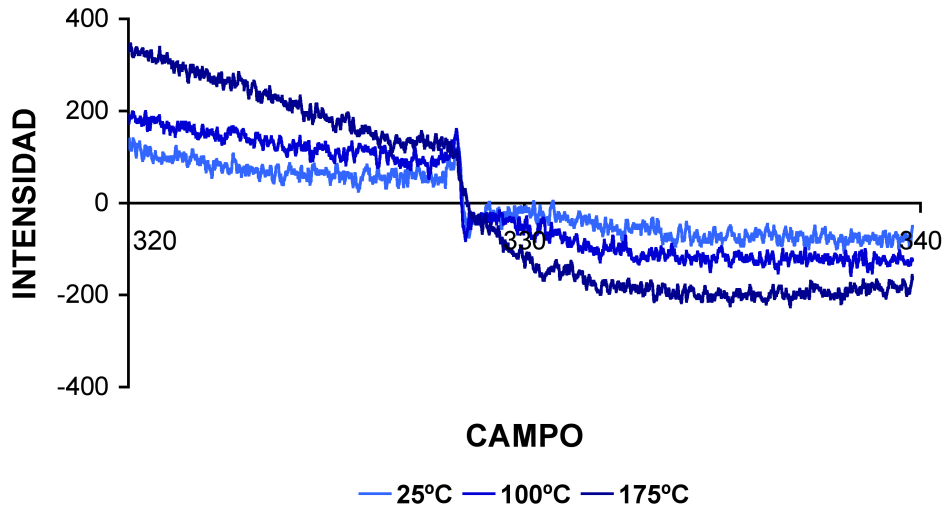


Figura 10. Intensidad de especies paramagnéticas de orgánicos de T_0 PM_{10} a diferentes temperaturas, durante 30 min.

El incremento porcentual en la amplitud de la señal de las especies paramagnéticas correspondientes a los metales presentes en las muestras de PM_{10} de T_0 y T_1 después del calentamiento se observa en la Figura 11.

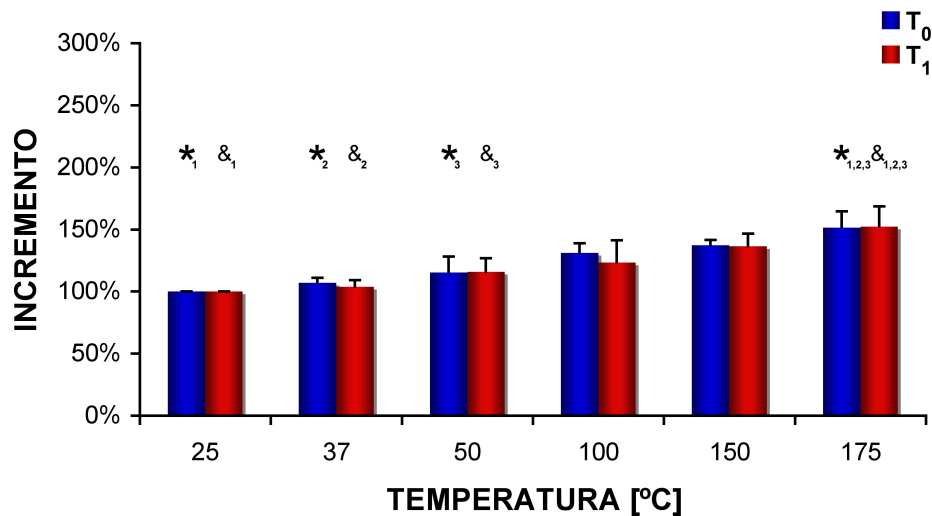


Figura 11. Incremento en la intensidad de especies paramagnéticas de metales. (* $p < 0.05$; & $p < 0.05$)

Los cambios en la amplitud e intensidad de la señal de las especies paramagnéticas correspondientes a los compuestos orgánicos presentan aumento conforme se incrementa la temperatura en las muestras de ambos sitios, siendo T_0 ligeramente mayor que T_1 . Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de la amplitud de la señal (Figura 12).

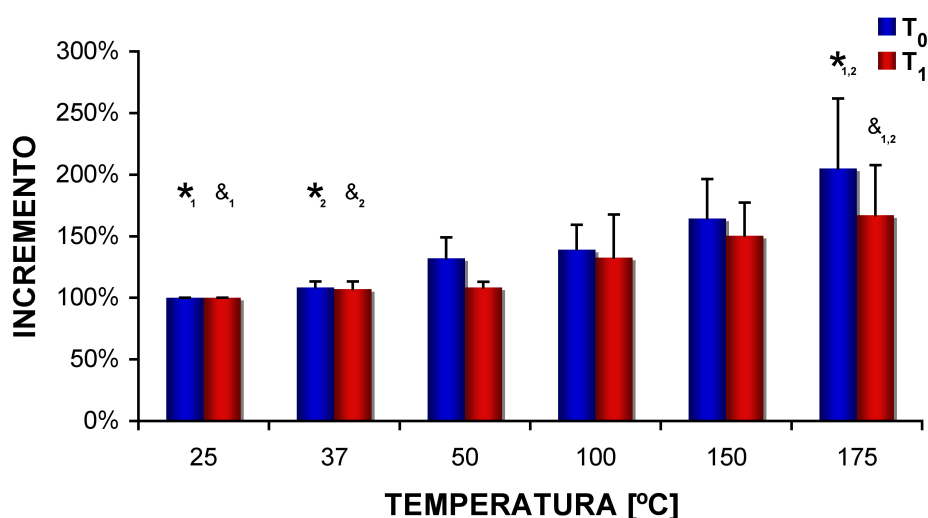


Figura 12. Incremento en la intensidad de especies paramagnéticas de orgánicos (* $p < 0.05$; & $p < 0.05$).

6.3. POTENCIAL OXIDANTE.

El PO de PM_{10} evaluado por RPE utilizando el atrapador DMPO muestra la señal típica de un cuádruplete con intensidades 1:2:2:1 y una constante de acoplamiento hiperfino, $A = 1.49$ mT como resultado de la generación del aducto DMPO-OH (Figura 13). Los cambios en la amplitud de la señal indican que existe un PO mayor en muestras de T_0 que T_1 ($p < 0.05$). El tratamiento térmico predijo una ligera tendencia a disminuir conforme se incrementó la temperatura para ambos sitios, aunque no de forma significativa.

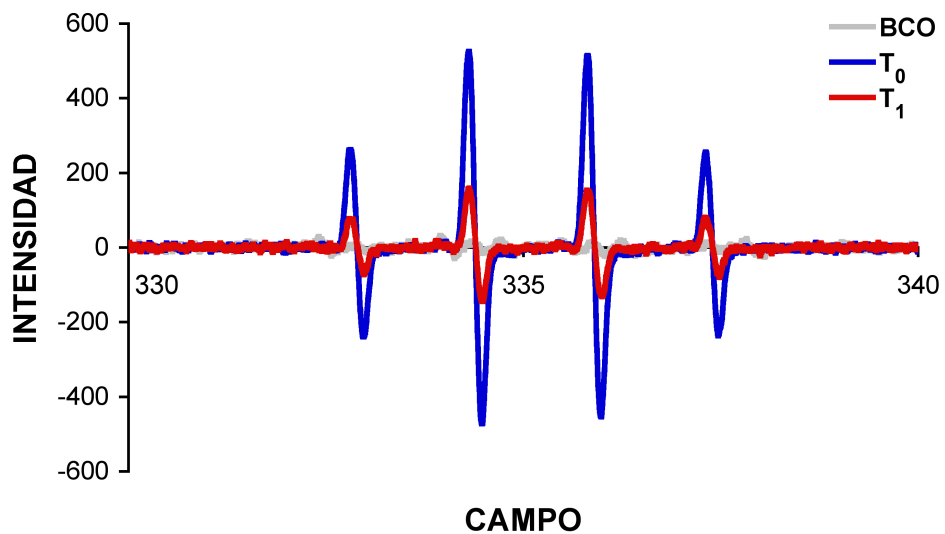


Figura 13. Señal del PO de PM₁₀.

Puesto que la señal se obtuvo en presencia de H₂O₂ y el tratamiento térmico no afectó la generación del aducto DMPO-OH de forma significativa, consideramos que los resultados se deben a reacciones de tipo Fenton, probablemente dependientes del Fe y Cu presentes en las PM₁₀. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de la amplitud de la señal (Figura 14).

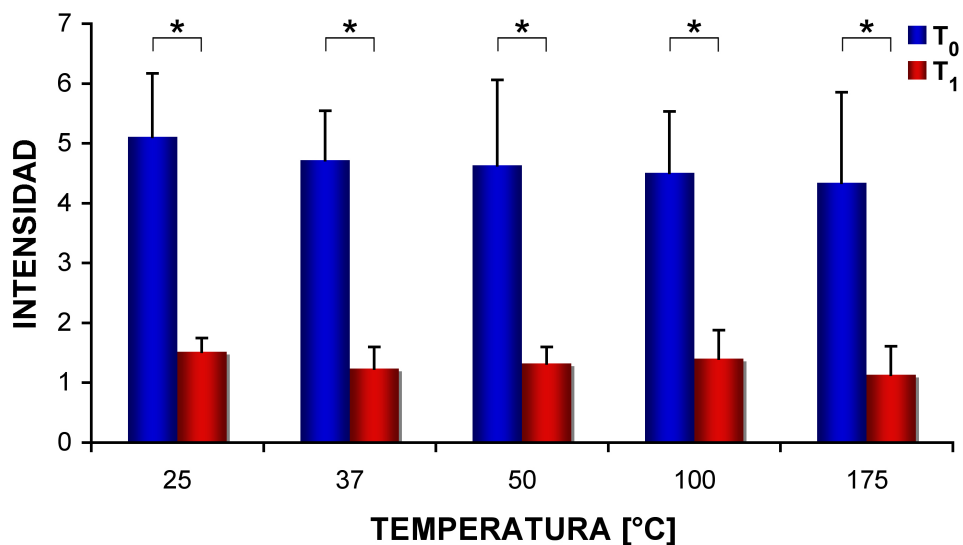


Figura 14. Intensidad del PO de PM₁₀ (*p<0.05).

6.4. OXIDACIÓN DE LDL EXPUESTAS A PM₁₀.

Los resultados mostraron que las PM₁₀ oxidan a las LDL de forma dependiente de la concentración: a mayor concentración mayor oxidación. Se determinó que la concentración óptima de PM para la oxidación de LDL es de 80µg de PM/mg LDL. (Figura 15).

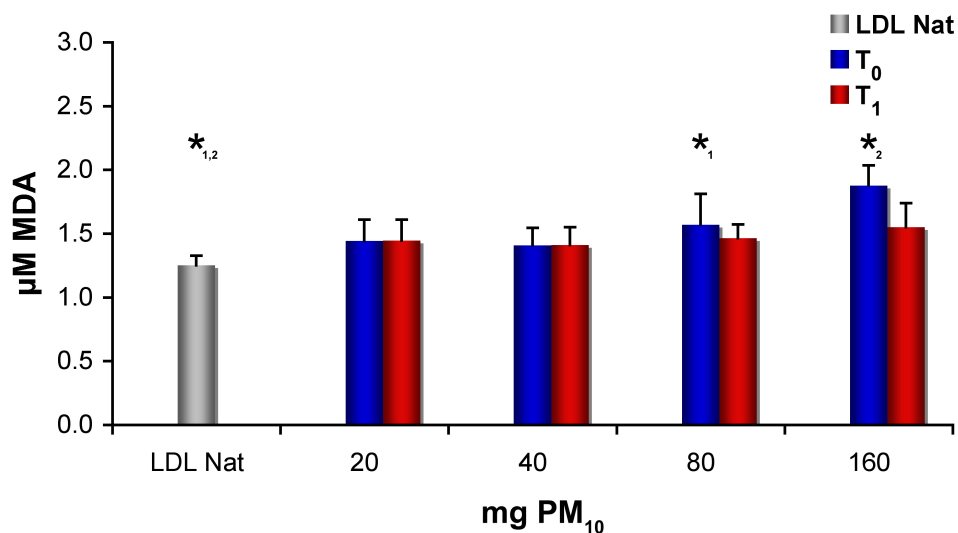


Figura 15. Oxidación de LDL expuestas a diferentes concentraciones de PM₁₀ (*p<0.05).

Como se puede ver (Figuras 15 y 16) existe una oxidación de LDL al exponerlas a partículas con respecto al control ($p < 0.05$). De igual forma, se observa que el tratamiento con temperatura a las PM_{10} no modificó la oxidación. Ambos tipos de partículas de T_0 o T_1 oxidan de igual forma a las LDL con independencia del tratamiento con temperatura (Figura 16).

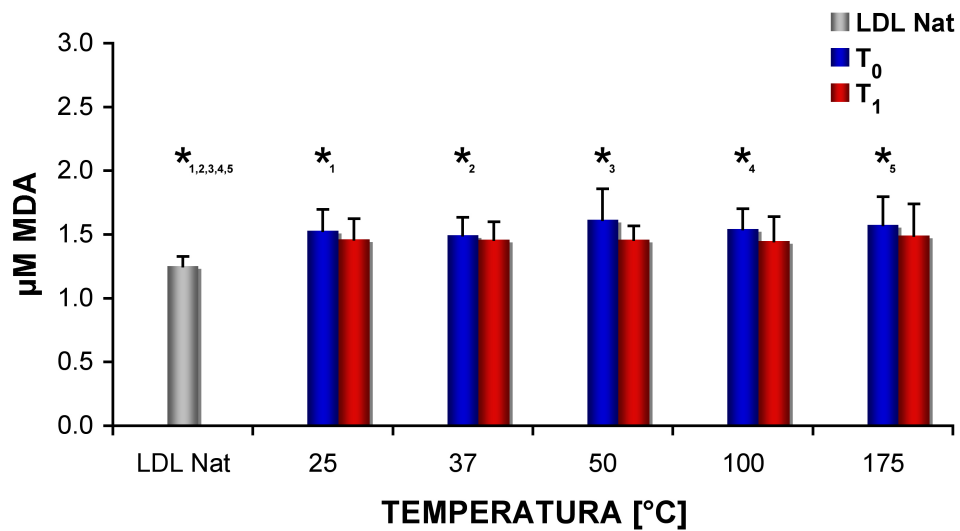


Figura 16. Oxidación de LDL expuestas a $80 \mu g PM_{10}$ por mg de LDL, tratadas a diferentes temperaturas (* $p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

El estudio de las PM_{10} se ha ampliado en los últimos años debido a los efectos biológicos relacionados con su composición, PO y sus efectos nocivos para la salud. En este trabajo se evaluaron PM_{10} de dos sitios diferentes (T_0 y T_1) que fueron sometidas a tratamientos con calor, con el propósito de identificar cambios en su PO, mediante RPE y su capacidad *in vitro* para oxidar LDL.

El muestreo se realizó en el IMP (T_0), que se localiza en una zona industrial y urbanizada. El sitio T_1 , que se localiza en la UTTEC, a 38 km al noroeste del punto T_0 (Marley et al., 2009). En T_0 se obtuvo una mayor cantidad de PM_{10} (568 mg) en comparación con el sitio T_1 (353 mg). Esto refleja la existencia reportada de una menor concentración atmosférica de PM_{10} en el sitio semiurbano en comparación con la zona urbana (Moreno et al., 2008).

El análisis elemental de PM_{10} realizado por PIXE indicó claramente que existe una diferencia en la concentración de los elementos presentes en T_0 y T_1 . Por ejemplo, los elementos que tuvieron una mayor concentración –y de forma muy significativa– en el sitio T_0 fueron: Cu y Zn; mientras que en el sitio T_1 fueron: Al, Si, P, S y K, que son elementos identificados como provenientes de suelo y de la quema de biomasa (Moffet et al., 2008; Querol et al., 2008). Es importante hacer notar que de acuerdo con la Tabla 1, de composición elemental, el Fe es otro de los metales que se encuentran en más alta concentración en T_0 respecto a T_1 . Esto indica la diferencia entre sitios y revela una mayor presencia de elementos identificados como provenientes de fuentes de contaminación antropogénica e industrial en T_0 . Por otro lado, en la zona semiurbana, los elementos encontrados

en mayor proporción sugieren mayor participación de componentes de suelo y quema de biomasa. Esto corrobora, pues, la hipótesis propuesta durante la campaña MILAGRO, y que postulaba a las fuentes locales como los originadores de contaminación más importantes en cada sitio, sin dejar de lado una participación menor de lo transportado por el aire (Querol *et al.*, 2008). Además durante esta campaña se realizaron una serie de simulaciones y mediciones para encontrar la contribución de los contaminantes emitidos desde T_0 y su impacto en T_1 . En lo que respecta al análisis de PM_{10} se puede decir que los mayores impactos provienen de fuentes locales (Fast *et al.*, 2009; Hodzic *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2011).

Para determinar la capacidad para oxidar LDL de las PM_{10} , se trabajó con una muestra de éstas sometida a calentamiento antes de su evaluación por medio de RPE, con el fin de eliminar algunos compuestos orgánicos volátiles en un rango de temperatura entre 25 a 175 °C.

También se realizaron análisis a diferentes intervalos de tiempo, y no existió diferencia cuando se empleaba la misma temperatura: por ejemplo, la señal a 100°C medida en intervalos de 15 min, es la misma que se obtuvo a lo largo de las 2 horas (120 min) que duró el análisis. Se observó un incremento en la intensidad de las especies paramagnéticas en función de la temperatura y no del tiempo del tratamiento. Para este estudio, se decidió llevar a cabo los experimentos después de calentar las PM_{10} durante 30 minutos (Figura 7).

Los resultados de la intensidad de las especies paramagnéticas de metales indicaron que no hubo diferencia entre los sitios T_0 y T_1 , pero sí conforme se aumentó la temperatura de calentamiento ($p < 0.05$). En el caso de la señal

proveniente de los compuestos orgánicos, resultó que su presencia fue mayor en T_0 que en T_1 . Este fenómeno se hizo más evidente cuando se incrementó la temperatura ($p < 0.05$). Esto representa un indicio de una mayor presencia de compuestos más volátiles en T_0 respecto del sitio semiurbano.

El tener este tipo de resultados, donde las señales se intensifican al incrementar la temperatura de las sustancia a tratar, puede deberse a que la temperatura excite a los compuestos del PM, provocando un aumento en el espín desapareado y con esto una señal más grande (Rojo *et al.*, 1997). Dado que las señales de las especies paramagnéticas se mantuvieron más o menos constantes durante todos los experimentos, en un futuro convendría calentar la muestra a más de 300 °C y al menos hasta 600 °C para eliminar compuestos orgánicos más pesados, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

El PO que tienen las PM_{10} (Chirino *et al.*, 2010; García-Cuellar *et al.*, 2002; Knaapen *et al.*, 2000) y la capacidad de producir $\bullet OH$, determinado mediante RPE, se vinculan con reacciones tipo Fenton, donde los metales juegan un papel fundamental (Shi *et al.* 2003^b, 2006, Valavanidis *et al.*, 2002, 2005). En este estudio se analizaron partículas provenientes de dos sitios diferentes, y se observó en cada caso que los tipos de partículas mostraron PO de diferente intensidad. Asimismo, se pudo detectar con claridad que las PM_{10} de T_0 producen un mayor PO que las de T_1 ($p < 0.05$). Como ya se mencionó, en T_0 se determinó un mayor porcentaje de metales: 13.58 % de Fe y 0.4 % de Cu en T_0 ; en tanto que para T_1 los porcentajes determinados fueron 10.26 % y 0.08 % para los mismos metales (Tabla 1). Es bien sabido que estos metales están directamente involucrados en la formación del radical hidroxilo por medio de la reacción tipo Fenton y, por lo tanto,

a ellos se puede atribuir el mayor PO observado por RPE para la zona urbana T₀ (p<0.05).

En lo que respecta al tratamiento de temperatura, conforme está se incrementó, se evidenció una ligera tendencia a disminuir la intensidad del PO; sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Los efectos observados por medio de RPE fueron correlacionados con un parámetro biológico como fue la oxidación de LDL.

Ya se ha señalado que las LDL son susceptibles a oxidación por PM₁₀, (Manzano *et al.*, 2012, Sevilla-Tapia, 2011). La forma empleada para medir esto fue mediante el ensayo de MDA con TBA, donde los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), ricos en dobles enlaces, son particularmente susceptibles a la oxidación por radicales libres y otras especies altamente reactivas.

Por ejemplo, el ensayo de las PM₁₀ con LDL en presencia de H₂O₂ producen radicales hidroxilo (\bullet OH), dando la formación a radicales peroxilo lípidos (LOO \bullet). Este radical hidroxilo (\bullet OH) puede reaccionar con un PUFA, y formar un hidroperóxido lípido (LOOH), teniendo como resultado el aumento de los lípidos oxidados en que se descompone el MDA, que es uno de los muchos productos de la descomposición de lípidos con bajo peso molecular. Las condiciones de dicho ensayo sirven para determinar la concentración de MDA y de esta forma, cuantificar la peroxidación de lípidos (Halliwell & Chirico, 1993).

Los resultados indican que las PM₁₀ de T₀ y T₁ son capaces de producir una oxidación de las LDL dependiente de la concentración (p<0.05).

Cuando se realizaron los tratamientos de temperatura se observó una oxidación de LDL mayor en T_0 que T_1 . Esto se correlaciona con los resultados de PO con DMPO por RPE, donde también fue mayor en T_0 que en T_1 ($p < 0.05$).

En los tratamientos de temperatura y oxidación de LDL, no se encontraron diferencias entre las distintas etapas de calentamiento. Esto podría explicar que el PO medido por RPE y la oxidación de LDL esta mediado por los metales presentes en las PM_{10} .

8. CONCLUSIONES

- ✓ La concentración de elementos contenida en las PM_{10} varía en cada sitio: T_0 presenta mayor concentración de elementos que provienen de fuentes antropogénicas (Zn, Cu y Pb); en T_1 se confirma la presencia de más elementos de suelo, al ser una zona semiurbana: Al, Si, P, S y K.
- ✓ La señal de las especies paramagnéticas aumentó como resultado del tratamiento de temperatura.
- ✓ El PO se relaciona con el sitio (T_0 mayor que T_1) pero no con los tratamientos con temperatura.
- ✓ Existe oxidación de LDL inducida por las PM_{10} , independientemente de los sitio de muestreo o del tratamiento de temperatura.
- ✓ Existe efecto biológico pero no todo es debido al PO de las PM_{10} .
- ✓ No existe correlación entre el PO detectado por RPE y la oxidación de LDL.
- ✓ Los metales de transición juegan un papel importante en la producción de $\bullet OH$.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abragam, A. & Bleaney, B. (1970). *Electron paramagnetic resonance of transition ions*. Oxford, England: Oxford University.
2. Aguilar-Gaytan, R., & Mas-Oliva, J. (2003). Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305(3), 510-517.
3. Alfaro-Moreno, E., Garcia-Cuellar, C., De Vizcaya-Ruiz, A., Rojas-Bracho, L., & Osornio-Vargas, A. R. (2010). Cellular Mechanisms behind Particulate Matter Air Pollution-Related Health Effects. En Gurjar, B. R., Molina, L. T., & Ojha, C. S. (Eds.), *Air Pollution: Health and Environmental Concerns* (pp. 249-276). Boca Raton, FL: CRC Press.
4. Alfaro-Moreno, E., Martinez L., Garcia-Cuellar, C., Murray, J. C., Bonner, J. C., Ponce de Leon, ... & Osornio-Vargas, A. (2002). Biological effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives. Environ Health Perspectives*. 110, 715-720.
5. Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Nawrot, T. S., ... & Osornio-Vargas, A. R. (2009). Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ Res*, 109(5), 528-535.
6. Araujo, J. A., Barajas, B., Kleinman, M., Wang, X., Bennett, B. J., Gong, K. W., ... & Nel, A. E. (2008). Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circulation Research*. 102, 589-596.
7. Atkinson, R. W., Fuller, G. W., Anderson, H. R., Harrison, R. M., & Armstrong, B. (2010). Urban ambient particle metrics and health: a time-series analysis. *Epidemiology*, 21(4), 501-511.
8. Bell, M. L., Dominici, F., Ebisu, K., Zeger, S. L., & Samet, J. M. (2007). Spatial and temporal variation in PM2.5 chemical composition in the United States for health effects studies. *Environ Health Perspect*, 115(7), 989-995.
9. Bell, M. L., Ebisu, K., Peng, R. D., Walker, J., Samet, J. M., Zeger, S. L., & Dominici, F. (2008). Seasonal and regional short-term effects of fine particles on hospital admissions in 202 US counties, 1999-2005. *Am J Epidemiol*, 168(11), 1301-1310.
10. Braga, A. L., Zanobetti, A., & Schwartz, J., (2001). The lag structure between particulate air pollution and respiratory and cardiovascular deaths in 10 US cities. *J. Occup. Environ. Med.*, 43, 927-933.
11. Chen, P. S., Tsai, F. T., Lin, C. K., Yang, C. Y., Chan, C. C., Young, C. Y., & Lee, C. H. (2010). Ambient influenza and avian influenza virus during dust storm days and background days. *Environ Health Perspect*, 118(9), 1211-1216.
12. Chirino, Y. I., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A. R., Morales-Barcenas, R., Gutierrez-Ruiz, M. C., Segura-Garcia, Y., ... & Garcia-Cuellar, C. M. (2010). PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol Lett*, 193(3), 209-216.

13. De Foy, B., Fast, J. D., Paech, S. J., Phillips, D., Walters, J. T., Coulter, R. L., ... & Molina, L. T. (2008). Basin-scale wind transport during the MILAGRO field campaign and comparison to climatology using cluster analysis. *Atmos Chem Phys*, 8, 1209-1224.
14. De Foy, B., Zavala, M., Bei, N., & Molina, L. T. (2009). Evaluation of WRF mesoscale simulations and particle trajectory analysis for the MILAGRO field campaign. *Atmos Chem Phys*, 9, 2113-2163.
15. Diez Roux, A. V., Auchincloss, A. H., Franklin, T. G., Raghunathan, T., Barr, R. G., & Kaufman, J., (2008). Long-term exposure to ambient particulate matter and prevalence of subclinical atherosclerosis in the Multi-Ethnic study of atherosclerosis. *Am. J. Epidemiol*, 167, 667-675.
16. Fast, J., Aiken, A. C., Allan, J., Alexander, L., Campos, T., Canagaratna, M. R., ... & Zaveri, R. (2009). Evaluating simulated primary anthropogenic and biomass burning organic aerosols during MILAGRO: implications for assessing treatments of secondary organic aerosols. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 9(16), 6191-6215.
17. Garcia-Cuellar, C., Alfaro-Moreno E, Martinez-Romero, F., Ponce de Leon, R. S., Rosas, I., Perez-Cardenas, E., & Osornio-Vargas, A. R. (2002). DNA damage induced by PM10 from different zones of Mexico City. *Annals of Occupational Hygiene*, 46(1), 425-428.
18. Gilch, S., Meyer, O., & Schmidt, I. (2010). Electron paramagnetic studies of the copper and iron containing soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Biometals*, 23, 613-622.
19. Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance [Suppl.]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715S-725S.
20. Hashizume, M., Ueda, K., Nishiwaki, Y., Michikawa, T., & Onozuka, D. (2010). Health effects of Asian dust events: a review of the literature. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, 65(3), 413-421.
21. Hodzic, A., Jimenez, J. L., Madronich, S., Canagaratna, M. R., De Carlo, P. F., Kleinman, L., & Fast, J. (2010). Modeling organic aerosols in a megacity: potential contribution of semi-volatile and intermediate volatility primary organic compounds to secondary organic aerosol formation. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10(12), 5491-5514.
22. Kang, J. Y. (2002). Cardiovascular Toxicity of Particulate Air Pollution. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2, 233-236.
23. Kleinman, L. I., Springston, S. R., Daum, P. H., Lee, Y., Nunnermacker, L. J., Senum, G. I., ... & Jayne, J. (2008). The time evolution of aerosol composition over the Mexico City plateau. *Atmos Chem Phys*, 8, 1559-1575.
24. Knaapen, A., Dunemann, L., & Borm, P. (2000). Ambient Particulate Matter Induces oxidative DNA Damage in lung Epithelial cells. *Inhalation Toxicology*, 12, 125-132.
25. Krewski, D., Jerrett, M., Burnett, R. T., Ma, R., Hughes, E., Shi, Y., ... & Tempalski, B. (2009). Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society

- study linking particulate air pollution and mortality. *Res Rep Health Eff Inst*, 140, 5-136.
26. Künzli, N., Jerrett, M., Mack, W. J., Beckerman, B., La Bree, L., Gilliland, ... & Hodis, H. N. (2005). Ambient Air pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. *Environmental Health Perspectives*, 113(2), 201-206.
 27. Lloyd, D. R., & Phillips, D. H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res*, 424(1-2), 23-36.
 28. Manzano-Leon, N., Morales-Barcenas, R., Flores-Rojas, G., Mas-Oliva, J., & Osornio-Vargas, A. R. (2009). PM_{2.5} and PM₁₀ in vitro effect on LDL and scavenger receptors (SRs). *Am J Respir Crit Care Med*, 179, A3139.
 29. Marley, N. A., Gaffney, J. S., Castro, T., Salcido, A., & Frederick, J. (2009). Measurements of aerosol absorption and scattering in the Mexico City Metropolitan Area during the MILAGRO field campaign: a comparison of results from the T0 and T1 sites. *Atmos. Chem. Phys.*, 9, 189-206.
 30. Miranda, J., Rodriguez-Fernandez, L., De Lucio, O. G., Lopez, K., & Harada, J. A. (2000). A new beamline for characteristic X-ray experiments at the Pelletron accelerator. *Revista Mexicana de Física*, 46, 367-372.
 31. Moffet, R. C., Desyaterik, Y., Hopkins, R. J., Tivanski, A. V., Gilles, M. K., Wang, Y., ... & Prather, K. A. (2008). Characterization of aerosols containing Zn, Pb, and Cl from an industrial region of Mexico City. *Environ Sci Technol*, 42(19), 7091-7107.
 32. Molina, L. T., Kolb, C. E., De Foy, B., Lamb, B. K., Brune, W. H., Jimenez, J. L., & Molina, M. J., (2007). Air quality in North America's most populous city –overview of MCMA-2003 Campaign [Discuss.]. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7, 3113–3177.
 33. Molina, L. T., Madronich, S., Gaffney, J. S., Apel, E., De Foy, B., Fast, J., ... & Zavala, M. (2010). An overview of the MILAGRO 2006 Campaign: Mexico City emissions and their transport and transformation. *Atmos Chem Phys*, 10, 8697-8760.
 34. Moreno, T., Querol, X., Pey, J., Minguillon, M. C., Perez, N., Alastuey, A., ... & Gibbons, W. (2008). Spatial and temporal variations in inhalable CuZnPb aerosols within the Mexico City pollution plume. *J Environ Monit*, 10(3), 370-378.
 35. Osornio-Vargas A. R., Bonner, J. C., Alfaro-Moreno, E., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Ponce de Leon, S., ... & Rosas, I. (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. Submitted to *Environ Health Perspect*, 111, 1189-1193.
 36. Perez, L., Medina-Ramon, M., Künzli, N., Alastuey, A., Pey, J., Pérez, N., ... & Sunyer, J. (2009). Size fractionate particulate matter, vehicle traffic, and case-specific daily mortality in Barcelona, Spain. *Environ Sci Technol*, 43(13), 4707-4714.
 37. Perez, L., Tobias, A., Querol, X., Kunzli, N., Pey, J., Alastuey, A., ... & Sunyer, J. (2008). Coarse particles from Saharan dust and daily mortality. *Epidemiology*, 19(6), 800-807.

38. Peters, A., Liu, E., Verrier, R. L., Schwartz, J., Gold, D. R., Mittleman, M., ... & Dockery, D. W. (2000). Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology*, 11, 11-17.
39. Pitas, R. E., Innerarity, T. L., & Mahley, R. W. (1980). Cell surface receptor binding of phospholipid protein complexes containing different ratios of receptor-active and inactive E apoprotein. *J. Biol. Chem.*, 255, 5454-5460.
40. Pope, A., Verrier, R., Lovett, E., Larson, A., Raizenne, M., Kanner, R., ... & Douglas, W. D. (1999). Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J*, 138, 890-899.
41. Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287, 1132-1141.
42. Pope, C. A. III, Hansen, M. L., Long, R. W., Nielsen, K. R., Eatough, N. L., Wilson, W. E., & Eatough, D. J. (2004). Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect*, 112, 339-345.
43. Querol, X., Pey, J., Minguillon, M. C., Perez, N., Alastuey, A., Viana, M., ... & Artiñano, B. (2008). PM speciation and sources in Mexico during the MILAGRO-2006 Campaign. *Atmos Chem Phys.*, 8, 111-128.
44. Quintana, B. R. O. (2007). *Detección de especies paramagnéticas y medición de su potencial oxidativo, en PM₁₀ y PM_{2.5} de la ciudad de México por medio de Resonancia Paramagnética Electrónica* (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM, México.
45. Quintana, R., Serrano, J., Gomez, V., De Foy, B., Miranda, J., Garcia-Cuellar, C., ... & Osornio-Vargas, A. (2011). The oxidative potential and biological effects induced by PM₁₀ obtained in Mexico City and at a receptor site during the MILAGRO Campaign. *Environmental Pollution*, 159, 3446-3454.
46. Rojo, T., & Lezama, L. (1997). *Barandiarán, Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica*. España: Ed. Universidad.
47. Salcedo, D., Onasch, T. B., Dzepina, K., Canagaratna, M. R., Zhang, Q., Huffman, J. A., ... & Jimenez, J. L. (2006). Characterization of ambient aerosols in Mexico City during the MCMA-2003 campaign with Aerosol Mass Spectrometry: results from the CENICA Supersite. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 6, 925-946.
48. Samet, J., & Krewski, D. (2007). Health effects associated with exposure to ambient air pollution. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 70, 227-242.
49. Schurath, U. & Naumann, K. H. (1998). Heterogeneous processes involving atmospheric particulate matter. *Pure Appl. Chem.*, 70, 1353-1361.
50. Schwartz, D. A. (2001). Does inhalation of endotoxin cause asthma? *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 305-313.
51. Sevilla, T. L. (2011). *Efectos in vitro de las aeropartículas contaminantes (PM) en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en la actividad de los receptores scavenger (RS)* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, UNAM, México.

52. Shi, T., Duffin, R., Borm, P. J., Li, H., Weishaupt, C., & Schins, R. P. (2006). Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ Res*, 101(1), 18-24.
53. Shi, T., Knaapen, A. M., Begerow, J., Birmili, W., Borm, P. J. A., & Schins, R. P. F. (2003a). Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-20-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter. *Occup. Environ. Med.*, 69, 322–329.
54. Shi, T., Schins, R. P. F., Knaapen, A. M., Kuhlbusch, T., Pitz, M., Heinrich, J., & Borm, P. J. A., (2003b). Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J. Environ. Monit.*, 5, 550–556.
55. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1), 76-85.
56. Sun, Q., Wang, A., Jin, X., Natanzon, A., Duquaine, D., Brook, R. D., ... & Rajagopalan, S. (2005). Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA*, 294, 3003-3010.
57. Suwa, T., Hogg, J. C., Quinlan, K. B., Ohgami, A., Vincent, R., & Van Eeden, S. F. (2002). Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 39, 935-942.
58. Tong, H., Cheng, W. Y., Samet, J. M., Gilmour, M. I., & Devlin, R. B. (2010). Differential cardiopulmonary effects of size-fractionated ambient particulate matter in mice. *Cardiovasc Toxicol*, 10(4), 259-267.
59. Uchida, M. & Ono, M. (1999). Determination of Hydrogen Peroxide in Beer and Its Role in Beer Oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 57(4), 145-150.
60. Valavanidis, A., Fiotakis, K., Bakeas, E., & Vlahogianni, T. (2005). Electron paramagnetic resonance study of the generation of reactive oxygen species catalysed by transition metals and quinoid redox cycling by inhalable ambient particulate matter. *Redox Rep.*, 10(1), 37-51.
61. Valavanidis, A., Salika, A., & Theodoropoulou, A. (2000). Generation of hydroxyl radicals by urban suspended particulate air matter. The role of iron ions. *Atmos Environ*, 34, 2379-2386.
62. Wertz, J. E., & Bolton, J. R. (1986). *Electron Spin Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*. New York, USA: Ed. Chapman and Hall.
63. Wessels, A., Birmili, W., Albrecht, C., Hellack, B., Jermann, E., Wick, G., ... & Schins, R. P. (2010). Oxidant generation and toxicity of size-fractionated ambient particles in human lung epithelial cells. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 3539-3545.
64. Zanobetti, A., Franklin, M., Koutrakis, P., & Schwartz, J. (2009). Fine particulate air pollution and its components in association with cause-specific emergency admissions. *Environ Health*, 8, 58.
65. Zanobetti, A., Schwartz, J., & Dockery, D. W. (2000). Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ. Health Perspect*, 108, 1071-1077.

10. ANEXOS

ANEXO 1.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

The oxidative potential and biological effects induced by PM₁₀ obtained in Mexico City and at a receptor site during the MILAGRO Campaign

Raul Quintana^a, Jesús Serrano^b, Virginia Gómez^c, Benjamin de Foy^d, Javier Miranda^e, Claudia Garcia-Cuellar^a, Elizabeth Vega^f, Inés Vázquez-López^a, Luisa T. Molina^{g,h}, Natalia Manzano-León^a, Irma Rosasⁱ, Alvaro R. Osornio-Vargas^{a,j,*}

^aInstituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

^bFacultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^cInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^dEarth & Atmospheric Sciences, Saint Louis University, St. Louis, MO, USA

^eInstituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^fInstituto Mexicano del Petróleo, Mexico City, Mexico

^gMolina Center for Energy and the Environment, CA, USA

^hMassachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA

ⁱCentro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^jDepartment of Paediatrics, University of Alberta, 1048 RTF, 8308 114 St, Edmonton, AB T6G 2V2, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2011

Received in revised form

9 August 2011

Accepted 15 August 2011

Keywords:

Urban air pollution transport

Oxidative potential

Airborne particulate matter PM₁₀

Electron paramagnetic resonance (EPR)

Biological effects

ABSTRACT

As part of a field campaign that studied the impact of Mexico City pollution plume at the local, sub-regional and regional levels, we studied transport-related changes in PM₁₀ composition, oxidative potential and *in vitro* toxicological patterns (hemolysis, DNA degradation). We collected PM₁₀ in Mexico City (T_0) and at a suburban-receptor site (T_1), pooled according to two observed ventilation patterns ($T_0 \rightarrow T_1$ influence and non-influence). T_0 samples contained more Cu, Zn, and carbon whereas; T_1 samples contained more Al, Si, P, S, and K ($p < 0.05$). Only SO_4^{2-} increased in T_1 during the influence periods. Oxidative potential correlated with Cu/Zn content ($r = 0.74$; $p < 0.05$) but not with biological effects. T_1 PM₁₀ induced greater hemolysis and T_0 PM₁₀ induced greater DNA degradation. Influence/non-influence did not affect oxidative potential nor biological effects. Results indicate that ventilation patterns had little effect on intrinsic PM₁₀ composition and toxicological potential, which suggests a significant involvement of local sources.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Adverse health effects that have been linked to particulate matter (PM) in air pollution are related to the mass and size of the particulates, which are two variables that are routinely monitored in urban environments (Krewski et al., 2009). Evidence at the experimental and population levels indicates that variations in the mixture of the PM components may account for the observed heterogeneous health effects that vary according to season, location and health outcome (Bell et al., 2007, 2008; Perez et al., 2009; Zanobetti et al., 2009; Alfaro-Moreno et al., 2010; Atkinson et al., 2010; Tong et al., 2010). For example, studies in the USA have observed that significant changes in particulate matter with

aerodynamic diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) can cause specific hospital admissions, and cardiovascular disease admissions have been correlated to increased levels of specific PM_{2.5} components, such as Br, Cr, Ni and Na⁺. In addition, diabetes admissions have been correlated with increased As, organic carbon and SO_4^{2-} PM concentrations (Zanobetti et al., 2009). A recent study in London indicated that cardiovascular effects are associated with particle number concentrations, and the respiratory outcomes are associated with non-primary PM components (sodium and ammonium nitrate, sulfate, chloride and organic carbon) (Atkinson et al., 2010). Most of the existing evidence on the role of the PM composition in PM-related toxicity and deleterious health effects has been based on local and seasonal variability, and the local sources appear to play a pivotal role. The long-range transport of PM is an additional factor that is capable of affecting the PM mixtures. Studies in Spain have indicated that dust blown from the Sahara can enrich Barcelona's air pollution mix, which increases mortality risk during

* Corresponding author.

E-mail address: osornio@ualberta.ca (A.R. Osornio-Vargas).

Abbreviations

DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
EC	elemental carbon
EPR	electron paramagnetic resonance
HPLC	high-performance liquid chromatography
IMP	Instituto Mexicano del Petróleo
MCMA	Mexico City Metropolitan Area
MILAGRO	Megacities Initiative: Local And Global Research Observations
NIST	National Institute of Standards and Technology
OC	organic carbon
OP	oxidative potential
PBS	phosphate buffered saline
PM	particulate matter
PM _{2.5}	particulate matter with aerodynamic diameter ≤2.5 μm
PM ₁₀	particulate matter with aerodynamic diameter ≤10 μm
PIXE	particle-induced X-ray emission
PCA	principal component analysis
T ₀	time 0, urban location
T ₁	time 1, suburban location receptor site

Sahara-influenced events (Perez et al., 2008). Similar concerns exist in Asia where continental desert dust mixed with anthropogenic and biological pollutants can reach the eastern regions (Chen et al., 2010; Hashizume et al., 2010). More research is required on this emerging topic to improve the understanding on the impact of imported pollutants on the local pollution, such as concentration or composition, and their influence to health risks in these regions.

In this study, we explored the effects of transported pollutants by studying the toxicity patterns of particulate matter with aerodynamic diameter ≤10 μm (PM₁₀) samples that were collected at an urban-emitting site (T₀) and at a suburban-receptor site (T₁) (Fig. 1). Sampling occurred as part of a multidisciplinary, multicenter, international study that was designed to assess the impact of the air pollution plume from the Mexico City Metropolitan Area (MCMA) at the local, sub-regional and regional levels (MILAGRO Campaign) (Molina et al., 2010). Samples from sites T₀ and T₁ served to compare PM composition, PM oxidative potential, and *in vitro* biological effects (DNA and cell membrane disruption) by separating the measurement days into two categories based on dominant ventilation patterns (see Section 2.1) (de Foy et al., 2009; de Foy et al., 2008).

2. Materials and methods

2.1. PM sampling

Twenty-four hour PM₁₀ samples were obtained daily during March 2006 at two sites as part of the MILAGRO Campaign (Molina et al., 2010). The urban site (T₀) was located at the Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), and the suburban site (T₁) was located at the Universidad Tecnológica de Tecámac in the State of Mexico, which is located 30 km NW of site T₀ (Fig. 1). High-volume samplers (Tisch TE6070V, Roswell, GA, USA) with nitrocellulose membranes (Sartorius 11302-131, Goettingen, Germany) were used for the collection of the PM. The PM was mechanically recovered from the membranes according to previously published methods. Toxicological evaluation was conducted with aliquots of the pooled samples in three separate experiments, and each run was performed in triplicate. Aliquots were routinely autoclaved to limit the participation of viable microorganisms in the samples (Alfaro-Moreno et al., 2009).

Some of the samples were analyzed on a daily basis, and other samples were pooled into two categories labeled “influence” and “non-influence” days. The influence periods included March 8–13 and March 18–21. The non-influence

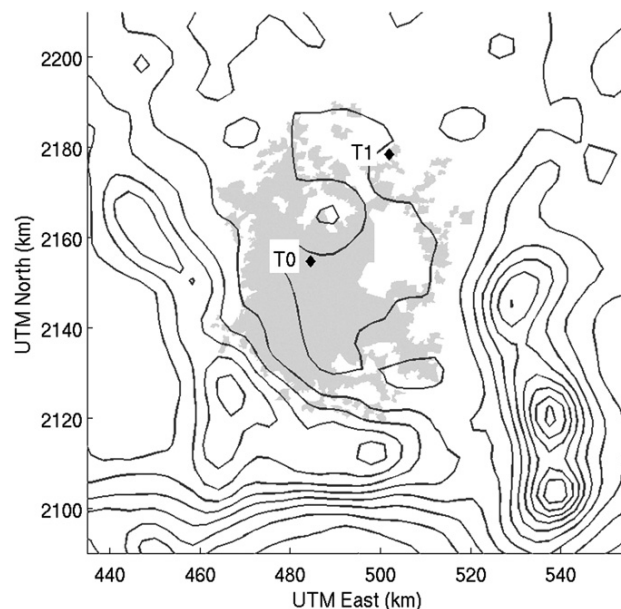


Fig. 1. The map shows the basin where the MCMA resides. The urban area is shaded, and the location of sites T₀ and T₁ are indicated. Terrain contours are every 500 m.

periods included March 1–7, March 14–17, and March 22–30. The classification was based on a cluster analysis of the surface wind patterns during the field campaign (de Foy et al., 2008). Everyday there were similar drainage flows into the basin at night. The main difference between the days in terms of air quality impact was the wind pattern in the early afternoon. On the non-influence days, there was a predominance of clusters with transport from the north and northeast (clusters 4 and 6 in Fig. 11 of de Foy et al., 2008). On these days, the urban plume was transported to the south and did not impact T₁. On the influence days, there was more transport from the east and southeast in the early afternoon (cluster 5), and from the south and southwest in the later afternoon (clusters 7 and 8) which transports the urban plume northwards past T₁.

Overall the influence days were more homogeneous comprising stronger southwesterly winds that drove the surface winds over the basin and caused a north–south convergence zone. This convergence zone corresponded to a region of higher pollutant loadings that moved toward the northeast as the plume was vented in the late afternoon. In contrast, the non-influence days were more heterogeneous comprising three different patterns: a strong southward flow throughout the basin, Cold Surge events with northwesterly winds that were associated with strong southward surface transport and a weak northerly wind component with rain in the southern part of the basin (de Foy et al., 2008; de Foy et al., 2009).

Particle transport analysis was performed for the urban plume (de Foy et al., 2009) using WRF-FLEXPART. This shows that during the influence days there was a more continuous impact of the urban plume at T₁, whereas during the non-influence days the impact at T₁ was sporadic. It should be noted however that the separation during the two categories is not clear-cut. This is because the wind transport in the Mexico City basin is very complex with strong diurnal variations everyday that exceed the magnitude of the synoptic-scale variations from day to day.

Eulerian aerosol simulations were performed for the MILAGRO field campaign with an analysis of source contribution fractions at T₀ and T₁ (Fast et al., 2009; Hodzic et al., 2010). These suggest an important contribution to primary organic aerosols from anthropogenic sources and a lesser contribution from biomass burning. In addition, time series of elemental carbon concentrations at T₀ and T₁ further show that T₀ has higher impacts from local sources whereas T₁ has lower baseline levels and a bigger fraction during the day possibly from urban plume impacts.

2.2. Elemental analysis by particle-induced X-ray emission (PIXE)

One milligram of PM₁₀ was ground with an agate mortar and placed on 3.5-μm thick Mylar substrates. The samples were analyzed with PIXE using a 2.2 MeV proton beam, which was produced by a 9SDH-2 Pelletron accelerator (National Electrostatics Corporation, Middleton, WI, USA), to identify and quantify the trace elements.

X-rays were detected with a LEGe detector (Canberra Industries, Meriden, CT, USA) at a resolution of 150 eV–5.9 keV (Miranda et al., 2000). A 12-μm thick Mylar window separated the vacuum chamber from the X-ray detector. The proton beam was 5 mm in diameter and had an energy level of 2.2 MeV with a beam current of

15 nA. The total integrated charge for each filter spectrum was 5 μC . A PCA3 multichannel analyzer (Oxford Industries-Tennelec, Oak Ridge, TN, USA) was used to collect the X-ray spectra, which were analyzed by a Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) (IAEA, 1995). The detection system response was measured using thin-film MicroMatter standards (Deer Harbor, WA, USA). The accuracy for PIXE analysis was evaluated using a different set of MicroMatter standards, which had an error that was less than 0.7% for the detected elements in this study. The measured elemental concentrations are expressed in units of $\mu\text{g mg}^{-1}$.

2.3. Ion analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC)

The content of the water-soluble ionic species was determined by ion chromatography using an HPLC system (Waters line[®] alliance[™]) with a W2695 separation module and a W432 conductivity detector. The anions (Cl^- , NO_3^- , and SO_4^{2-}) were analyzed using a stainless steel Waters[®] IC-Pak[™] Anion HR polymethacrylate resin column (column, 4.6×75 mm, 30 ± 3 $\mu\text{eq mL}^{-1}$ capacity). The mobile phase consisted of a solution of sodium borate/gluconate with a conductivity that was approximately 270 mS. The cations (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+}) were analyzed using a stainless steel Waters IC-Pak[™] Cation M/D column (3.9×150 mm, 1.5 ± 0.2 meq g^{-1} capacity), and the mobile phase consisted of 0.1 mM EDTA and 3.0 mM HNO_3 . Approximately 1 mg of each PM sample was extracted in 15 mL of deionized water (ASTM Type 1 deionized water, 18.2 $\text{M}\Omega$ cm, Quantum[™] ICP cartridge with a 0.1 μm filter, Millipore[®]) in an orbital shaker for 60 min at 4°C , 24 h prior to analysis. The samples were filtered with a 0.22 μm filter (Millipore[®]) and ion analysis was performed using 100 μL of the filtrate. The ionic species were identified according to their conductivity and were quantified by comparison with known concentrations of NIST certified standards (Ultra Scientific, Ultragrade[™]). The calibration curves were acceptable when the correlation coefficients were greater than 0.99. Type I deionized water blanks, extraction blanks and filter blanks were analyzed, and the blank concentrations were subtracted from all samples (Vega et al., 2004, 2011). The validation method parameters were linear ($R^2 < 0.99$), reproducible and repeatable (coefficients of variation $< 2\%$). The detection limits were 7 ng mL^{-1} for Na^+ and 15 ng mL^{-1} for Ca^{2+} .

2.4. Organic and elemental carbon determination by thermal/optical carbon analysis

Organic carbon (OC) and elemental carbon (EC) PM_{10} content were analyzed by thermal/optical reflectance. A punch with an area of 0.49 cm^2 from each of the filtered samples was analyzed for the carbon fractions following the Interagency Monitoring of Protected Visual Environments protocol using a DRI Model 2001 Thermal/Optical Carbon Analyzer (Atmoslytic Inc., Calabasas, CA, USA). The analyzer operates by liberating carbon compounds under different temperature and oxidation environments. These compounds were converted to CO_2 by passing the volatilized species through an oxidizer, and reduced CO_2 to CH_4 after the flow was passed through a methanator. The CH_4 equivalents were quantified with a flame ionization detector (Fung et al., 2002; Vega et al., 2011).

The analyzer was verified at the beginning and end of each day with known amounts of He/5% CH_4 , and the analyzer was verified with a calibration check with He/5% CH_4 after each sample had been run. Full instrument calibration was performed by spiking pre-fired quartz punches with 1.0–10.0 μL of 1800 ppm potassium hydrogen phthalate in 2% HCl and injecting 10–2000 μL of CO_2 and CH_4 gases in 5% He (Vega et al., 2011), and the limit of detection was 0.1 $\mu\text{g C}$ for the EC and OC samples.

2.5. PM_{10} oxidative potential measured by electron paramagnetic resonance (EPR)

The generation of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) by PM_{10} (0.75 mg mL^{-1}) was studied in the presence of H_2O_2 (0.125 M) and the spin-trapping reagent, 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) (0.1 M), in phosphate buffered saline (PBS). The mixture was incubated for 10 min in the dark and was continuously shaken at 37°C before being filtered through a 0.1 μm filter (Acrodisc 25-mm syringe filter; Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA). The clear filtrate was immediately transferred to a 100 μL glass capillary and was measured for 2 min using a JEOL JES TE-300 EPR spectrometer (JEOL, Japan; 9.4 GHz, 10 mW) with a center field of 335 ± 5 mT, a modulation width of 0.04 mT, and an amplitude of 200. Quantification was performed using double integration of the total amplitudes of the DMPO–OH peaks (1:2:2:1 quartet pattern) with the ESPRIT-382 v.196 program (JEOL, Japan), and the intensity was expressed in arbitrary units that were related to the instrumental settings. This particular method to evaluate the oxidative potential of the PM_{10} focused on metal-related effects and Fenton-like reactions (Valavanidis et al., 2000).

2.6. Induction of DNA degradation

Degradation of “naked” DNA was detected using DNA from Balb/c 3T3 cells that was obtained using a commercial DNA extraction kit (Roche 11 814 770 001). DNA quantification was performed with a UV spectrophotometer at 260 nm. Isolated DNA (400 ng) was exposed to 5, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the PM in double-distilled water, in the presence or absence of 1 mM H_2O_2 for 24 h at 37°C in a reaction volume of 40 μL . The analysis was performed by electrophoresis

(H5 Model H5 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus; GIBCO-BRL Gaithersburg, MD, USA) using 1.5% agarose gels that were run at 100 V for 3 h and stained with ethidium bromide (1.2 mg mL^{-1}). The gels were photographed under UV light using a Kodak Gel logic 200 imaging system (New Haven, CT, USA). All gels included: 1) $\lambda/\text{Hind III}$ (1 μg), 2) 400 ng of DNA alone, 3) 400 ng of DNA with 1 mM H_2O_2 , 4) a “Fenton Reaction” control using 400 ng of DNA plus 5 mM CuSO_4 with 1 mM H_2O_2 , 5) 400 ng of DNA plus 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PM and 6) 400 ng of DNA with 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PM and 1 mM H_2O_2 . Quantitative analysis of degradation was performed using ImageJ64 software (version 1.44[®] for Mac OS X, NIH, USA). The images of the gels were transformed to Greyscale Mode and using curve adjustments, the greyscale for the darkest area was adjusted to 95% and for the brightest one to 5%, using Photoshop CS4 Extended Version 11.0 (Adobe Systems Inc., USA). The images of the DNA bands were analyzed for optical density using a fixed rectangular area of 450 (30×15) pixels, and the results were expressed as ng of DNA after comparing with the densities from the corresponding untreated DNA (400 ng) bands.

This method was selected to evaluate DNA degradation based on metal-related effects (Fenton-like reactions) to match the experimental conditions used for measuring the oxidative potential of the PM_{10} .

2.7. Hemolysis

Human red blood cells from three individuals were separated from the blood by centrifugation at $475 \times g$ for 10 min at 4°C . The cells were washed three times with four volumes of an isotonic solution of 130 mM KCl and 20 mM Tris buffer at pH 7.4. Subsequently, a 0.6% suspension of the cells was incubated with 20–160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PM, using the same isotonic solution. After 60 min, the samples were centrifuged at $475 \times g$ for 10 min at 4°C and were analyzed using a spectrophotometer at 540 nm to measure the concentration of released hemoglobin in the supernatant. The results are expressed as percent hemolysis in relation to the hemoglobin released by the same amount of red blood cells incubated with distilled water. We choose hemolysis to explore alternative mechanisms of cell damage. PM could affect cell membrane integrity as a result of direct PM–cell membrane interactions (Osornio-Vargas et al., 2011).

2.8. Statistical analysis

Descriptive statistics of the concentrations of the elements that were identified by PIXE in the non-pooled daily PM_{10} samples from the T_0 and T_1 sites were calculated. Differences by site and influence/non-influence days were estimated by Student's *t*-test. In addition, the PM_{10} elements were grouped according to the dispersion patterns into influence and non-influence samples, and the differences by site and influence/non-influence periods were explored using the Mann–Whitney test. In order to simplify the number of variables related to the elemental

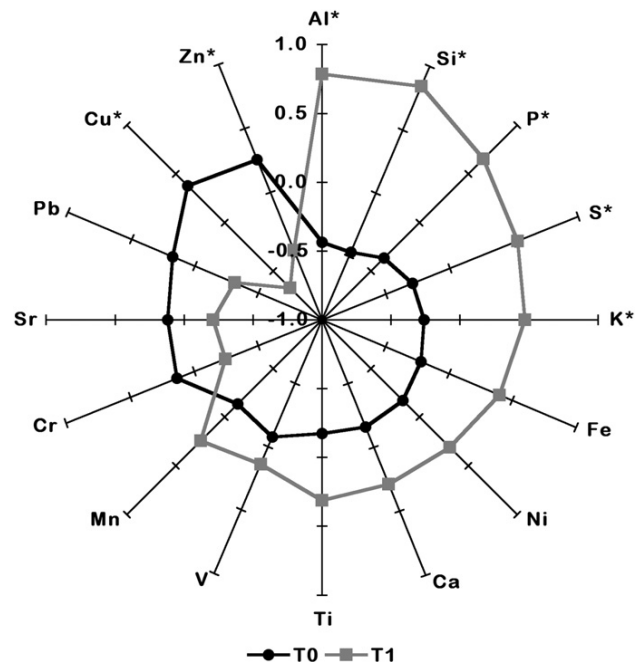


Fig. 2. Normalized PM_{10} values of the elemental content indicate a clear pattern in the samples that were collected from site T_0 compared to the samples that were collected from site T_1 . Metals, such as Cu and Zn, were always highest in samples from site T_0 . Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

composition of the PM₁₀, principal component analysis (PCA) was applied using the elements that had statistically significant differences in concentration by site. The relationships between the elemental composition, oxidative potential and biological effects were approached by Pearson's correlation coefficients, which compared the components that resulted from PCA and the mean values that were determined for the oxidative potential, hemolysis (induced by 80 μg mL⁻¹) and DNA degradation (induced by 80 μg mL⁻¹) based on the influence/non-influence patterns.

We also performed descriptive statistics and *t*-test analysis to determine any differences by site and wind patterns for the biological effects, ions and total organic and elemental carbon concentrations.

3. Results

3.1. Elemental PM composition

The PM from sites T₀ and T₁ was characterized by the presence of seventeen elements: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn,

Sr and Pb. Chlorine was not identified in all of the samples and was eliminated from consideration in subsequent analyses. Site comparison of the elements in the PM₁₀ concentration indicated that Cu and Zn were significantly higher at site T₀ than at T₁; however, Al, Si, P, S, and K were higher at site T₁ (Fig. 2). When the samples were grouped according to the influence/non-influence periods, site T₀ showed decreased levels of Zn, Pb, Cu, Ni and S during non-influence; however, only changes in the concentration of Zn were statistically significant (*p* < 0.05) (Fig. 3A). In addition, no differences in the elemental concentrations were observed at site T₁ (Fig. 3B).

When comparing the sites during the influence days, no clear patterns from site T₀ that affected site T₁ were identified. The influence days appeared to have a diluting effect at both sites because some elements lost the statistically significant differences that were observed in Fig. 2, such as Zn at site T₀ and K at site T₁ (Fig. 3C).

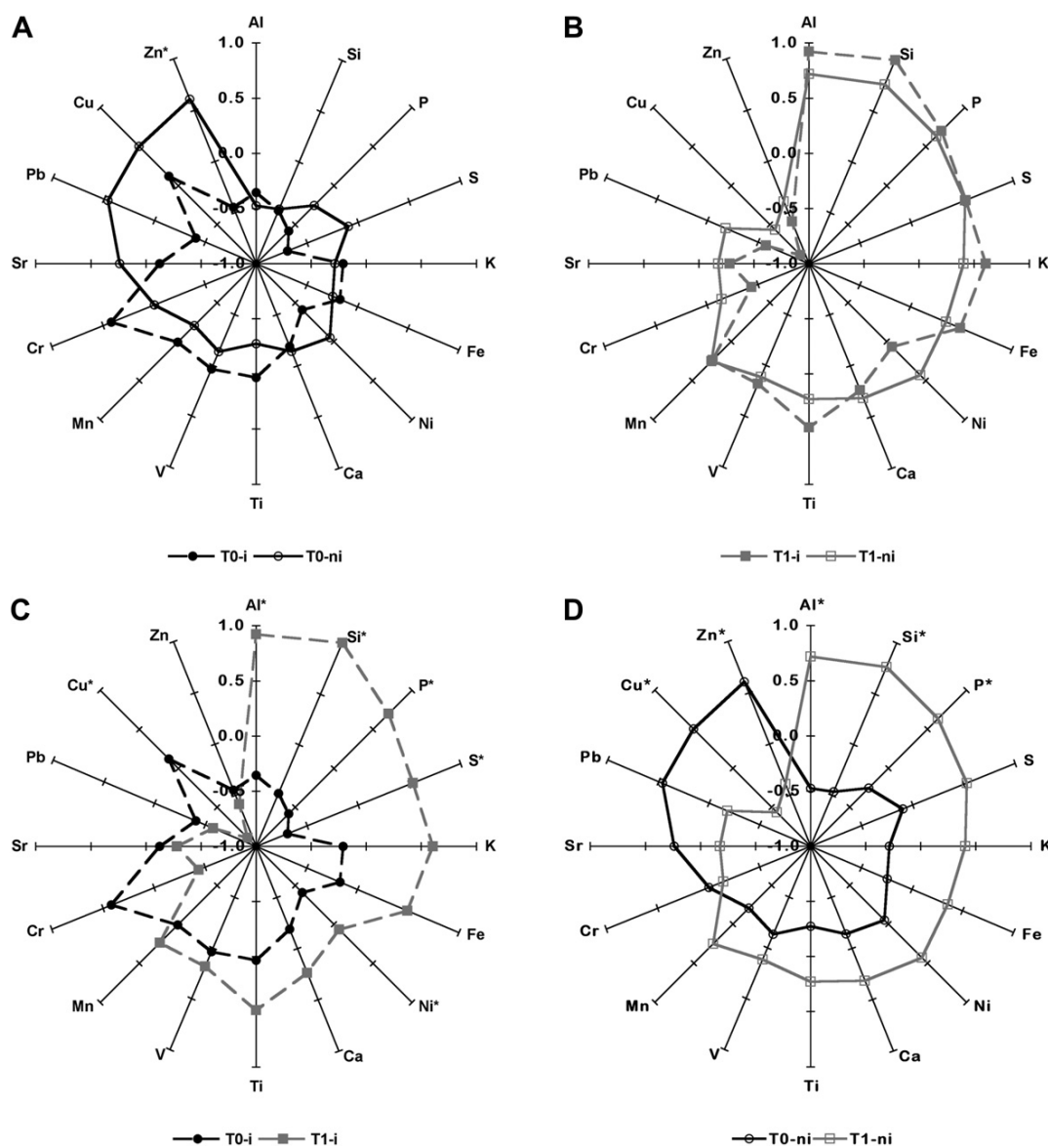


Fig. 3. PM₁₀ elemental content according to ventilation patterns after normalization. Influence days showed a decreased elemental content in the samples from site T₀ (A), and there were minimal changes in the samples from site T₁ (B). Characteristic T₀ (C) and T₁ (D) patterns suffered no changes when compared to the sites according to influence/non-influence periods. Asterisks indicate statistically significant differences (*p* < 0.05).

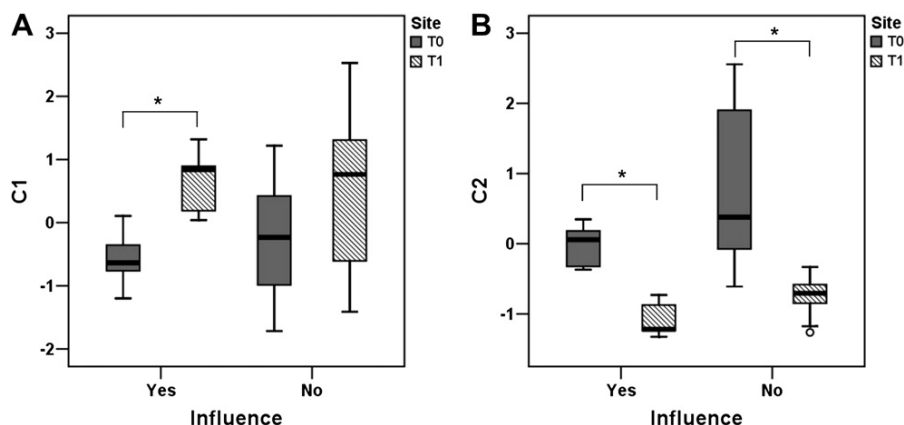


Fig. 4. Principal component analysis identified two components in the PM₁₀ samples from sites T₀ and T₁. C₁ had an increased content in samples from site T₁ (A) while C₂ content was higher in samples from site T₀ (B). Component patterns were not changed according to ventilation patterns. The statistically significant changes that were observed were due to a decreased variability that was observed during the influence periods. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

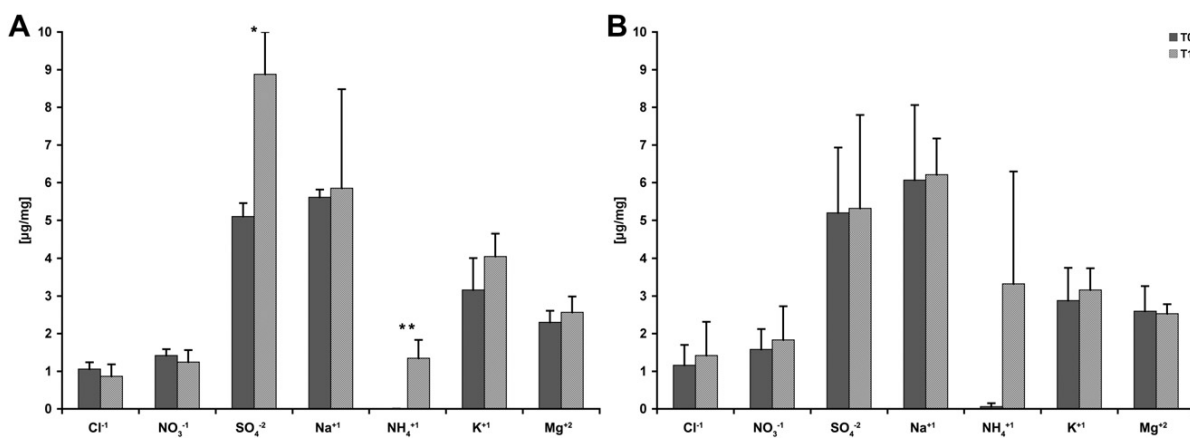


Fig. 5. Ions concentration in the PM₁₀ samples that were collected during influence periods (A) and non-influence periods (B). Only SO₄²⁻ concentrations were increased by a statistically significant margin at site T₁ ($p < 0.05$) when compared to site T₀ during the influence periods. No difference in the SO₄²⁻ content was observed when the overall content by site was compared and was observed regardless of ventilation patterns.

Table 1
Descriptive statistics for carbon concentration [$\mu\text{g mg}^{-1}$] in PM₁₀ samples.

Carbon	T ₀		T ₁		T ₀ vs. T ₁ <i>p</i>
	Median	SD	Median	SD	
Total (TC)	80.81	18.80	44.06	20.15	< 0.05
Organic (OC)	66.21	15.94	36.77	17.07	< 0.05
Elemental (EC)	14.61	4.22	7.29	3.50	< 0.05
OC/TC ratio	0.82		0.83		

T₀ = emitting site; T₁ = receptor site; SD = standard deviation.

non-influence days retained the same site-related differences that were presented in Fig. 2, which were increased Cu and Zn levels at site T₀ and increased Al, Si and P levels at site T₁ (Fig. 3D).

Principal component analysis of the elemental composition resulted in two components, which were called C₁ (Al, Si, P, S, K and Ni) and C₂ (Zn and Cu). C₁ concentrations tended to be higher in samples from site T₁ than in samples from site T₀, and statistically significant differences occurred only during the influence days ($p < 0.05$) (Fig. 4A). C₂ concentrations were significantly elevated in samples from site T₀ ($p < 0.05$), and there were no statistically

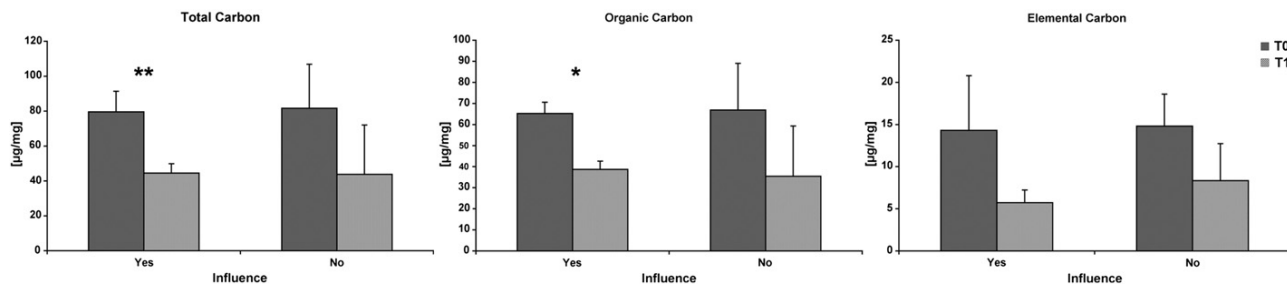


Fig. 6. PM₁₀ carbon content was always higher in samples from site T₀. The differences observed according to ventilation patterns were related to the lower variability observed during the influence periods. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

significant differences ($p > 0.05$) observed for the influence and non-influence days (Fig. 4B).

3.2. Ion PM composition

A large variability was observed in the ions that were present in the PM₁₀. Only NH₄⁺ showed statistically significant higher concentrations at site T₁ compared to site T₀ ($0.039 \pm 0.070 \mu\text{g mg}^{-1}$ vs. $2.531 \pm 2.378 \mu\text{g mg}^{-1}$; $p < 0.05$). During the influence days, SO₄²⁻ concentrations showed a statistically significant increase in concentration at site T₁ when compared to site T₀ ($5.100 \pm 0.353 \mu\text{g mg}^{-1}$ vs. $8.879 \pm 1.121 \mu\text{g mg}^{-1}$; $p < 0.05$; Fig. 5A). NH₄⁺ was elevated at site T₁ during the influence and non-influence periods; however, the difference in the concentrations was not statistically significant during influence days ($0.004 \pm 0 \mu\text{g mg}^{-1}$ vs. $1.343 \pm 0.491 \mu\text{g mg}^{-1}$; $p = 0.061$; Fig. 5A and B). There were no statistically significant differences that were observed for the ions during the non-influence days.

3.3. Elemental and organic carbon PM composition

The carbon content represented up to 8% of the total PM₁₀ mass. Statistically significant increased carbon concentrations were observed in the PM₁₀ from site T₀ compared to site T₁ ($80.81 \mu\text{g mg}^{-1}$ vs. $44.06 \mu\text{g mg}^{-1}$; $p < 0.05$; Table 1). All carbon fractions were positively correlated with C₂ ($r > 0.775$; $p < 0.05$) and negatively correlated with C₁, which indicates a stronger correlation with the urban sources. OC/TC ratios (~80%) were similar at both sites, and there were no changes observed during the influence/non-influence periods (Fig. 6).

3.4. PM oxidative potential

All PM₁₀ samples were capable of generating •OH in the presence of H₂O₂. The results were highly variable, especially for samples from site T₀. In general, the samples from site T₀ had a larger oxidative potential compared to the samples from site T₁; however, these differences were not statistically significant. There was a slightly decreased PM₁₀-induced generation of •OH that was observed during the influence days, although, these differences were only statistically significant in the T₁ samples ($p < 0.05$) (Fig. 7A).

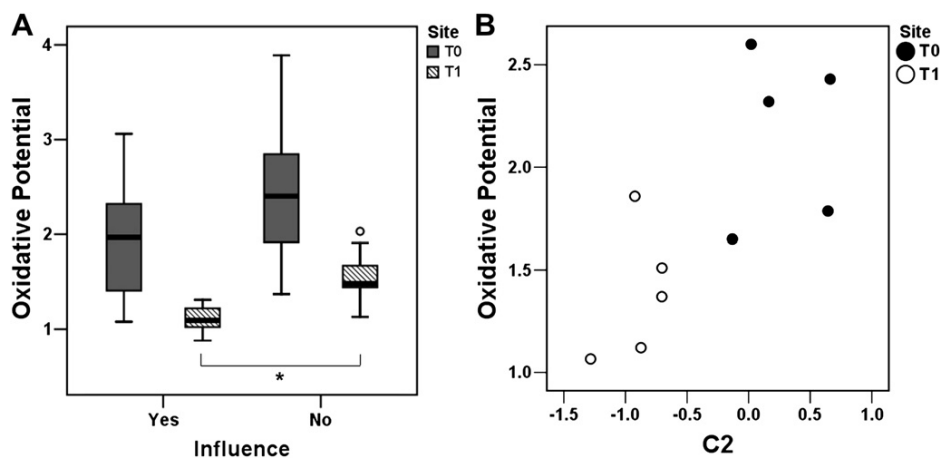


Fig. 7. The oxidative potential of the PM₁₀ was always higher in samples from T₀. The ventilation patterns did not affect this difference aside from a decreased oxidative potential in samples from site T₁ during the influence periods, which was due to decreased variability (A) ($p < 0.05$). Oxidative potentials correlated with the C₂ content in the PM₁₀ samples ($r = 0.74$) (B).

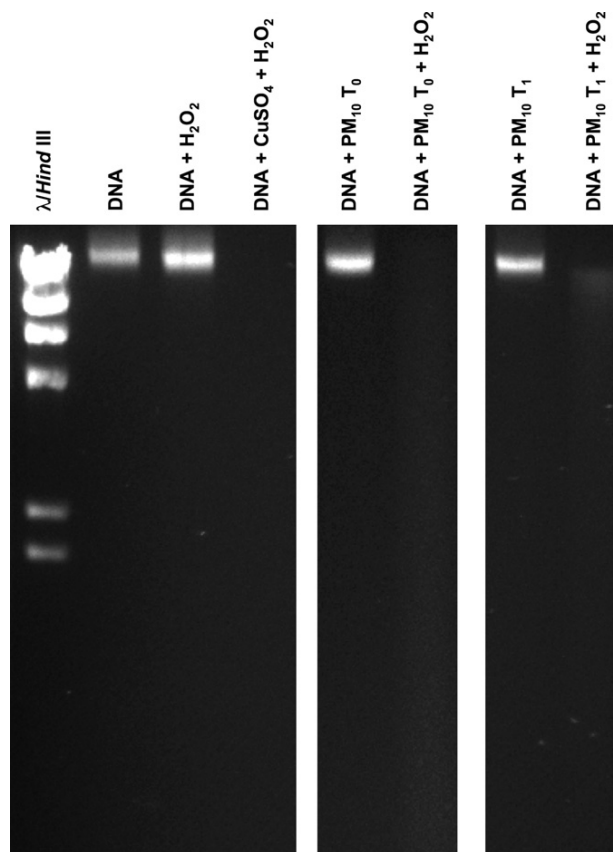


Fig. 8. Representative electrophoresis of “naked” DNA (isolated from Balb/c 3T3 cells) exposed to $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ of PM₁₀ from T₀ or T₁. Only DNA samples incubated with PM₁₀ in the presence of 1 mM of H₂O₂ showed degradation. λ DNA/Hind III digest (size marker); DNA alone, DNA with 1 mM of H₂O₂, DNA with 5 mM of CuSO₄ (“Fenton reaction” control), were used as controls.

The oxidative potential had a positive correlation with the C₂ concentrations from both sites ($r = 0.74$; $p < 0.05$). A reduced oxidative potential was observed in the samples from site T₁ when compared to site T₀ (Fig. 7B).

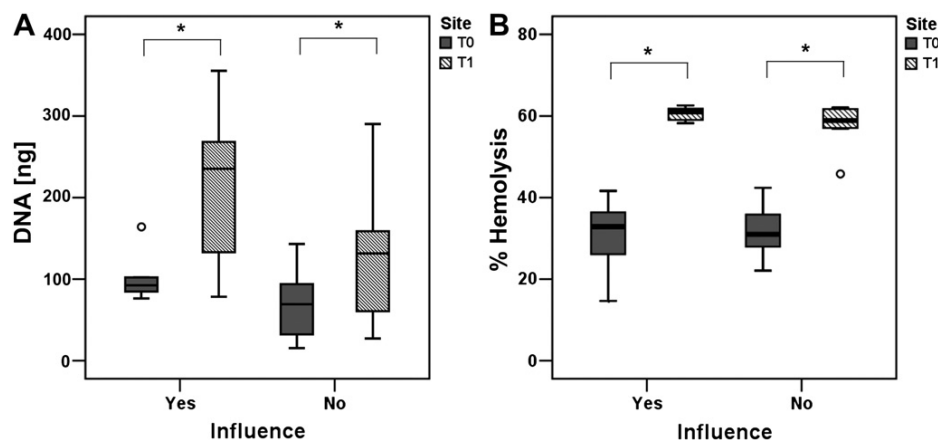


Fig. 9. PM₁₀-induced DNA degradation was greater with samples from T₀ than with samples from T₁ and had no connection with ventilation patterns (A). However, samples from T₁ were stronger inducers of hemolysis than with samples from T₀ with no indication of any participation of the ventilation patterns, too. (* $p < 0.05$) (B). Results obtained with 80 mg mL⁻¹ of PM₁₀.

3.5. Biological effects

PM₁₀ samples induced concentration-dependant DNA degradation and hemolysis (data not shown). Optimal DNA degradation and hemolysis resulted from exposures to 80 μg mL⁻¹ PM₁₀. Results presented below are based on those concentrations.

Highly variable DNA degradation was induced by all PM₁₀ samples. An example of the gels where DNA degradation was evaluated is presented in Fig. 8. More damage was induced by samples from site T₀ ($p < 0.05$) (Fig. 9A), correlating with C₂ ($r = 0.69$, $p < 0.05$) but not with oxidative potential. Sample from influence days did not induce larger DNA degradation. Control experiments showed that unexposed DNA to PM required the presence of CuSO₄ and H₂O₂ to be fully degraded (Fig. 8).

The hemolysis of red blood cells was induced with PM₁₀ samples from both sites, and the samples from site T₁ resulted in a greater amount of hemolysis ($p < 0.05$) (Fig. 9B). However, there were no differences between the influence/non-influence periods or a relationship between hemolysis and the principal components (C₁ or C₂). Hemolysis did not correlate with PM₁₀ oxidative potential.

4. Discussion and conclusions

The MILAGRO Campaign that was performed in the MCMA in March 2006 offered an opportunity to explore the PM₁₀ elemental composition, oxidative potential and the *in vitro* toxicity by comparing samples from the emitting and the receptor sites to assess potential changes that were related to the ventilation patterns.

The composition of the PM₁₀ varied by site. Site T₀ had a greater concentration of Cu, Zn (C₂) and total carbon, probably related to anthropogenic emissions. However, site T₁ had a predominance of Al, Si, P, and K (C₁), elements related to soil and biomass burning sources (Moffet et al., 2008; Querol et al., 2008). This pattern did not change based on the influence/non-influence periods. There was extensive biomass burning around the MCMA during MILAGRO (Yokelson et al., 2007) which influenced both T₀ and T₁ (Moffet et al., 2008; Aiken et al., 2010) and account for part of the P and K content of the aerosols. In addition there are local sources that are different between the sites. T₀ had a number of street vendors and meat cooking operations near-by. T₁ was in a more rural area and had more trash burning and small scale agricultural fires.

Our results indicated that the SO₄²⁻ content in the PM₁₀ increased at site T₁ during the influence periods. However, other elements and components decreased during the same period, which could be an indication of wind-induced dilution effects. This result is in agreement with other studies that were performed during the MILAGRO Campaign, which indicated the existence of rapid mixing and venting of the urban plume in the MCMA and the short lifetimes of aerosols in the basin. The overall plume transport in the MCMA varied rapidly during the day. A typical day began with movement of the plume to the south, which was followed by an early afternoon shift in the wind, which resulted in transporting the plume to the north. Cold Surge events vent the basin to the south and occur on a time scale of 5–10 h (de Foy et al., 2009; de Foy et al., 2006; Kleinman et al., 2008). Therefore, future studies on the impact of transport will need to use higher time-resolution data.

We also observed that the PM₁₀ components (elements, ions and total carbon), oxidative potential, and biological effects had a lower variability during the influence days compared with the non-influence days. This is likely a result of the more homogeneous conditions during the influence days as discussed in Section 2.1. In contrast, the non-influence days actually include three sub-categories with varying meteorological patterns (de Foy et al., 2008; de Foy et al., 2009).

The oxidative potential and C₂ participation were predominantly observed in samples from T₀; however, the biological effects did not correlate with the oxidative potential. In the case of DNA damage, the results correlated with C₂ but were independent of the PM₁₀ oxidative potential. This result was observed even though the experimental design addressed the participation of metals in Fenton-like reactions. Therefore, the results indicated that DNA degradation relied on more complex mechanisms aside from the presence of metals in the sample (Lloyd et al., 1997, 1998; Lloyd and Phillips, 1999; Prahalad et al., 2000; Pan et al., 2004).

Hemolysis was predominantly induced by PM₁₀ from the T₁ site where the soil components had a significant concentration, which is in agreement with previous reports (Osornio-Vargas et al., 2011).

The biological effects that were explored in this study were not dependent on the classification of the influence and non-influence periods. This is supported by other observations that were made during the MILAGRO Campaign, which indicated that the main difference in the aerosols at sites T₀ and T₁ was due to local sources (Molina et al., 2010). Site T₀ was located in a dense urban area with

heavy traffic and local industry while site T_1 was located in a suburban area with local traffic and unpaved roads, which led to heavy dust loadings, as well as local trash and biomass burning. The presence of increased Cu, Zn and Pb content in the PM_{10} from site T_0 ($>450 \text{ ng m}^{-3}$) compared to T_1 ($<200 \text{ ng m}^{-3}$) (Moreno et al., 2008) supports the hypothesis that local pollutants have a larger participation in the observed toxicity.

Oxidative stress currently represents the central mechanism that underlies air pollution-related health effects. The identification of methods to assess the pro-oxidative potential of air pollution has been a key task to improve research. For example, studies that have explored the PM-related oxidative potential using EPR to identify $\cdot\text{OH}$ generation have reported conflicting results. On the one hand, the EPR results have correlated with the PM-induced *in vitro* DNA damage (Shi et al., 2006); however, on the other hand, urban $PM_{2.5}$ from 20 different European cities failed to demonstrate correlations between $PM_{2.5}$ with an EPR-detected oxidative potential and other $PM_{2.5}$ variables (Kunzli et al., 2006).

In this study, we were able to correlate EPR-detected PM_{10} oxidative potential with the PM_{10} Cu/Zn content; however, the data failed to correlate with the *in vitro* biological effects. It is our current working hypothesis that the PM-related *in vitro* biological effects are the result of multiple mechanisms that are mediated by complex interactions among the PM components, beyond those identified in this study. Metal synergisms and the participation of organics have been described as key issues in PM-induced biological effects (Cooper et al., 2009; Alfaro-Moreno et al., 2010).

Although there is compelling evidence on the role of oxidative stress and PM-related deleterious effects (Alfaro-Moreno et al., 2010), there is also evidence in the literature that describes some biological responses, which are not likely to be related to oxidative stress. For example, in PM–cell membrane interactions that affected the membrane integrity (Osornio-Vargas et al., 2011), the PM affected functionality of the membrane receptors (Bonner et al., 1998; Manzano-León et al., 2009) and also altered functionality of the cytosolic enzymes (Chirino et al., 2010). In these cases, different PM components, such as crystalline soil components, endotoxins or metals, can explain the observed effects.

Our study demonstrated that the existence of ventilation patterns that favored the transport of the PM from an urban site to a receptor site was not great enough to overcome the composition and toxic effects that were related to the local PM_{10} characteristics. However, the transport patterns in the MCMA are extraordinarily complex, both spatially and temporally. Future work on the impact of the ventilation will require an increased time resolution of the measurements.

Acknowledgments

This work was supported by the Comisión Ambiental Metropolitana, MILAGRO Campaign and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-M43138). We thank G. Flores, L. Sevilla, and S. Escalona for technical support. Meteorological analysis was supported by US National Science Foundation award ATM-0810950.

References

- Aiken, A.C., de Foy, B., Wiedinmyer, C., DeCarlo, P.F., Ulbrich, I.M., Wehrl, M.N., Szidat, S., Prevot, A.S.H., Noda, J., Wacker, L., Volkamer, R., Fortner, E., Wang, J., Laskin, A., Shutthanandan, V., Zheng, J., Zhang, R., Paredes-Miranda, G., Arnott, W.P., Molina, L.T., Sosa, G., Querol, X., Jimenez, J.L., 2010. Mexico City aerosol analysis during MILAGRO using high resolution aerosol mass spectrometry at the urban supersite (T_0) – part 2: analysis of the biomass burning contribution and the non-fossil carbon fraction. *Atmos. Chem. Phys.* 10, 5315–5341. doi:10.5194/acp-10-5315-2010.
- Alfaro-Moreno, E., García-Cuellar, C., De Vizcaya-Ruiz, A., Rojas-Bracho, L., Osornio-Vargas, A.R., 2010. Cellular mechanisms behind particulate matter air pollution-related health effects. In: Gurjar, B.R., Molina, L.T., Ojha, C.S.P. (Eds.), *Air Pollution: Health and Environmental Concerns*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 249–276.
- Alfaro-Moreno, E., Torres, V., Miranda, J., Martínez, L., García-Cuellar, C., Nawrot, T.S., Vanaudenaerde, B., Hoet, P., Ramirez-Lopez, P., Rosas, I., Nemery, B., Osornio-Vargas, A.R., 2009. Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ. Res.* 109 (5), 528–535.
- Atkinson, R.W., Fuller, G.W., Anderson, H.R., Harrison, R.M., Armstrong, B., 2010. Urban ambient particle metrics and health: a time-series analysis. *Epidemiology* 21 (4), 501–511.
- Bell, M.L., Dominici, F., Ebisu, K., Zeger, S.L., Samet, J.M., 2007. Spatial and temporal variation in $PM_{2.5}$ chemical composition in the United States for health effects studies. *Environ. Health Perspect.* 115 (7), 989–995.
- Bell, M.L., Ebisu, K., Peng, R.D., Walker, J., Samet, J.M., Zeger, S.L., Dominici, F., 2008. Seasonal and regional short-term effects of fine particles on hospital admissions in 202 US counties, 1999–2005. *Am. J. Epidemiol.* 168 (11), 1301–1310.
- Bonner, J.C., Rice, A.B., Lindroos, P.M., O'Brien, P.O., Dreher, K.L., Rosas, I., Alfaro-Moreno, E., Osornio-Vargas, A.R., 1998. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19 (4), 672–680.
- Chen, P.S., Tsai, F.T., Lin, C.K., Yang, C.Y., Chan, C.C., Young, C.Y., Lee, C.H., 2010. Ambient influenza and avian influenza virus during dust storm days and background days. *Environ. Health Perspect.* 118 (9), 1211–1216.
- Chirino, Y.I., Sanchez-Perez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Morales-Barcenas, R., Gutierrez-Ruiz, M.C., Segura-Garcia, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., García-Cuellar, C.M., 2010. PM_{10} impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol. Lett.* 193 (3), 209–216.
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., Kumar, A., 2009. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1523–1528.
- de Foy, B., Fast, J.D., Paech, S.J., Phillips, D., Walters, J.T., Coulter, R.L., Martin, T.J., Pekour, M.S., Shaw, W.J., Kastendeuch, P.P., Marley, N.A., Retama, A., Molina, L.T., 2008. Basin-scale wind transport during the MILAGRO field campaign and comparison to climatology using cluster analysis. *Atmos. Chem. Phys.* 8, 1209–1224.
- de Foy, B., Zavala, M., Bei, N., Molina, L.T., 2009. Evaluation of WRF mesoscale simulations and particle trajectory analysis for the MILAGRO field campaign. *Atmos. Chem. Phys.* 9, 2113–2163.
- de Foy, B., Varela, J.R., Molina, L.T., Molina, M.J., 2006. Rapid ventilation of the Mexico City basin and regional fate of the urban plume. *Atmos. Chem. Phys.* 6, 2321–2335.
- Fast, J., Aiken, A.C., Allan, J., Alexander, L., Campos, T., Canagaratna, M.R., Chapman, E., DeCarlo, P.F., de Foy, B., Gaffney, J., de Gouw, J., Doran, J.C., Emmons, L., Hodzic, A., Herndon, S.C., Huey, G., Jayne, J.T., Jimenez, J.L., Kleinman, L., Kuster, W., Marley, N., Russell, L., Ochoa, C., Onasch, T.B., Pekour, M., Song, C., Ulbrich, I.M., Warneke, C., Welsh-Bon, D., Wiedinmyer, C., Worsnop, D.R., Yu, X.-Y., Zaveri, R., 2009. Evaluating simulated primary anthropogenic and biomass burning organic aerosols during MILAGRO: implications for assessing treatments of secondary organic aerosols. *Atmos. Chem. Phys.* 9, 6191–6215. doi:10.5194/acp-9-6191-2009.
- Fung, K., Chow, J.C., Watson, J.G., 2002. Evaluation of OC/EC speciation by thermal manganese dioxide oxidation and the IMPROVE method. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 52 (11), 1333–1341.
- Hashizume, M., Ueda, K., Nishiwaki, Y., Michikawa, T., Onozuka, D., 2010. Health effects of Asian dust events: a review of the literature. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 65 (3), 413–421.
- Hodzic, A., Jimenez, J.L., Madronich, S., Canagaratna, M.R., DeCarlo, P.F., Kleinman, L., Fast, J., 2010. Modeling organic aerosols in a megacity: potential contribution of semi-volatile and intermediate volatility primary organic compounds to secondary organic aerosol formation. *Atmos. Chem. Phys.* 10, 5491–5514. doi:10.5194/acp-10-5491-2010.
- IAEA, 1995. Manual for QXAS. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Kleinman, L.L., Springston, S.R., Daum, P.H., Lee, Y., Nunnermacker, L.J., Senum, G.L., Wang, J., Weinstein-Lloyd, J., Alexander, M.L., Hubbe, J., Ortega, J., Canagaratna, M.R., Jayne, J., 2008. The time evolution of aerosol composition over the Mexico City plateau. *Atmos. Chem. Phys.* 8, 1559–1575.
- Krewski, D., Jerrett, M., Burnett, R.T., Ma, R., Hughes, E., Shi, Y., Turner, M.C., Pope 3rd, C.A., Thurston, G., Calle, E.E., Thun, M.J., Beckerman, B., DeLuca, P., Finkelstein, N., Ito, K., Moore, D.K., Newbold, K.B., Ramsay, T., Ross, Z., Shin, H., Tempalski, B., 2009. Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society study linking particulate air pollution and mortality. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 140, 5–114. discussion 115–136.
- Kunzli, N., Mudway, I.S., Gotschi, T., Shi, T., Kelly, F.J., Cook, S., Burney, P., Forsberg, B., Gauderman, J.W., Hazenkamp, M.E., Heinrich, J., Jarvis, D., Norback, D., Payo-Losa, F., Poli, A., Sunyer, J., Borm, P.J., 2006. Comparison of oxidative properties, light absorbance, total and elemental mass concentration of ambient $PM_{2.5}$ collected at 20 European sites. *Environ. Health Perspect.* 114 (5), 684–690.
- Lloyd, D.R., Carmichael, P.L., Phillips, D.H., 1998. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 11 (5), 420–427.
- Lloyd, D.R., Phillips, D.H., 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res.* 424 (1–2), 23–36.

- Lloyd, D.R., Phillips, D.H., Carmichael, P.L., 1997. Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem. Res. Toxicol.* 10 (4), 393–400.
- Manzano-León, N., Morales-Barcenas, R., Flores-Rojas, G., Mas-Oliva, J., Osornio-Vargas, A.R., 2009. PM_{2.5} and PM₁₀ *in vitro* effect on LDL and scavenger receptors (SRs). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 A3139.
- Miranda, J., Rodríguez-Fernández, L., De Lucio, O.G., López, K., Harada, J.A., 2000. A new beamline for characteristic X-ray experiments at the Pelletron accelerator. *Revista Mexicana de Física* 46, 367–372.
- Moffet, R.C., Desyaterik, Y., Hopkins, R.J., Tivanski, A.V., Gilles, M.K., Wang, Y., Shutthanandan, V., Molina, L.T., Abraham, R.G., Johnson, K.S., Mugica, V., Molina, M.J., Laskin, A., Prather, K.A., 2008. Characterization of aerosols containing Zn, Pb, and Cl from an industrial region of Mexico City. *Environ. Sci. Technol.* 42 (19), 7091–7107.
- Molina, L.T., Madronich, S., Gaffney, J.S., Apel, E., de Foy, B., Fast, J., Ferrare, R., Herndon, S., Jimenez, J.L., Lamb, B., Osornio-Vargas, A.R., Russell, P., Schauer, J.J., Stevens, P.S., Volkamer, R., Zavala, M., 2010. An overview of the MILAGRO 2006 Campaign: Mexico City emissions and their transport and transformation. *Atmos. Chem. Phys.* 10, 8697–8760.
- Moreno, T., Querol, X., Pey, J., Minguillon, M.C., Perez, N., Alastuey, A., Bernabe, R.M., Blanco, S., Cardenas, B., Eichinger, W., Salcido, A., Gibbons, W., 2008. Spatial and temporal variations in inhalable CuZnPb aerosols within the Mexico City pollution plume. *J. Environ. Monit.* 10 (3), 370–378.
- Osornio-Vargas, A.R., Serrano, J., Rojas-Bracho, L., Miranda, J., Garcia-Cuellar, C., Reyna, M.A., Flores, G., Zuk, M., Quintero, M., Vazquez, I., Sanchez-Perez, Y., Lopez, T., Rosas, I., 2011. *In vitro* biological effects of airborne PM_{2.5} and PM₁₀ from a semi-desert city on the Mexico–US border. *Chemosphere* 83 (4), 618–626.
- Pan, C.J., Schmitz, D.A., Cho, A.K., Froines, J., Fukuto, J.M., 2004. Inherent redox properties of diesel exhaust particles: catalysis of the generation of reactive oxygen species by biological reductants. *Toxicol. Sci.* 81 (1), 225–232.
- Perez, L., Medina-Ramon, M., Kunzli, N., Alastuey, A., Pey, J., Perez, N., Garcia, R., Tobias, A., Querol, X., Sunyer, J., 2009. Size fractionate particulate matter, vehicle traffic, and case-specific daily mortality in Barcelona, Spain. *Environ. Sci. Technol.* 43 (13), 4707–4714.
- Perez, L., Tobias, A., Querol, X., Kunzli, N., Pey, J., Alastuey, A., Viana, M., Valero, N., Gonzalez-Cabre, M., Sunyer, J., 2008. Coarse particles from Saharan dust and daily mortality. *Epidemiology* 19 (6), 800–807.
- Prahalad, A.K., Inmon, J., Ghio, A.J., Gallagher, J.E., 2000. Enhancement of 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage by coal and oil fly ash in relation to particulate metal content and availability. *Chem. Res. Toxicol.* 13 (10), 1011–1019.
- Querol, X., Pey, J., Minguillon, M.C., Perez, N., Alastuey, A., Viana, M., Moreno, T., Bernabe, R.M., Blanco, S., Cardenas, B., Vega, E., Sosa, G., Escalona, S., Ruiz, H., Artiñano, B., 2008. PM speciation and sources in Mexico during the MILAGRO-2006 Campaign. *Atmos. Chem. Phys.* 8, 111–128.
- Shi, T., Duffin, R., Borm, P.J., Li, H., Weishaupt, C., Schins, R.P., 2006. Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ. Res.* 101 (1), 18–24.
- Tong, H., Cheng, W.Y., Samet, J.M., Gilmour, M.I., Devlin, R.B., 2010. Differential cardiopulmonary effects of size-fractionated ambient particulate matter in mice. *Cardiovasc. Toxicol.* 10 (4), 259–267.
- Valavanidis, A., Salika, A., Theodoropoulou, A., 2000. Generation of hydroxyl radicals by urban suspended particulate air matter. The role of iron ions. *Atmos. Environ.* 34, 2379–2386.
- Vega, E., Reyes, E., Ruiz, H., Garcia, J., Sanchez, G., Martinez-Villa, G., Gonzalez, U., Chow, J.C., Watson, J.G., 2004. Analysis of PM_{2.5} and PM₁₀ in the atmosphere of Mexico City during 2000–2002. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 54 (7), 786–798.
- Vega, E., Ruiz, H., Escalona, S., Cervantes, A., López-Veneroni, D., González-Ávalos, E., Sánchez-Reyna, G., 2011. Chemical composition of fine particles in Mexico City during 2003–2004. *Atmos. Pollut. Res.* doi:10.5094/APR.2011.054.
- Yokelson, R.J., Urbanski, S.P., Atlas, E.L., Toohey, D.W., Alvarado, E.C., Crouse, J.D., Wennberg, P.O., Fisher, M.E., Wold, C.E., Campos, T.L., Adachi, K., Buseck, P.R., Hao, W.M., 2007. Emissions from forest fires near Mexico City. *Atmos. Chem. Phys.* 7, 5569–5584. doi:10.5194/acp-7-5569-2007.
- Zanobetti, A., Franklin, M., Koutrakis, P., Schwartz, J., 2009. Fine particulate air pollution and its components in association with cause-specific emergency admissions. *Environ. Health* 8, 58.

ANEXO 2. Sitios de Muestreo



Vista aérea del Instituto Mexicano del Petróleo (T_0).



Vista panorámica de la Universidad Tecnológica de Tecámac (T_1).

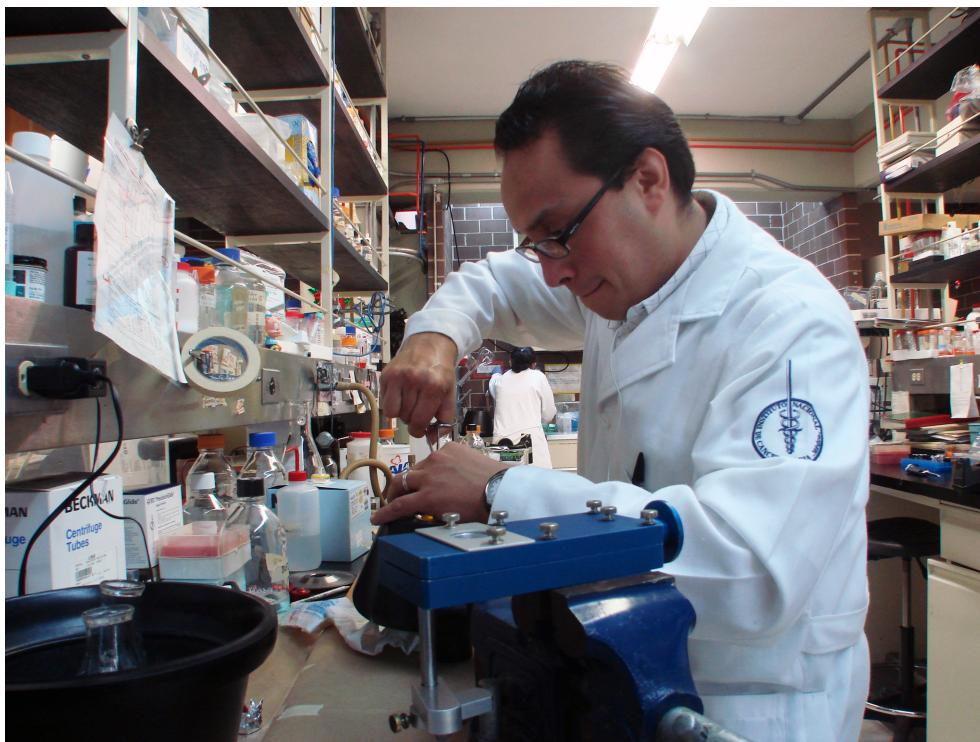


Equipos de muestreo de PM colocados en la azotea de la UTTEC (T₁)



Equipos de muestreo listo para calibración.

ANEXO 3. Laboratorios.

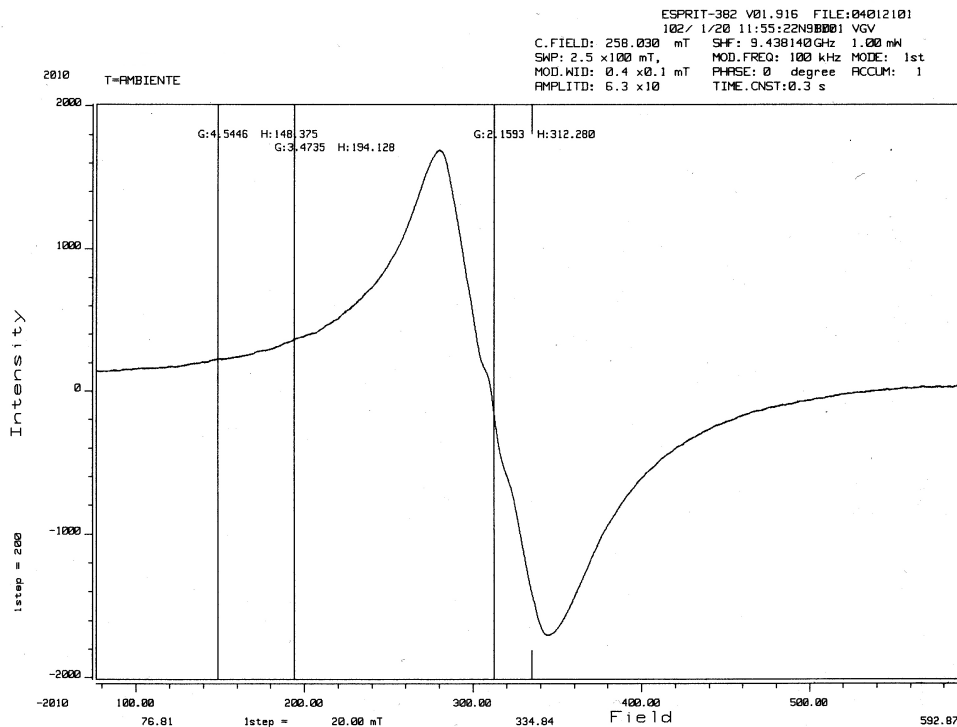


En la extracción de LDL, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

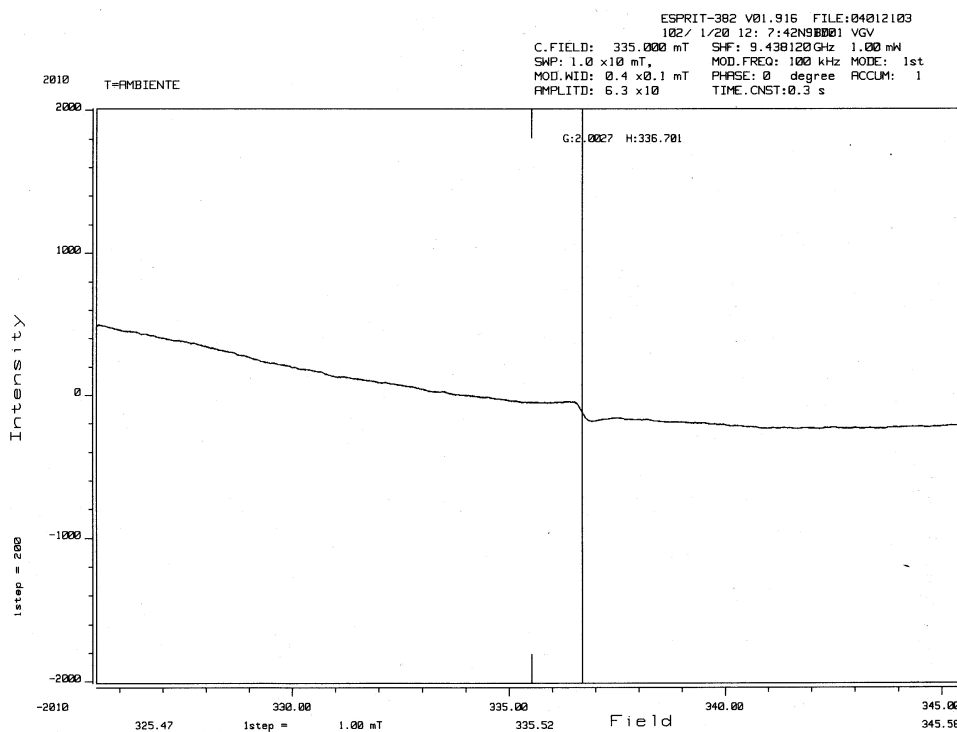


Equipos de Resonancia Paramagnética Electrónica, Instituto de Química, UNAM.

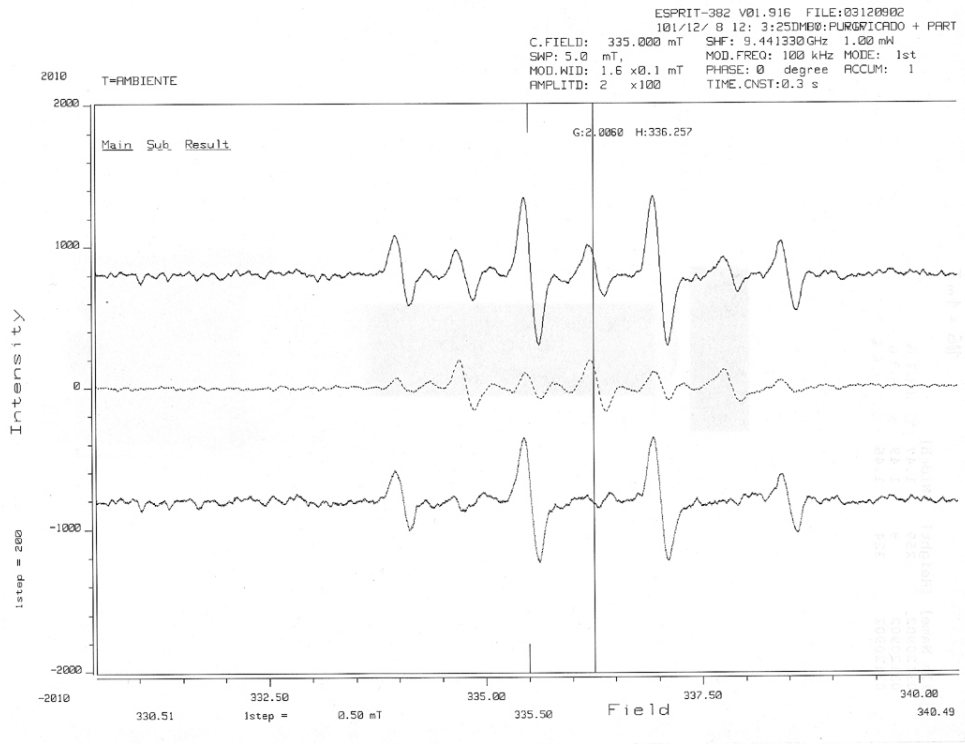
ANEXO 4. Espectros de RPE.



Señal de especies paramagnéticas de metales arrojada por el equipo de RPE.



Señal de especies paramagnéticas de orgánicos arrojada por el equipo de RPE.



Señal de potencial oxidante usando DMPO arrojada por el equipo de RPE.