



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TARAXACUM OFFICINALE, POTENCIAL BIOINDICADOR DE LA
EXPRESIÓN DEL MIR398 Y CSD2 INDUCIDOS POR LA CONTAMINACIÓN
ATMOSFÉRICA DE DOS ZONAS DEL ÁREA METROPOLITANA DE LA
CIUDAD DE MÉXICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JESÚS ARISBEL BARBA GARCÍA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**DR. JESÚS FRANCISCO ARENAS HUERTERO, HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "DR. FEDERICO
GÓMEZ"**

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***TARAXACUM OFFICINALE*, POTENCIAL BIOINDICADOR DE LA
EXPRESIÓN DEL MIR398 Y CSD2 INDUCIDOS POR LA CONTAMINACIÓN
ATMOSFÉRICA DE DOS ZONAS DEL ÁREA METROPOLITANA DE LA
CIUDAD DE MÉXICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JESÚS ARISBEL BARBA GARCÍA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**DR. JESÚS FRANCISCO ARENAS HUERTERO, HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "DR. FEDERICO
GÓMEZ"**

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2016



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de marzo de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **BARBA GARCÍA JESÚS ARISBEL**, con número de cuenta 301151836, con la tesis titulada "*Taraxacum officinale*, potencial bioindicador de la expresión del miR398 y CSD2 inducidos por la contaminación atmosférica de dos zonas del Área Metropolitana de la Ciudad de México.", realizada bajo la dirección de la **DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**:

Presidente: DRA. MARIA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Vocal: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO
Secretario: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de junio de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la oportunidad que me brindó al prepararme profesionalmente en la maestría.

Al CONACYT, por la beca recibida 288707 durante 2 años del desarrollo del presente trabajo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM proyecto IN-225114-3, por el apoyo en la compra de material y equipo para la realización de esta tesis.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera, por el apoyo financiero recibido del Fondo Especial de Ingresos Extraordinarios del CCA, para concluir con los trámites y obtener el grado de maestría.

A los integrantes de mi Comité Tutorial:

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por su calidad humana y apoyo incondicional, por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo del trabajo de investigación y por permitirme ser parte del laboratorio de Genotoxicología Ambiental.

Al Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero, por permanecer fielmente apoyando este trabajo de investigación y por todas las sugerencias que aportó. Asimismo por abrirme las puertas del laboratorio de patología experimental del Hospital de Infantil de México "Dr. Federico Gómez", por la ayuda con equipo y material de laboratorio.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por sus valiosas sugerencias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis sinodales por su tiempo y sugerencias

Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Al laboratorio de Aerosoles Atmosféricos, a la Dra. Rocío García Martínez y a Martín Rangel García, por el apoyo para el análisis de metales pesados de las muestras de diente de león.

A la Bióloga Andrea Domínguez, por el apoyo en el laboratorio con la técnica de PCR en tiempo real y el análisis de datos.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por integrarme y apoyarme en el trabajo técnico en este proyecto de investigación.

Al laboratorio de Espectroscopía y Percepción Remota, al Dr. Michel Grutter de la Mora.

A la Red Universitaria de Observatorios Atmosféricos (RUOA).

Al parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl.

A Victoria Carrillo, por el apoyo incondicional en el laboratorio de Genotoxicología Ambiental.

A María Rodríguez, por su amabilidad y por el apoyo con los tramites de maestría.

Gracias a Dios principalmente, por su amor, fidelidad y por darme la oportunidad de vivir, gracias mi Dios porque sé que todo lo bueno proviene de ti.

Especialmente quiero agradecer a mi hija Sarah, gracias porque eres una bendición, el mejor regalo que Dios me pudo dar, gracias también por muchas veces otorgarme el tiempo que sin dudas me habría gustado compartir contigo durante mis estudios de maestría. Te Amo hija, me haces muy feliz.

A mi familia, por apoyarme siempre. A mi madre, Elvia García y a mi padre, Felix Barba, y mis hermanos, María, Yeraldín, Fernando y Areli.

Quiero agradecer a mis amigos por el cariño, por sus consejos y su tiempo; por haber compartido momentos importantes, por apoyarme, comprenderme y permitirme aprender de ustedes.

Mayra García, Guadalupe González, Elizabeth Romero, José Carlos Jiménez, Angélica Jiménez, Zelmy Castro, Ana Marroquín, Tanya Palillero, Janette Bahena, María del Carmen Calderón, Daniela O'Connell, Ana Soto, Carlos Iván Falcon, Juan Antonio Corrales y Jose Valle. A todos ustedes muchas gracias porque además los considero valiosos y de mucha estima.

En todo tiempo ama el amigo,

Y es como un hermano en tiempo de angustia.

Proverbios 17:17

Agradezco a mis tíos, Eder y Mayra, por abrirnos las puertas de su casa a Sarah y a mi. A mi tía Mayra, por su apoyo incondicional; infinitas gracias por todo el cariño, por la sopita caliente, por cedernos un lugar donde descansar, porque también me brindaste esos abrazos, ofreciéndome tu atención al escucharme cuando más lo necesité. Te quiero mucho tía.

A la familia Segura Villa, especialmente a la Señora Elsa Villa por su apoyo incondicional, Dios la bendiga siempre.

A mi tíos, Emilio García, Olivia Barba, Margarita Barba, por todo su cariño.

A mis abuelas, María de Jesús Velazco y Alicia García, por su cariño y por ser parte importante en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio por compartir sus experiencias académicas y su calidad humana.

M. en C. Ana Rosa Flores, Dra. Judith Guzmán, Dra. Josefina Cortés, M. en C. Zelmy Castro, Biol. Denisse Badillo, Biol. Ana Marroquín, M. en C. Montserrat Zaragoza, Lizbeth Rivera y Diana Andrade.

A mi hija Sarah

He aquí, herencia del Señor son los hijos; y recompensa es el fruto del vientre.

Salmos 127:3

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Contaminación atmosférica	4
1.2 Efecto de los metales pesados en las plantas.....	5
1.3 Mecanismos de defensa de las plantas ante la inducción de EROs por metales pesados	6
1.4 Expresión microRNAs	8
1.5 <i>Taraxacum officinale</i>	12
ANTECEDENTES	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Diseño del estudio	18
2. Propagación de <i>Taraxacum officinale</i>	18
3. Extracción de RNA total	19
4. Evaluación de la expresión del tof-miR398	19
4.1 Síntesis de cDNA por hebra molde.....	19
4.2 Cuantificación de miR398 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR-RT)	20
5. Evaluación de la expresión del mRNA de CSD2	22
5.1 Síntesis de cDNA por hebra molde.....	22
5.2 Cuantificación del mRNA de CSD2 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR-RT).....	24
6. Análisis de datos, cálculo de niveles de miR398 y CSD2.....	26
7. Reducción de MTT: detección de especies oxidantes.....	26
8. Análisis de metales pesados.....	27
8.1 Tratamiento de muestras en horno de microondas	27
8.2 Técnica analítica	27
8.3 Validación del método	28
Aseguramiento de calidad.....	28
9. Análisis estadístico	29
RESULTADOS.....	30
1. Identificación y cuantificación de metales pesados	30
2. Generación de estrés oxidante detectado por la prueba de MTT.....	36
3. Expresión de miR398.....	37
2. Expresión de CSD2	39
DISCUSIÓN	41
1. Concentración de metales en <i>Taraxacum officinale</i>	42
2. Porcentaje de Potencial Oxidante	43
3. Expresión de miR398.....	44
4. Expresión de CSD2	45

CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS.....	51
Anexo I.....	52
REFERENCIAS	54

RESUMEN

La contaminación atmosférica del Área Metropolitana de la Ciudad de México (AMCM) es generada por las emisiones de 3.5 millones de automóviles, de 35,000 industrias y las actividades de casi 20 millones de habitantes. Dentro de los contaminantes atmosféricos se encuentran los metales pesados que provocan estrés oxidante. Por otro lado, las plantas han desarrollado la habilidad para sobrevivir a este medio, adaptando su fisiología al entorno. Los microRNAs (miRNAs) son reguladores post-transcripcionales e intervienen en distintos procesos fisiológicos, entre estos la respuesta frente a estresores abióticos. En *Arabidopsis thaliana* se demostró que la disminución transcripcional del miR398 inducida por estrés oxidante es esencial para la acumulación del mRNA blanco, superóxido dismutasa 2 (CSD2) y un aumento a la tolerancia de estrés oxidante. Con la finalidad de detectar el efecto de la contaminación atmosférica, en especial por metales pesados se utilizó a *Taraxacum officinale* como bioindicador de contaminación atmosférica de dos zonas del AMCM, el Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM (Lat. 19.33° N, Lon. 99.18° W, Alt. 2260 m) y la de altura denominada Altzomoni en el parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl (Lat. 19.12° N, Lon. 99.65° W, Alt. 4000 m) por la expresión diferencial del miR398 y CSD2 en temporada de secas y lluvias. Los resultados de este trabajo muestran una disminución de la expresión de miR398 en la época de secas para ambos sitios; Altzomoni (0.002 ± 0.0006) y CCA (0.000123 ± 0.00035) ($p > 0.05$). Por otro lado, la expresión de CSD2 se ve aumentada en época de secas en Altzomoni (19.80 ± 7.04) y CCA (119.67 ± 22.79), siendo para el sitio CCA donde se observa una mayor expresión relativa de CSD2 ($p > 0.05$). El aumento en la concentración de metales pesados en las hojas es mayor para época de secas en la zona de Altzomoni, seguida de CCA en la misma época, sugiriendo que la elevada concentración de Cd, Ni y V para la zona de CCA en época de secas son los causantes de la producción de estrés oxidante en *Taraxacum officinale*, debido a las emisiones de contaminantes de la Ciudad de México.

De acuerdo con los resultados obtenidos sugieren que la alta concentración de metales activa la maquinaria de defensa, en este caso por enzimas CSD2 y su regulador post-transcripcional el miR398 se ve disminuido, proponiéndolos como bioindicadores de contaminación atmosférica en *Taraxacum officinale*.

ABSTRACT

Air pollution in the Metropolitan Area of Mexico City (MAMC) is generated by emissions from 3.5 million cars, 35,000 industries and activities of nearly 20 million population. Air pollutants include heavy metals that cause oxidative stress. On the other hand, plants have developed the ability to survive this environment, adapting its physiology to the environment. MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators and are involved in various physiological processes, among these the response to abiotic stressors. In *Arabidopsis thaliana* it was shown to decrease transcriptional miR398 induced oxidative stress is essential for mRNA accumulation target, superoxide dismutase 2 (CSD2) and increased tolerance of oxidative stress. In order to detect the effect of air pollution, especially that of heavy metals, in this research use a *Taraxacum officinale* as a bioindicator of air pollution in two areas of the MAMC: the Center for Atmospheric Sciences-UNAM (Lat. 19.33° N, Lon . 99.18° W, Alt. 2260 m) and Alzomoni in Iztaccihuatl-Popocatepetl National Park (Lat. 19.12° N, Lon. 99.65° W, Alt. 4000 m). The differential expression of miR398 and CSD2 in dry and rainy season was measured. The results of this study shows a reduction in the expression of miR398 for the dry season for both sites; Alzomoni (0.002 ± 0.0006) and CAS-UNAM (0.000123 ± 0.00035) ($p > 0.05$). On the other hand, the expression is increased in CSD2 dry season in Alzomoni (19.80 ± 7.04) and CAS (119.67 ± 22.79). Of these, CAS showed a greater relative expression of CSD2 ($p > 0.05$). The increased concentration of heavy metals in the leaves is higher for dry season Alzomoni area, followed by CAS during the same dry season, suggesting that the high concentration of Cd, Ni and V for the area of CAS dry are responsible for the production of oxidative stress in *Taraxacum officinale*, due to emissions of pollutants from Mexico City.

According to the results suggesting that the high concentration of metals is being offset by the machinery of defense, in this case the observed increase of CSD2 enzyme in dry season and its post-transcriptional regulator the miR398 which diminished, proposing as bioindicators of air pollution in *Taraxacum officinale*.

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación atmosférica

El área metropolitana de la Ciudad de México (AMCM) está conformada por las 16 delegaciones, 59 municipios del Estado México y un municipio en Hidalgo (SEDESOL 2012) que se encuentran distribuidos en una superficie de 7,866.1 km², con un parque vehicular de 5 millones de automóviles (SEDEMA-GDF 2013). A este complejo se suman las emisiones de 35,000 industrias que consumen 40 millones de litros de combustibles (Molina y Molina 2005) y finalmente, la existencia de casi 21 millones de habitantes (CONAPO 2012). La Ciudad de México es una cuenca elevada a una altura de aproximadamente 2,240 metros sobre el nivel medio del mar (SEDEMA-GDF 2013), montañas fronterizas de la cuenca hacia el este, sur y oeste (Doran *et al.* 1998). El valle de México ocupa aproximadamente 1,300 km² en una elevación de 1000 m sobre el fondo, con puntos bajos en el norte y sur (Edgerton *et al.* 1999); estas condiciones topográficas y las grandes emisiones de contaminantes le confieren a la ciudad, elevadas concentraciones de contaminantes en la atmósfera (Shannon *et al.* 1998, Tzintzun *et al.* 2005).

La contaminación atmosférica es una mezcla de compuestos de diferente origen. Entre los principales contaminantes registrados en la Ciudad de México por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) se encuentran gases como el ozono, monóxido de carbono, dióxido de nitrógeno, óxidos de azufre, partículas menores a 10 micrómetros (PM₁₀) y partículas menores a 2.5 micrómetros (PM_{2.5}). Se presentan además compuestos orgánicos volátiles con metales pesados, de estos últimos destacan cobre, zinc y aluminio (Quintana *et al.* 2011), así como de distintos agentes biológicos (Moller *et al.* 2008). Todos estos elementos plantean la complejidad del problema y la necesidad de realizar los estudios encaminados a determinar los efectos de estos contaminantes.

La contaminación atmosférica está asociada con el aumento de admisiones hospitalarias y muertes (Levy *et al.* 1999). Evidencias recientes sugieren que la exposición a la contaminación atmosférica constituye un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón (Moller *et al.* 2008). Estudios previos señalan que tienen efecto cuando se expone a las poblaciones y sistemas *in vivo* (Pope y Douglas 2006, Sun *et al.* 2010b). Dentro de los efectos, que incrementan el riesgo a desarrollar enfermedades degenerativas, por los componentes de la contaminación aérea se encuentra el estrés oxidante y el daño primario al DNA (Alfaro *et al.* 2002, Risom *et al.* 2005, Quintana *et al.* 2011)

1.2 Efecto de los metales pesados en las plantas

Las plantas están constantemente expuestas a numerosos estresores bióticos y abióticos, dentro de los primeros se encuentran los metales pesados. Estos, aunque son componentes naturales de la corteza terrestre y están presentes en diferentes concentraciones, pueden ser tóxicos para los organismos a concentraciones muy bajas. Los efectos químicos, biológicos y fisiológicos de la exposición a metales pesados en las plantas son cada vez más preocupantes, lo anterior debido a su potencial de acumulación en los organismos y prevalencia en la cadena trófica (Sarma *et al.* 2011, Whiteside *et al.* 2010, An *et al.* 2012, Schreck *et al.* 2012).

Los metales pesados incluyen al cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), níquel (Ni), cobalto (Co), cadmio (Cd) y aluminio (Al), siendo todos tóxicos para las plantas en altas concentraciones. Algunos metales pesados a bajas concentraciones son esenciales para las células vegetales, ya que son cruciales en la catálisis de reacciones enzimáticas. Los metales como Fe, Cu, Zn, Co y Ni actúan como cofactores de varias enzimas que catalizan reacciones bioquímicas involucrados en mantener el crecimiento y desarrollo (Rascio y Navari-Izzo 2011).

Algunos estudios muestran que la acumulación excesiva de metales pesados provoca reacciones tóxicas en las plantas, alterando procesos fisiológicos y bioquímicos. En los tejidos vegetales puede disminuir la longitud de la raíz, la biomasa de la planta, la germinación de semillas y la biosíntesis de la clorofila (Singh *et al.* 2010) y dentro de la célula, afectan a la fotosíntesis, respiración, nutrición mineral, reacciones enzimáticas y muchos otros factores fisiológicos (Pourrut *et al.* 2011).

1.3 Mecanismos de defensa de las plantas ante la inducción de EROs por metales pesados

Los metales pesados incrementan la producción de especies reactivas al oxígeno (EROs). La cual resulta de la interacción de los metales pesados con la actividad de transporte de electrones, particularmente en el cloroplasto y las membranas mitocondriales. El aumento en la producción de EROs puede alterar el estado redox de las células, provocando estrés oxidante y daño a macromoléculas biológicas (He *et al.* 2011, Carrasco-Gil *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012).

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa por los cuales pueden transformar las EROs en productos menos tóxicos. Estos mecanismos incluyen la excreción de metales por la raíz, la quelación por moléculas orgánicas, la unión de los metales a la pared celular y el secuestro de éstos en vacuolas, manteniendo su estado redox celular y disminuyendo el daño causado por el estrés oxidante. Para que las plantas puedan llevar a cabo esta tarea de manera eficiente se requiere de la intervención metabólica de fitoquelatinas (PCs), glutatión reductasa (GSH), carotenoides y tocoferoles, así como de los sistemas antioxidantes enzimáticos incluyendo catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD), guaicol peroxidasa (GPX), por mencionar algunas. El incremento de

los niveles de intermediarios metabólicos y enzimas antioxidantes conduce a un aumento de la tolerancia al estrés oxidante, inducido por metales pesados (He *et al.* 2011).

Las EROs son los radicales libres derivados del oxígeno tales como el hidroxilo (HO^\bullet), el anión superóxido (O_2^\bullet), peroxilo (RO_2^\bullet) y no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Circu y Aw 2010, Corpas *et al.* 2011). En condiciones aérobicas, se generan especies reactivas al oxígeno, ya que es un aspecto inevitable para la vida (Jaspers y Kangasjärvi 2010, Swanson y Gilroy 2010). Las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas son considerados como las principales fuentes de producción de EROs en las células vegetales. El radical HO^\bullet se estima la especie más reactiva, por su capacidad para iniciar y desencadenar reacciones, ya que son los responsables de producir efectos tóxicos en las plantas (Mittler *et al.* 2004). En condiciones normales, los niveles de EROs óptimos se mantienen por las enzimas antioxidantes. Sin embargo, cuando son expuestas a metales pesados las cantidades de las especies de oxígeno EROs se incrementan (Opdenakker *et al.* 2012).

El incremento de las EROs provoca desequilibrio debido a la producción y la eliminación de éstas, lo que conduce al estrés oxidante (Morina *et al.* 2010).

Las plantas no tienen capacidad para moverse y se encuentran fijas durante su ciclo de vida, por tal motivo se adaptan constantemente en su crecimiento y metabolismo a estresores abióticos. Es por esto que desarrollan la habilidad para subsistir mediante la regulación de la expresión de genes con el propósito de adaptar su fisiología al entorno. Se ha demostrado que la regulación post-transcripcional de la expresión de genes desempeña un papel importante en la respuesta al estrés abiótico en plantas (Floris *et al.* 2009). Recientemente, se han estudiado a los microRNAs (miRNAs) y se evidencian como reguladores centrales de numerosos estresores abióticos, incluyendo los metales pesados (Fig. 1).

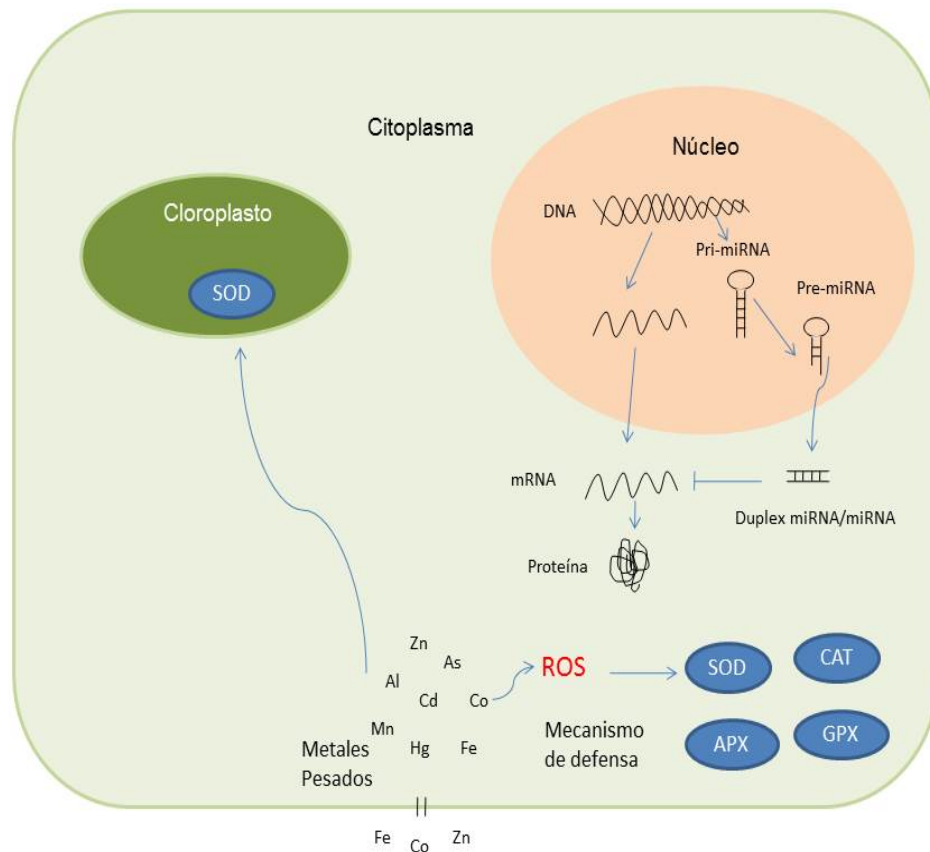


Fig. 1. Interacción de los componentes de tolerancia a metales pesados y los miRNAs en las plantas; SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), APX (ascorbato peroxidasa) y GPX (guaicol peroxidasa); modificado de Gupta *et al.* 2014).

1.4 Expresión microRNAs

Actualmente se conoce que una parte del genoma expresado en las células eucariontes en etapas de expresión génica a nivel post-transcripcional, es mediado por secuencias cortas de RNAs no codificantes (ncRNAs). Dentro de las funciones principales de éstos se ha encontrado que, aunque no son tan conservados como los genes que codifican para proteínas, su función reguladora ha permanecido en el genoma y su respuesta ante cambios en el medio (Khalil y Rinn 2011).

Los microRNAs (miRNAs) corresponden a una gran familia de RNAs pequeños no codificantes, de aproximadamente 18-24 nucleótidos de longitud que son críticos en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes y son los ncRNAs más estudiados (Bartel 2004). En mamíferos los miRNAs regulan la expresión de más del 60% de todas las proteínas que codifican para genes a través del apareamiento de bases con el extremo 3' UTR del mRNA. Esta interacción generalmente conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas ya sea por degradación o por la represión traduccional. Estos miRNAs están involucrados en la regulación de muchos procesos, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis y desarrollo (Johnston y Hobert 2003, Huang *et al.* 2008).

Los miRNAs pueden ser intragénicos sintetizados a partir de la maquinaria que realiza por corte y empalme, o intergénicos, con su propio promotor. Este transcrito primario (pri-miRNA) es escindido por el complejo enzimático formado por Drosha y DGCR8, originando a un transcrito 70 a 100 nucleótidos llamado precursor de miRNAs (pre-miRNA). Los pre-miRNAs se exportan desde el núcleo por mecanismos mediados por Exportina5 y es procesado por Dicer que forma un dúplex miRNA:miRNA de aproximadamente 18-24 nucleótidos de longitud. Este dúplex es cargado en el complejo de ribonucleoproteínas RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA) el cual incluye miembros de la familia de proteínas Argonauta (AGO1-4) y GW182. La hebra transitoria del dúplex puede ser degradada. El mRNA blanco se incorpora en el complejo RISC, conduciendo finalmente a la represión post-transcripcional de la expresión génica (Chekulaeva y Filipowicz 2009, Fabian *et al.* 2010).

En plantas los miRNAs regulan diversas fases de desarrollo, como la etapa de transición de floración, así como algunas respuestas a estrés (Voinnet, 2009). Los miRNAs tienen el mismo procesamiento, sin embargo existen variaciones ya que en el modelo de *Arabidopsis thaliana*, estas horquillas son convertidas en precursores de miRNAs (pre-miRNAs) mediante la catálisis de una enzima ribonucleasa DCL1 (DICER-LIKE 1) es un

homólogo Dicer y se encarga de procesar los pri-microRNAs realizando el primer corte a pre-microRNAs. Además, DCL1 hace el segundo corte que corresponde a la escisión, antes de que miRNA salga del núcleo (Bartel 2004). En las plantas se da una modificación química por la cual el extremo 3' del miRNA maduro es metilado por la proteína HEN1. Al terminar el procesamiento, los RNAs dúplex de aproximadamente 21 pb son transportados al citoplasma por HASTY (un homólogo de exportina 5) mediante el mecanismo dependiente de Ran-GTP y, ya en el citoplasma, son reclutados por el complejo RISC, en donde una de las dos hebras del RNA es degradada para dar lugar al miRNA maduro. El complejo RISC que contiene a AGO1 y al miRNA puede entonces encontrar a su mensajero blanco. Además, a diferencia de los miRNAs de animales, los miRNAs de plantas muestran alto grado de complementariedad con la secuencia de mRNA blanco lo cual se lleva a cabo generalmente en la región codificante del mRNA y dispara la degradación del mensajero reconocido. En el estudio de Shengben *et al.* (2013) a través de mediciones de la síntesis de proteínas, se demuestra que los miRNA de las plantas reprimen su gen blanco a través de la inhibición de la traducción (Fig. 2).

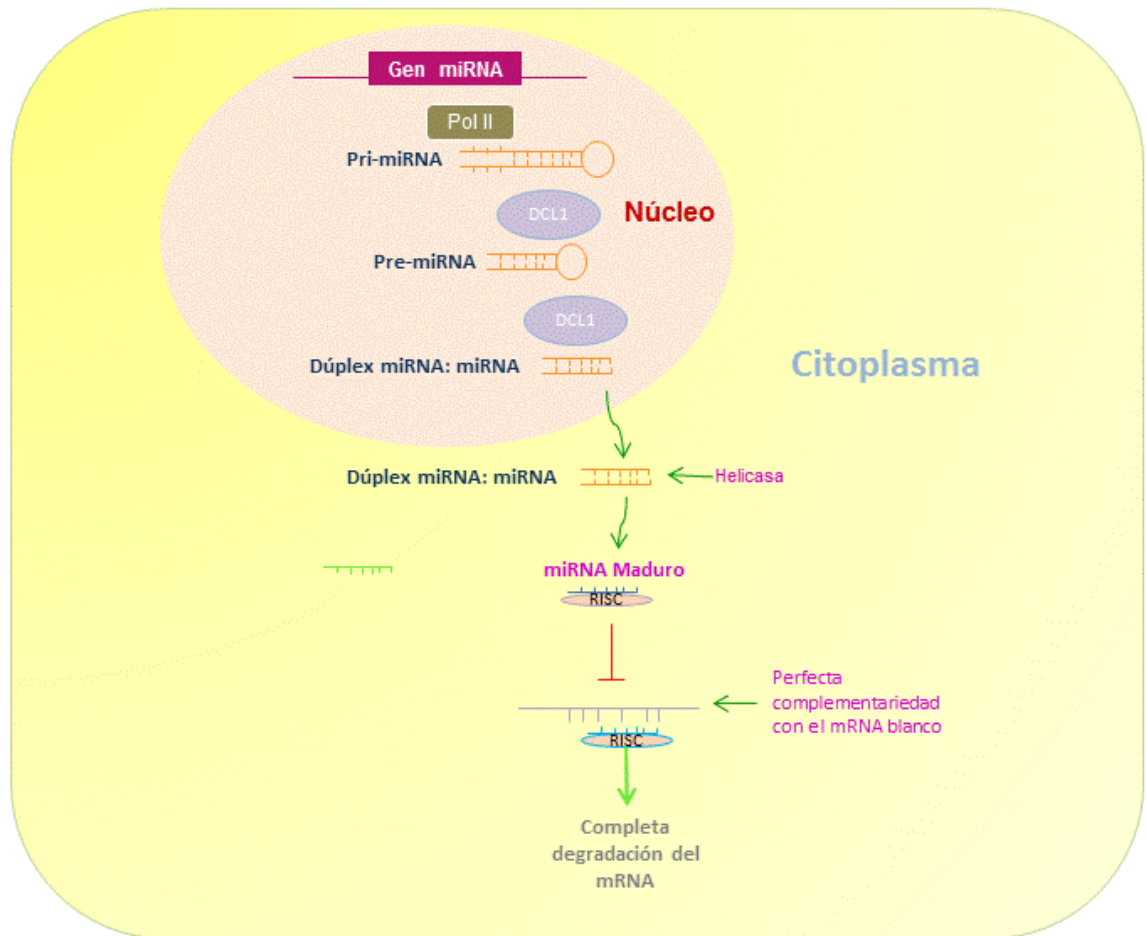


Fig. 2. Biogénesis de miRNA en plantas, modificado de Bartel (2004).

1.5 *Taraxacum officinale*

Taraxacum officinale, conocida como “diente de león”, es una planta perenne, con tallo acortado de sólo 1-2.5 cm de longitud, con entrenudos muy cortos por debajo de la superficie del suelo (Holm *et al.* 1997). Las hojas son de forma variable, con un lóbulo inferior a los bordes dentados, pinnatífidas de aproximadamente 5-40 cm de largo y 0.7 a 15 cm de ancho, con pecíolo alado que forman una roseta basal radial. Tiene una raíz primaria gruesa de 2 a 3 cm de diámetro que puede medir hasta 1.2 m de longitud (Holm *et al.* 1997). En esta planta se desarrolla una roseta basal que da lugar a numerosos escapos, erectos, huecos, sin brácteas y con una inflorescencia terminal formada por un número 80 a 250 de diminutas flores agrupadas en receptáculo, constituyendo una cabezuela. Todas las flores son liguladas, hermafroditas y amarillas, cada flor tiene una corola de cinco pétalos unidos, con cinco estambres fusionados provistos por largas anteras que están unidos alrededor del estilo. Los granos de polen tienen forma esférica y presentan un diámetro de 30 μm (Gier y Burrell 1942). Cada óvulo da lugar a una cipsela (semilla) alargada y ovoide, de superficie rugosa y con una longitud de 3-4 mm y una anchura de 1 mm (Holm *et al.* 1997).

Taraxacum officinale es una especie apomíctica, ya que se reproduce por medio de semillas las cuales son originadas sin que ocurra meiosis ni fertilización, por lo que sus descendientes son genéticamente idénticos a la planta madre. Desde el punto de vista evolutivo, las plantas apomícticas carecen de las ventajas adaptativas que ofrece la reproducción sexual, sin embargo, la apomixis permite la fijación idéntica de genotipos altamente adaptados a su ambiente.

El “diente de león” puede tolerar una amplia gama de condiciones climáticas y se distribuye en casi todas las regiones templadas y subtropicales del mundo (Holm *et al.* 1997). Son muy resistentes a la sequía, también muestra gran adaptabilidad a la luz, siendo capaz de crecer vigorosamente en plena luz del sol, o con luz difusa a la sombra de árboles o edificios (Holm *et*

al. 1997). Ampliamente distribuida en el Valle de México a una altura de 2250-4000 m (Calderón de Rzedowski y Rzedowski 2005).

ANTECEDENTES

Diversas investigaciones señalan que los contaminantes ambientales pueden cambiar el perfil de expresión de los miRNAs (Zhang y Pan 2009). En conjunto, estos estudios sugieren que la biogénesis y el procesamiento adecuado de los genes de miRNA son necesarios para mantener los tejidos en un estado libre de enfermedad (Ryan *et al.* 2010).

Por otra parte, los miRNAs han sido involucrados en respuestas de estrés en plantas. Se ha observado que los miRNAs de vegetales aumentan o disminuyen su regulación ante la resistencia a estrés biótico o abiótico (Jagadeeswaran *et al.* 2009). El miRNA398 fue identificado en *Arabidopsis* y está vinculado con redes que regulan las respuestas en la planta por estrés oxidante, déficit de agua, estrés salino, deficiencias de fosfato y cobre, infección bacteriana, entre otros (Yamasaki *et al.* 2007a, Abdel-Ghany y Pilon 2008, Jagadeeswaran *et al.* 2009). Además, se ha observado la expresión y la regulación de miR398 por estrés oxidante en plantas de *Arabidopsis* expuestas a metales pesados (Sunkar *et al.* 2006b). Los blancos de miR398 son los genes de la superóxido dismutasa Cu/Zn (CDS); CSD1 que está localizado en el citoplasma, CSD2 que se encuentra en el estroma del cloroplasto y el mRNA de COX5b-1 codifica para la subunidad 5b que se une al zinc de la enzima mitocondrial COX Cu. CSD1 y CSD2 en *Arabidopsis* han sido identificados como blancos de respuesta de miR398 a estrés abiótico (Jones-Rhoades y Bartel 2004, Sunkar *et al.* 2004a). COX es un componente de la cadena respiratoria de transporte de electrones (Yamasaki *et al.* 2007a). La expresión de miR398 es baja cuando se expone a metales pesados como el mercurio (Hg), cobre (Cu) y hierro (Fe). La disminución de los niveles de miR398 induce la acumulación de CSD1 y CSD2 mRNAs (Sunkar *et al.* 2006b) (Fig. 3).

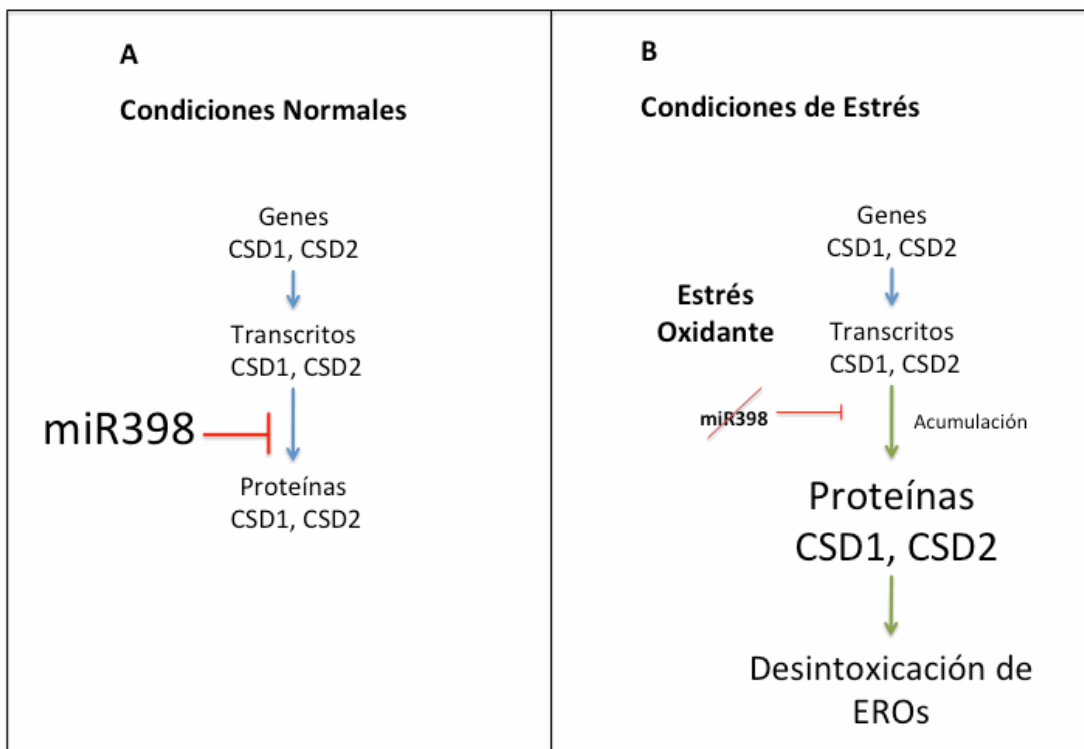


Fig. 3. Modelo del papel de miR398, en condiciones normales (A) y condiciones de estrés oxidante (B), tomado de Floris *et al.* (2009).

Dada la gran proporción de las plantas en la biosfera y su papel vital en la cadena trófica, es importante establecer paralelamente a las mediciones químicas tradicionales en los protocolos de evaluación de la calidad del aire, bioindicadores vegetales de contaminación del mismo (Piraino *et al.* 2006). Además, los vegetales ofrecen una ventaja debido al papel que tienen en la cadena trófica, ya que son productores de energía y sirven de alimento a diversos organismos, permitiendo la estimación de su papel al transportar contaminantes hacia niveles tróficos más elevados (Kovalchuk y Bokyo 2008). Las plantas superiores presentan características que las favorecen como modelos genéticos para evaluar contaminantes ambientales, tales como su sensibilidad para detectar mutágenos y la posibilidad de revelar múltiples alteraciones genéticas en diferentes tejidos. Estas ventajas pueden sumarse a lo costeable que son debido que requieren menos recursos y tiempo que los modelos en mamíferos (Grant 1988a, 1994b).

Taraxacum officinale ha sido usada como bioindicador de metales pesados de suelo (Gjorgieva *et al.* 2011). Erofeeva (2014) describe los índices de reproducción de semillas del diente de león para evaluar el nivel de contaminación ambiental, proponiéndolo como bioindicador. Por los antecedentes antes citados en este estudio se propuso a esta planta como biomonitor de la calidad del aire del AMCM mediante la inducción de microRNAs alterados, como producto de la contaminación atmosférica, dada su amplia distribución en AMCM. Correlacionando con los datos obtenidos en las dos estaciones de monitoreo atmosférico que se proponen, en las cuales se realiza el análisis espectroscópico de la composición atmosférica mediante métodos de percepción remota, una localizada en el Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM y la otra en la estación de altura Altzomoni ubicada en el parque nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl a 4000 m sobre el nivel del mar.

HIPÓTESIS

Dado que los contaminantes del aire son potencialmente tóxicos, se espera que la planta *Taraxacum officinale*, permita diferenciar el efecto en la regulación y síntesis del tof-miR398 y mRNA de CSD2 en sus hojas, al encontrarse expuesta en dos puntos de la Ciudad de México con distinto grado de contaminación atmosférica y condiciones meteorológicas en las temporadas de secas y lluvias, asociado a la concentración de algunos metales pesados en las hojas.

OBJETIVOS

- Evaluar la expresión del tof-miR398 y su mRNA blanco CSD2 en las hojas de *Taraxacum officinale*, en respuesta al estrés inducido por los contaminantes atmosféricos de ambas zonas.
- Determinar el contenido de algunos metales pesados en las hojas de *Taraxacum officinale* de dos zonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Para evaluar la respuesta a estrés de los contaminantes atmosféricos usando como bioindicador a *Taraxacum officinale*, mediante la inducción de miRNAs, se realizaron dos monitoreos anuales *in vivo*, durante las épocas de secas y de lluvias de 2014 exponiendo las plantas en dos zonas que coincidían con las dos estaciones de monitoreo, la primera en el Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM (Lat. 19.33° N, Lon. 99.18° W, Alt. 2260 m) y la segunda de altura denominada Alzomoni en el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl (Lat. 19.12° N, Lon. 99.65° W, Alt. 4000 m). En cada sitio de muestreo se colocaron 2 grupos de 20 plantas de la misma edad, uno de ellos para las determinaciones químicas de acumulación de metales pesados y el otro para evaluar la expresión de tof-miR398 y CSD2.

2. Propagación de *Taraxacum officinale*

Las semillas de *Taraxacum officinale* se sembraron y se germinaron en tierra estéril, en el invernadero a una temperatura promedio de 18.5° C la mínima y 31.12° C la máxima.

3. Extracción de RNA total

Se aisló el RNA total utilizando el método de trizol: macerando las hojas en 500 μL de trizol, dejando reposar por 10 min. Se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm y se agregaron 100 μL de cloroformo, agitando y dejando reposar por 10 min. Se centrifugaron a 10,000 rpm, tomando el sobrenadante y agregando 250 μL de isopropanol, dejando precipitar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, para centrifugar a 10,000 rpm por 5 min. Se decantó y agregó 200 μL de etanol (70%) y se centrifugó. Por último, se decantaron y dejaron secar las muestras en baño seco a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez aislado el RNA, a cada muestra se le agregaron 20 μL de agua inyectable y se determinó la concentración y pureza en 1 μL de la cantidad de RNA total por espectrofotometría con absorbancia de 260-280 nm en el NanoDrop ND-100.

4. Evaluación de la expresión del tof-miR398

4.1 Síntesis de cDNA por hebra molde

Para amplificar el tof-miR398 se utilizaron 80 ng de RNA total en un volumen final de 10 μL (6.25 μL de solución para la síntesis de cDNA más 3.75 μL de RNA) se realizó la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del Kit Clontech Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis Kit (Ct. No. 638313) en el termociclador marca "Thermalcycler MJ mini".

- a) En el cuadro I se muestran las cantidades que se añadieron a un tubo 0.2 mL libre de RNAsas con los siguientes reactivos:

Cuadro I. Síntesis de cDNA y poli-A

Reactivos	Volumen en μL
mRQ Amortiguador (2X)	5
Muestra de RNA	3.75 (80ng/ μL)
Enzima mRQ	1.25
Volumen Total	10

- b) En un termociclador, se incubaron los tubos durante 1 hora a 37 °C, posteriormente a 85 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas y 1 minuto a 22 °C.
- c) Después el cDNA se utilizó para la cuantificación del tof-miR398 y el U6 como referencia.

4.2 Cuantificación de miR398 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR-RT)

A partir del cDNA sintetizado, se evaluó la expresión del miR398 (Cuadro II) por la PCR en tiempo real en un equipo de la marca Stratagen Mx 300 SP, Agilent Technologies y siguiendo el protocolo del Kit Clontech Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis.

Cuadro II. Secuencias forward (F) y reverse transcriptasa (RT) del miR398, se muestra el tamaño en pares de bases (pb) de cada amplificado y la TM a la cual se realizará el RT-PCR.

Gen	Secuencia	TM
tof-miR398 a	F: GGC GTG TGT TCT GAG GTC A RT: GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AGG GG	60°C

Para el RT-qPCR, la síntesis del cDNA se utiliza el método comparativo C_t , cuantificando y determinando los niveles de tof-miR-398 en relación con el nivel de U6 snRNA. Se realiza una amplificación qPCR de U6 para cada muestra de cDNA. La cuantificación absoluta se efectúa empleando los valores de C_t obtenidos para el tof-miR398, logrando valores de un número de copias de C_t vs. la curva estándar del número de copias que se genera a partir del cDNA sintetizado diez veces en serie diluciones de una concentración conocida del tof-miR398.

- a) Para todas las muestra se incluyen testigos (NTC) para cada grupo de cebadores y para cada reacción. Se mezclan los reactivos indicados en la Cuadro III.

Cuadro III. Cantidades empleadas de reactivos para qPCR de tof-miR398 y U6 snRNA.

Reactivos	Volumen en μL
ddH2O	9
Premix SYBER	12.5
ROX	0.5
Forward	0.5
Primer	0.5
cDNA	2.0
Volumen Total	20

- b) El ciclo de reacciones para realizar la PCR en tiempo real es la siguiente:

- **Desnaturalización**
 - 95 °C 10 segundos
- **qPCR X 40 ciclos**
 - 95 °C 5 segundos
 - 60 °C 20 segundos
- **Curva de disociación**
 - 95 °C 60 segundos
 - 55 °C 30 segundos
 - 95 °C 30 segundos

La cuantificación en tiempo real se hizo utilizando SYBR green como fluorocromo principal y ROX™ como colorante pasivo de referencia y las reacciones se llevan a cabo en un termociclador en tiempo real Agilent® (Fig. 4)

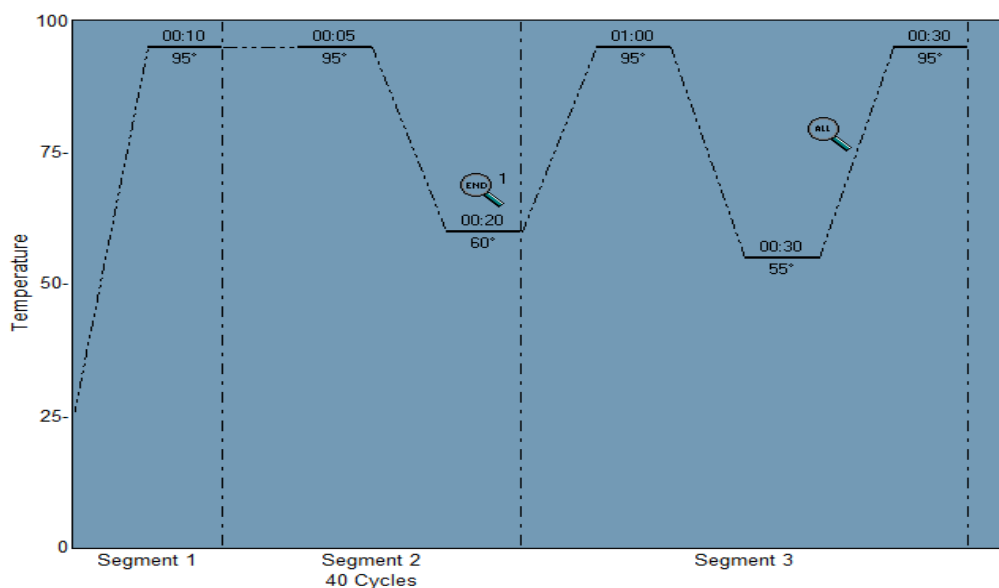


Fig. 4. Programa de amplificación en el termociclador en tiempo real.

5. Evaluación de la expresión del mRNA de CSD2

5.1 Síntesis de cDNA por hebra molde

Para amplificar el mensajero de CSD2 se utilizaron 50 ng de RNA total en un volumen final de 7.5 μ L (4.75 μ L de solución para la síntesis de cDNA más 3 μ L de RNA) se realizó la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del Kit Thermo Scientific Firts Strand cDNA Synthesis (#K1612) en un termociclador "Thermalcycler MJ mini. En el cuadro IV se muestran las cantidades que se añadieron a un tubo 0.2 mL libre de RNAsas se mezclan los siguientes reactivos:

Cuadro IV. Síntesis de cDNA y poli-A

Reactivos	Volumen en μL
Amortiguador 5X	1.5
dNTPs	0.18
Oligo dT	1
Inhibidor de RNA	0.1
Enzima RT	0.5
RNA	3
H ₂ O	1.22
Volumen total	7.5

Se incubaron los tubos en un termociclador durante 1 hora a 37 °C, posteriormente a 70 °C durante 10 minutos para inactivar las enzimas y 1 minuto a 22 °C y el cDNA se empleó para la cuantificación del CSD2 y el Knox-1 como constitutivo.

5.2 Cuantificación del mRNA de CSD2 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR-RT)

A partir del cDNA sintetizado, se evaluó la expresión del CSD2 (Cuadro V) por la PCR en tiempo real en un equipo de la marca Stratagen Mx 300 SP, Agilent Technologies y siguiendo el protocolo del Kit Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR (#K0252).

Cuadro V. Secuencias “forward” (F) y “reverse” (R) del gen CSD2, se muestra el tamaño en pares de bases (pb) de cada amplificado y la TM a la cual se realizará el RT-PCR.

Gen	Secuencia	TM
CSD2	F: GGATGACCTCGGAAAGGGT	60°C
	R: GTCAAGCCAATCACACCACA	
Knox-1	F: ATCATCTGAAGAAGATCTGGAT	60°C
	R: TCAACTCACTCTCTTCAGCTT	

Se mezclaron los reactivos indicados en el cuadro VI.

Cuadro VI. Cantidades empleadas de reactivos para qPCR de CSD2 y Knox-1

Reactivos	Volumen en μ L
Syber-green	10
ROX	0.04
Forward	1
Reverse	1
H ₂ O	6
cDNA	2
Volumen Total	20

El ciclo de reacciones para realizar la PCR en tiempo real es la siguiente:

- **Desnaturalización**
95 °C 10 minutos
- **qPCR X 40 ciclos**
95 °C 15 segundos
58 °C 60 segundos
- **Curva de disociación**
95 °C 60 segundos
58 °C 30 segundos
95 °C 30 segundos

La cuantificación en tiempo real se realizó en un termociclador en tiempo real Agilent® (Fig. 5)

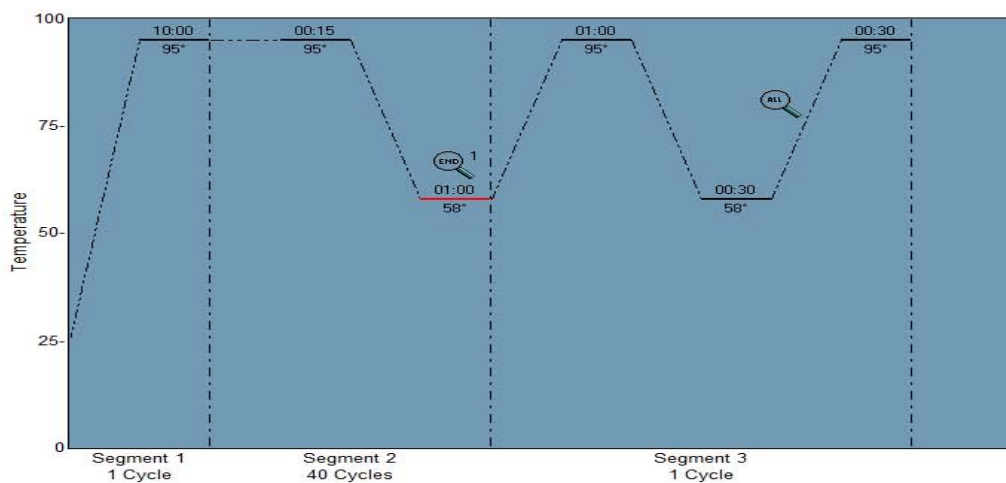


Fig. 5. Programa de amplificación en el termociclador en tiempo real.

6. Análisis de datos, cálculo de niveles de miR398 y CSD2

Los niveles de expresión fueron analizados utilizando el modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$, este método se utiliza para detectar cambios relativos en la expresión del gen de una PCR en tiempo real cuantitativa y describe el cambio en la expresión de un gen blanco con respecto a un gen de referencia (Pfaffl, 2001). El análisis se basó en el método comparativo de CT, el cual calcula los niveles relativos de expresión en comparación con un calibrador o control.

La formula es la siguiente:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En la que:

2 = Representa la eficiencia máxima de la PCR

Ct = Ciclo en el cual se cuenta con una cantidad detectable de DNA, que sobrepasa umbral de fluorescencia basal.

Para el cálculo de la $\Delta\Delta Ct$:

$\Delta Ct = Ct \text{ gen blanco (miR98 y CSD2)} - Ct \text{ gen de referencia (U6 y Knox-1)}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ plantas testigo negativo} - \Delta Ct \text{ plantas expuestas a contaminantes atmosféricos.}$

7. Reducción de MTT: detección de especies oxidantes.

Se tomó 1 cm² de las hojas expuestas en los sitios de estudio, disgregando el tejido con 300 µL de solución salina (Solución CS PiSA, Cloruro de Sodio 0.9%) y centrifugando a 10,000 rpm durante 5 minutos, tomando 60 µL el sobrenadante del homogeneizado y añadiendo 40 µL de solución de MTT (5 mg / mL de MTT en PBS) (tiazolilo azul de tetrazolio, M2128 de Sigma). Cada prueba incluyó un blanco que contenía solución

salina y solución de MTT, se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Eliminando el medio cuidadosamente y añadiendo 50 µL por pocillo de disolvente MTT (HCl 4 mM, 0,1%-40 P (NP40), todo en isopropanol Nondet). Los cristales de MTT-formazán constituidos por las interacciones de los radicales libres con MTT se midieron utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 590 nm como absorbancia principal y una longitud de onda de 620 nm para medir la absorbancia de fondo, que después se resta de la absorbancia principal. El porcentaje de reducción de MTT se calculó sobre la base de la absorbancia obtenida a partir del testigo.

8. Análisis de metales pesados

8.1 Tratamiento de muestras en horno de microondas

Las hojas de *Taraxacum officinale* se sometieron a una digestión ácida en caliente, utilizando ácido nítrico 3 M, empleando un horno de microondas marca CEM, modelo MARS 5, con una capacidad para 14 vasos (HP-500) de politetrafluoruro de etileno (PTFE), el cual cuenta con un sensor de presión (ESP-1500 Plus) y un sistema para control de temperatura (EST-300 Plus), que resisten altas presiones y temperaturas. Las hojas se colocaron en los vasos de PTFE, adicionando 15 mL de HNO₃ 3 M durante un tiempo de 45 minutos para su digestión. Una vez digeridas las muestras, se aforaron a 25 mL con agua desionizada, obteniendo una acidez final del HNO₃ de 0.45 N, las muestras se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

8.2 Técnica analítica

Debido a la importancia del efecto tóxico de los metales se evaluaron los niveles de ocho metales traza (Al, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb y V). El análisis químico de metales pesados de las muestras, se realizó aplicando la técnica de E.A.A. (horno de grafito), empleando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica (GBC AVANTA Σ), con un horno de grafito acoplado a una fuente de poder y un auto-muestreador automático modelo PAL3000, ambos controlados por una computadora. Se utilizó una lámpara de deuterio, con

corrección de fondo, tubos de grafito pirolíticamente recubiertos y lámparas de cátodo hueco (Photron Super lamp). Los metales pesados estudiados se analizaron con su correspondiente lámpara y a la longitud de onda característica de la línea de emisión de cada metal.

8.3 Validación del método

Aseguramiento de calidad

La calibración se realizó empleando estándares certificados que se prepararon dentro del rango de concentración esperado de las muestras trazables a NIST, Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (National Institute of Standard and Technology, NIST). Los límites de detección para metales son: Al = 6.03, Cd = 0.07, Cr = 0.38, Fe = 2.04, Mn = 0.46, Ni = 0.78, Pb = 1.14 y V = 3.12.

Límite de detección. Se establece corriendo un blanco reactivo, midiendo el nivel de ruido y sumándole tres veces la desviación estándar de señal del blanco detectada por el sistema analítico.

$$\text{Límite de Detección (LOD)} = Y_B + 3s_b$$

Donde:

Y_B = señal del blanco o ruido de fondo

$3s_b$ = (n) veces la desviación estándar del blanco

El control de calidad se llevó a cabo analizando blancos.

Linealidad. Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta), con tres puntos a partir de la dilución del estándar. Se emplearon 5 diluciones entre 5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) para los metales.

9. Análisis estadístico

Para observar las diferencias entre el grupo testigo y las dos zonas de la Ciudad de México se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Para establecer las diferencias entre los grupos se utilizaron comparaciones múltiples empleando la corrección de Bonferroni. Esta prueba ajusta el nivel de significancia de cada comparación de acuerdo con el número de pruebas realizadas simultáneamente, dividiendo el error global de tipo I por el número de contrastes.

RESULTADOS

1. Identificación y cuantificación de metales pesados

La figura 4, muestra la concentración promedio de los ocho metales identificados en las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Alzomoni y CCA, se observa la concentración total e individual de cada uno por sitio, Al, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb y V. Pese a que se observa variabilidad en los resultados de metales para cada sitio, la época de secas presenta una mayor concentración. Para época de secas en Alzomoni se muestran altas concentraciones de metales, destacando el Al (932.3 µg/g), Cr (241 µg/g), Fe (165 µg/g), Mn (281 µg/g) y Ni (274.2 µg/g). Para CCA, en temporada de secas, predominan Cd (145 µg/g), Ni (338 µg/g) y en alta concentración el V (2181 µg/g).

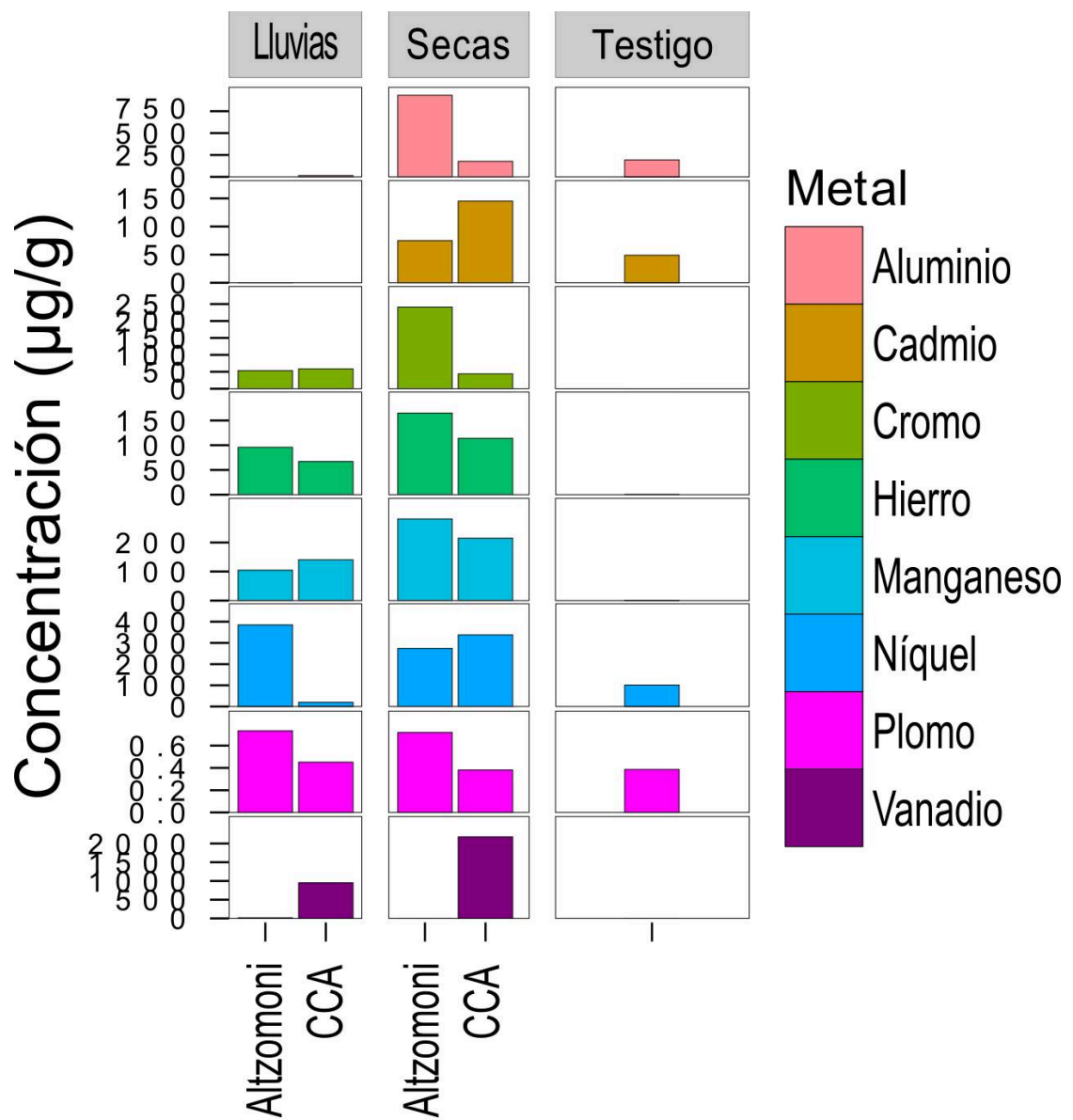


Fig. 4. Concentraciones (µg/g) de metales en las hojas de *Taraxacum officinale*: Testigo, los dos sitios de exposición en dos épocas del año.

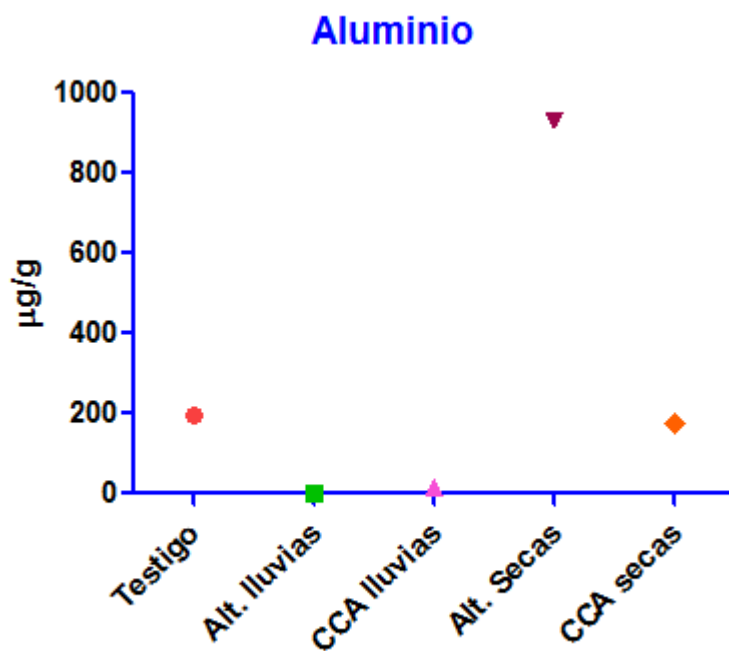


Fig. 5. Concentraciones de aluminio ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Alzomoni y CCA (secas y lluvias).

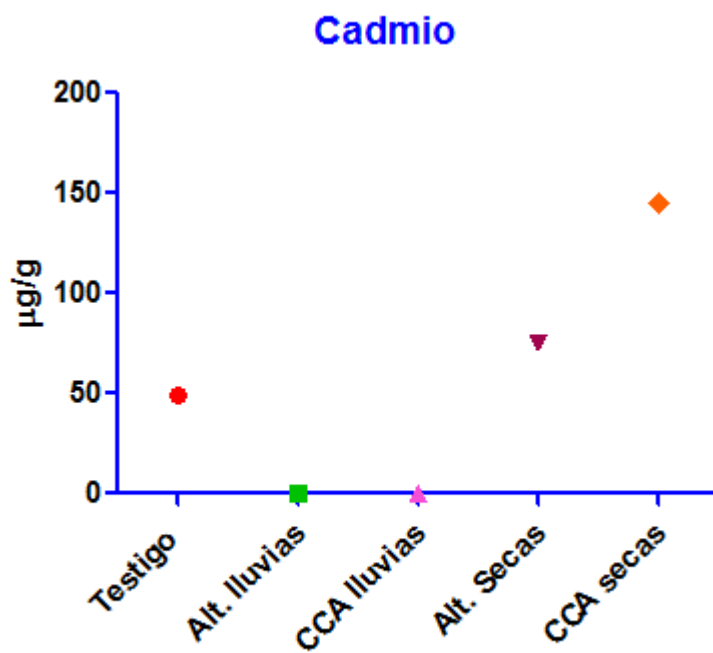


Fig. 6. Concentraciones de cadmio ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Alzomoni y CCA (secas y lluvias).

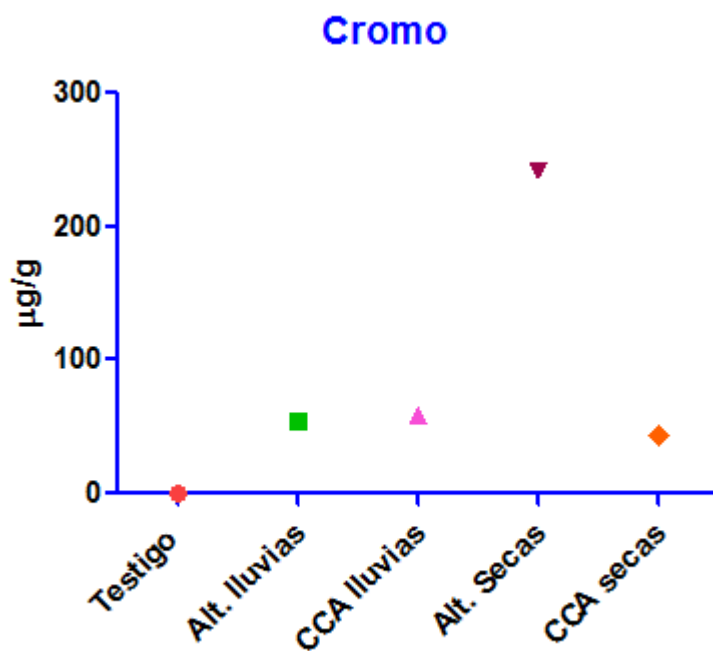


Fig. 7. Concentraciones de cromo ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Altzomoni y CCA (secas y lluvias).

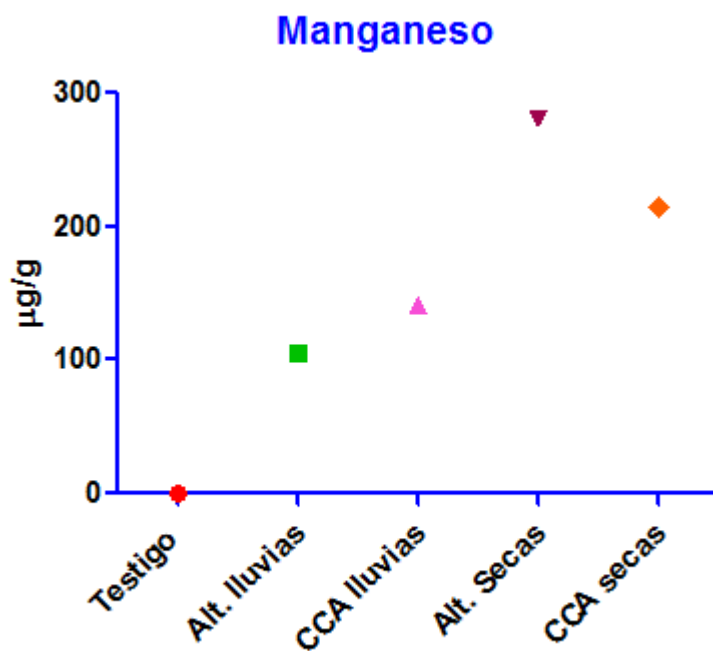


Fig. 8. Concentraciones de manganeso ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Altzomoni y CCA (secas y lluvias).

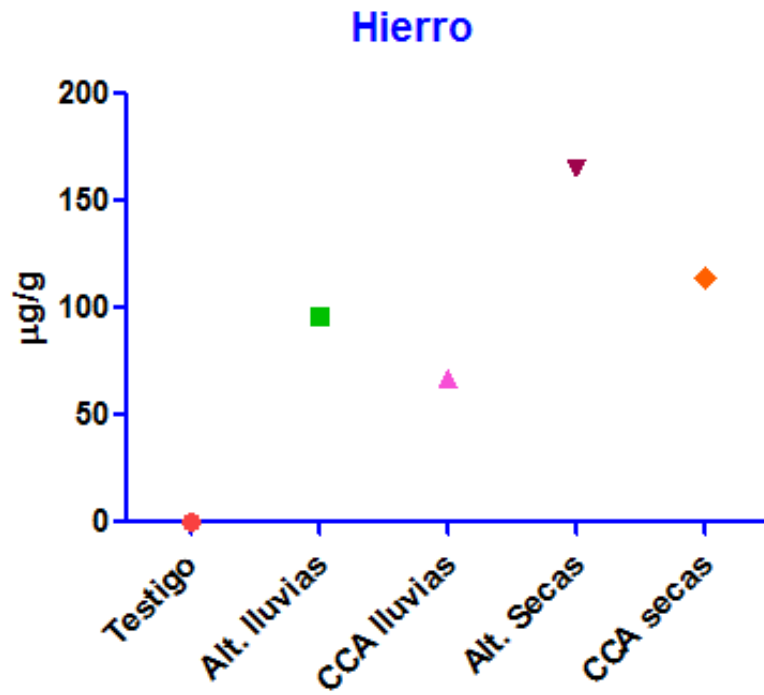


Fig. 9. Concentraciones de hierro ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Altzomoni y CCA (secas y luvias).

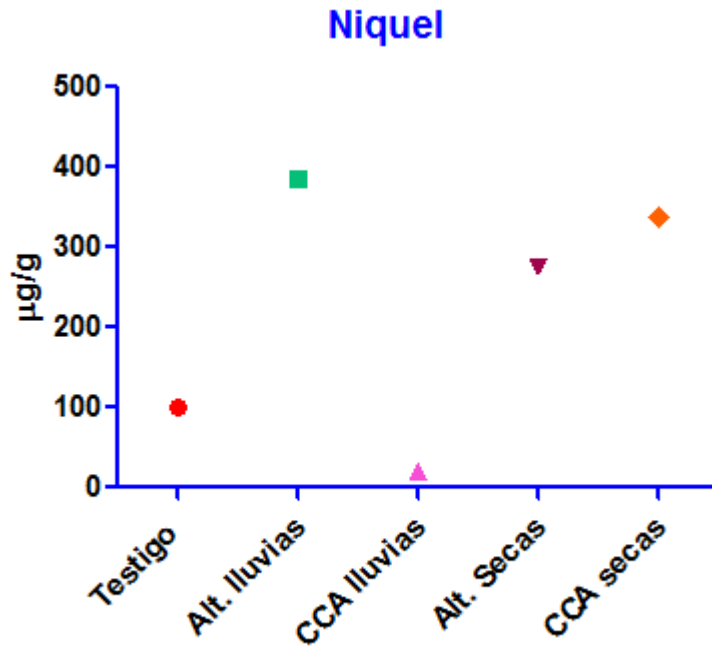


Fig. 10. Concentraciones de níquel ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Altzomoni y CCA (secas y luvias).

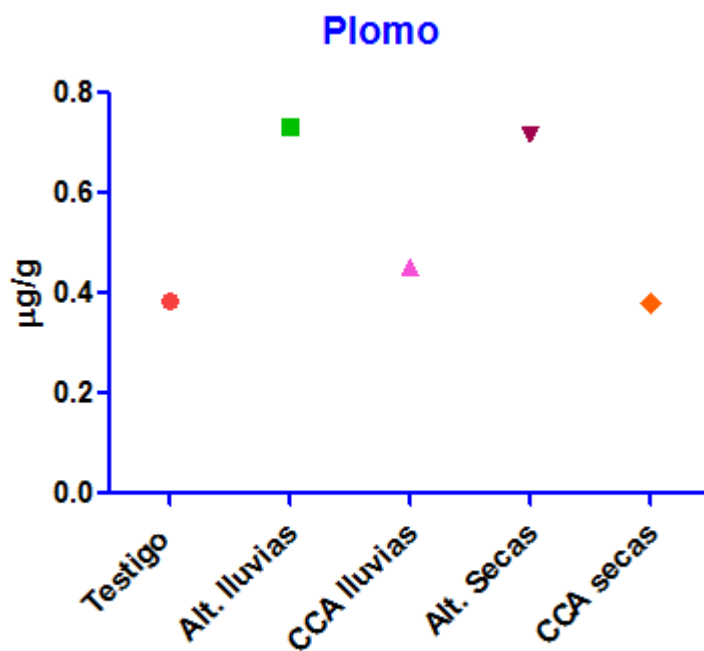


Fig. 11. Concentraciones de plomo ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Altzomoni y CCA (secas y Iluvias).

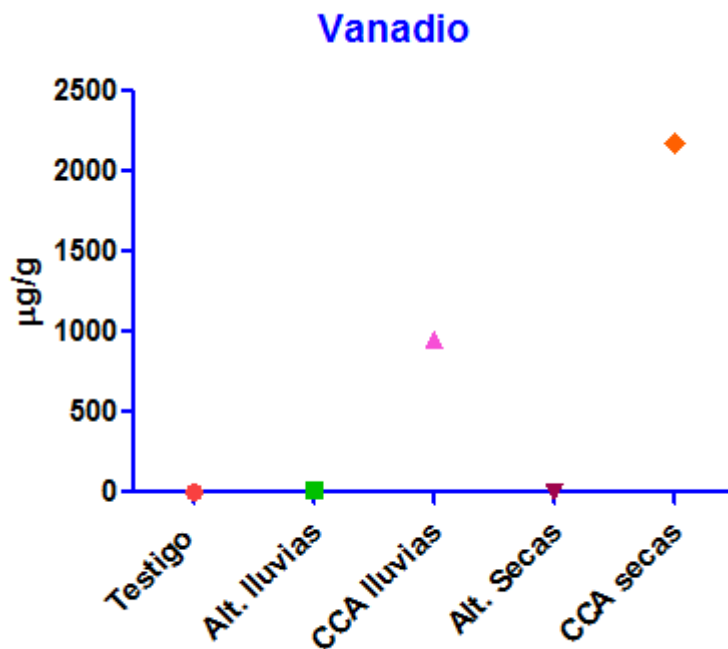


Fig. 12. Concentraciones de vanadio ($\mu\text{g/g}$) halladas las hojas de *Taraxacum officinale* expuestas al aire de Altzomoni y CCA (secas y Iluvias).

2. Generación de estrés oxidante detectado por la prueba de MTT

Con el fin de determinar estrés oxidante en las células de las plantas expuestas se evaluó la cantidad de la reducción de MTT. No se encontraron diferencias significativas en la formación de formazán en el testigo negativo con respecto a las muestras de las plantas expuestas en tiempo de secas para ambos sitios (Fig. 13). Sin embargo, se muestra un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la formación de formazán en las muestras de lluvias, observando una disminución en el potencial oxidante.

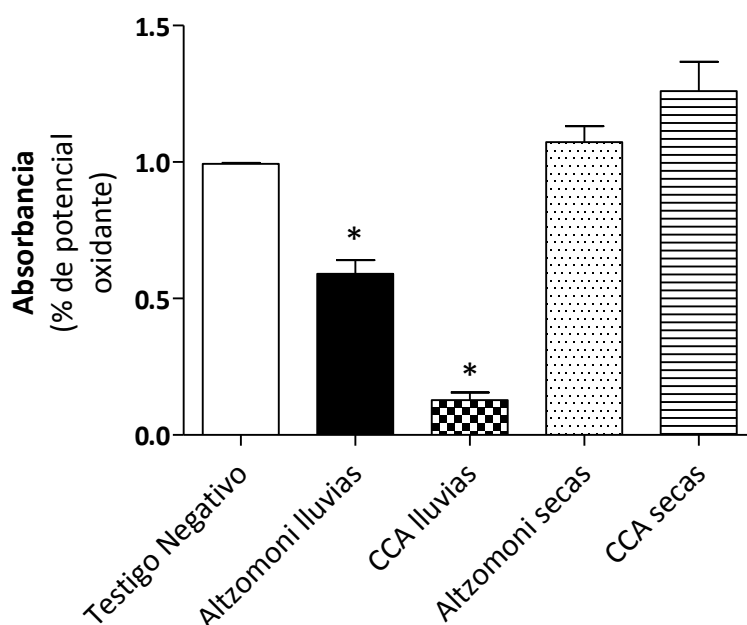


Fig. 13. Prueba de MTT, indica el porcentaje de potencial oxidante para las muestras de temporada de lluvias (agosto-septiembre 2014) y secas (abril-mayo 2014) de los sitios CCA y Altzomoni con diferencias significativas respecto al testigo negativo ($p < 0.05$).

3. Expresión de miR398

En la figura 14, se observa la curva de disociación de las muestras de cDNA analizadas, éstas indican que son específicas para el fragmento amplificado que se está buscando y se muestra la expresión del miR398 con los NTC que no amplifican (Fig. 15).

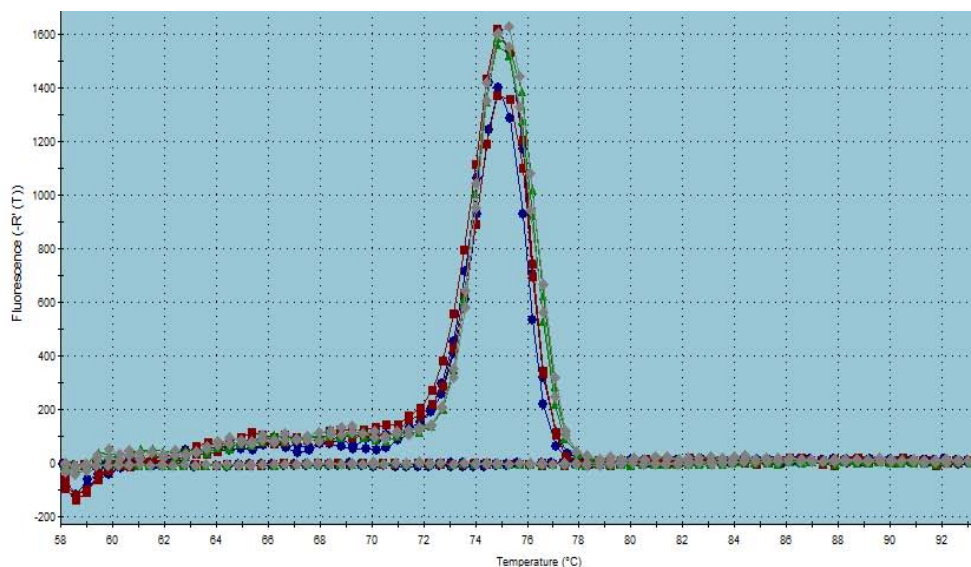


Fig. 14. Curva de disociación y expresión de miR398.

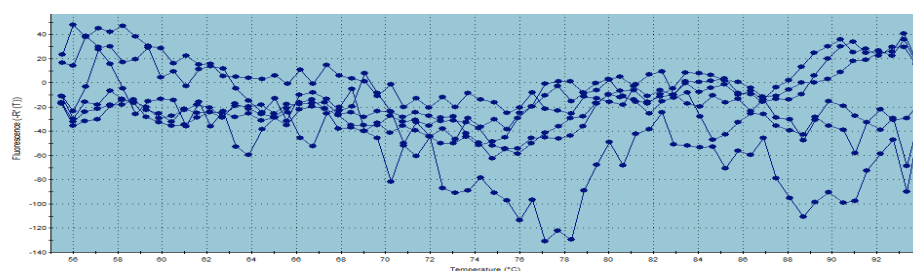


Fig. 15. NTC de miR398

Los resultados de este trabajo demuestran que en las plantas de *Taraxacum officinale* la expresión del miR398 cambia con respecto al testigo negativo mostrando diferencias significativas, dependiendo de la temporada en ambas

zonas de exposición (CCA y Altzomoni). Siendo la temporada de lluvias donde se muestra mayor expresión ($p < 0.05$). Por otra parte, se observó que en la zona CCA la expresión del miR398 siempre es menor en comparación con las expuestas en Altzomoni (Fig. 16).

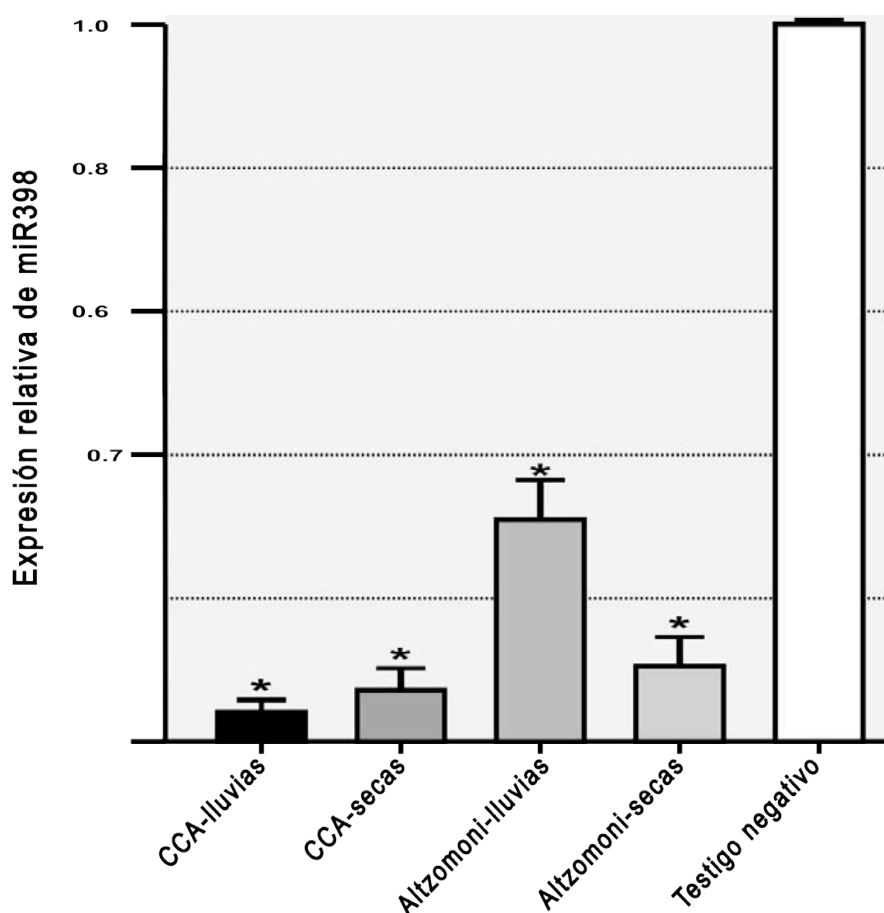


Fig. 16. Expresión relativa de miR398 en temporada de secas (abril-mayo 2014) y lluvias (agosto-septiembre 2014) para los sitios de CCA y Altzomoni $p < 0.05$ *.

Se observa una mayor expresión del miR398 para la temporada de lluvias en el sitio de Altzomoni (0.056 ± 0.051). Mientras que las expuestas en temporada de secas para Altzomoni exhiben una disminución en la expresión relativa de miR398 (0.002 ± 0.0006). Por otra parte, se observó que en la zona CCA tanto para lluvias (0.000123 ± 0.00035), como para secas (0.000123 ± 0.00035) la expresión del

miR398 siempre es menor en comparación con el testigo (1 ± 0.159) y las expuestas en Altzomoni lluvias (0.056 ± 0.051), éstas fueron significativas ($p < 0.05$).

2. Expresión de CSD2

Por otro lado, los resultados de la expresión relativa del mRNA de CSD2 muestran que éste se ve afectado únicamente en aquellas plantas de *Taraxacum officinale* que se expusieron durante la temporada de secas en ambos sitios mostrando diferencias significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$). En la figura 9 se observa la curva de disociación de las muestras de cDNA analizadas, éstas indican que son específicas para el CSD2 al observar solo una curva de amplificación.

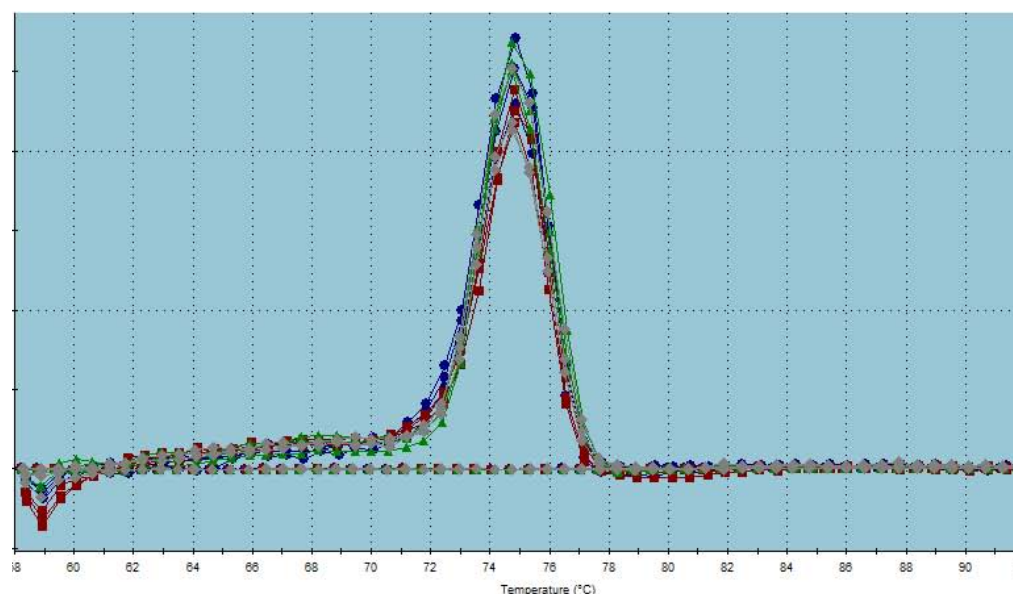


Fig. 17. Curva de disociación y expresión de CSD2.

Se observa que en la temporada de secas existe una mayor expresión relativa del RNA mensajero de CSD2 en Altzomoni (19.80 ± 7.04) y CCA (119.67 ± 22.79).

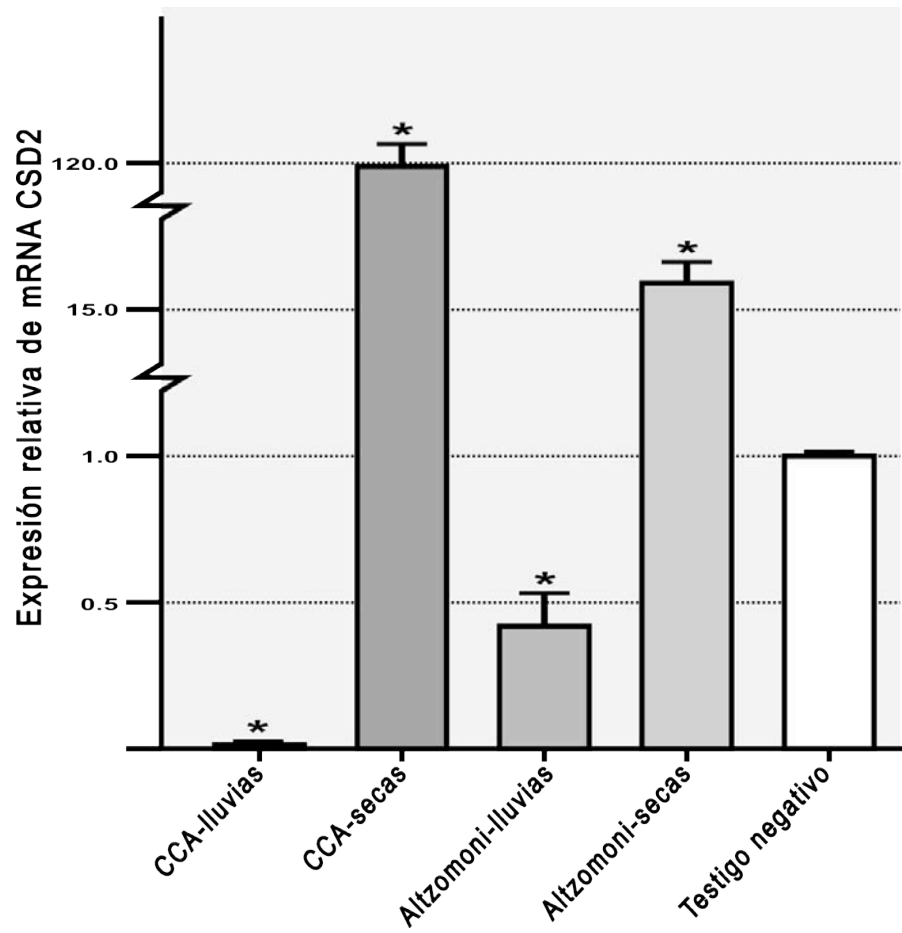


Fig. 18. Expresión relativa de CSD2 en temporada de secas (abril-mayo 2014) y lluvias (agosto-septiembre 2014) para los sitios de CCA y Altzomoni $p < 0.05^*$.

DISCUSIÓN

La supervivencia de las plantas depende de la rápida regulación de la expresión génica con el fin de adaptar su fisiología al estrés abiótico. Estudios recientes indican que la expresión de los genes está estrechamente regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional y juega un papel importante en la respuesta de las plantas ante agentes que provocan estrés (Floris *et al.* 2009).

La evaluación de los miRNAs es una prueba que permite estudiar la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Por tal motivo, en este trabajo se propuso a *Taraxacum officinale* como bioindicador de contaminación atmosférica de dos sitios del AMCM en dos temporadas por la expresión del miR398 y su mRNA blanco CSD2. Asimismo, se identificaron y cuantificaron ocho metales en las hojas. Debido al creciente aumento de la población y el uso de suelo, la calidad del aire del AMCM se ha visto afectada, superando los niveles máximos permitidos de contaminantes atmosféricos. Existen evidencias de los efectos adversos de los contaminantes atmosféricos en plantas, provocan alteraciones a nivel molecular, celular y fisiológico (Calderón *et al.* 2013, Liu *et al.* 2015, Tiwari *et al.* 2006).

Un factor importante del efecto de los contaminantes atmosféricos en las plantas es el tráfico vehicular, éste provoca daños morfológicos e inestabilidad genética (Erofeeva 2014, Spósito *et al.* 2015). En el trabajo de Erofeeva (2014) donde expusieron a *Taraxacum officinale* a contaminantes del tráfico vehicular, se muestran diferentes tipos de respuesta que dependen del tiempo de exposición, provocando alteraciones en la reproducción de las plantas afectando la producción de semillas principalmente en su peso y número.

1. Concentración de metales en *Taraxacum officinale*

Los resultados de metales pesados muestran una alta concentración en la temporada de secas para los dos sitios de exposición en *Taraxacum officinale* siendo Al, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni y V los que se encuentran en mayor proporción. Se muestra variación en la concentración de los diferentes metales, ya que no se puede asegurar que todos están en mayor proporción para una zona y temporada. Esto es apoyado por Barber *et al.* (2004), quien señala una dependencia de las diferencias morfológicas y fisiológicas de las plantas, además de otros factores como la transferencia de aire, la estructura cuticular, el área de superficie y la longevidad de la hoja. Little (1978) y Madany *et al.* (1990) demostraron que las hojas ásperas y peludas acumulan significativamente más plomo que las hojas lisas. Por otro lado, el depósito de metales también depende del índice de estomas, la densidad de tricomas y la eficiencia de recolección de polvo por las plantas (Rao y Dubey 1992).

Diversas investigaciones apoyan los resultados obtenidos en este trabajo, sugiriendo la acumulación de metales a través de la cutícula por medio de la absorción de material particulado (Grantz *et al.* 2003). Asimismo, señalan que la permeabilidad de metales depende de la madurez de la cutícula y de factores ambientales (Chamberlain 1983, Nair *et al.* 2010).

Schreck *et al.* (2012) observaron en las hojas de avena agregados de partículas de Pb y Fe, así como partículas de Al y silicato (Si) de zonas industriales. Asimismo, Ward (1990) informó que varios metales entre éstos incluido el Mn podían cruzar la cutícula.

Para el año 2002, Rosas-Pérez *et al.* (2007) reportaron para la zona sur de la Ciudad de México (Ciudad Universitaria) concentraciones de V ($0.377 \mu\text{g mg}^{-1}$), Cr ($0.676 \mu\text{g mg}^{-1}$), Mn ($0.727 \mu\text{g mg}^{-1}$), Fe ($23.282 \mu\text{g mg}^{-1}$) y Pb ($0.024 \mu\text{g mg}^{-1}$) asociados a estos niveles de concentración de metales pesados observaron daños celulares. Mientras tanto, en el presente trabajo de investigación se hallaron altas concentraciones de metales pesados en las hojas de *Taraxacum officinale* siendo mayores para el sitio de CCA en

temporada de secas, también ubicado en Ciudad Universitaria, posiblemente debido a que la concentración de contaminantes atmosféricos fue mayor para la temporada de secas 2014 o bien por la capacidad de las estructuras aéreas para absorber las aeropartículas.

2. Porcentaje de Potencial Oxidante

Se encontró una reducción en el porcentaje de potencial oxidante para las muestras de lluvias en ambos sitios, lo cual tiene relación con la concentración de metales pesados para esta temporada. Sin embargo, el testigo negativo muestra un mayor potencial oxidante, lo que se puede explicar debido a un aumento en la concentración de metales como Al, Cd y Ni, los cuales estarían provocando un incremento en la cantidad de EROs en la muestra de testigo negativo. Particularmente, en caso del Al, se ha mostrado que su acumulación genera estrés oxidante, sin embargo, a niveles bajos en cultivos de centeno son tolerantes a este metal, ya que en el centeno se muestran diferentes patrones de expresión de mRNAs de genes SOD, esto debido a varios genes que codifican transportadores de ácidos orgánicos cuyos efectos acumulativos aumentaría la tolerancia a Al (Sánchez-Parra *et al.* 2014).

Por otro lado, el Cd participa provocando estrés oxidante en plantas, Zong Bo Qiu *et al.* (2016) demostraron que el miR398 está implicado en la tolerancia a Cd mediante el control de su blanco CSD.

Por último, un aumento de la concentración de Ni en el suelo interviene negativamente en el crecimiento vegetal y la producción de cultivos. Asimismo, afecta la expresión de antioxidantes, este metal conduce a la generación de EROs causando daño oxidante a las biomoléculas, el aumento de H₂O₂ provocando la peroxidación de lípidos, además obstaculiza la fijación de CO₂ y la fotosíntesis, suprime el transporte de electrones alterando el cloroplasto (Gajewska *et al.* 2006, Ahmad *et al.* 2007). Sin embargo, el Ni también puede activar una isoforma de la glicosilasa I (Mustafiz *et al.* 2014), importante en el proceso de desintoxicación. El Ni puede tener una participación clave en el metabolismo vegetal antioxidante especialmente en

condiciones de estrés. Se ha demostrado que el Ni puede activar la glicosilasa en el arroz (*Oryza sativa*). Estudios demuestran que la glicosilasa ha evolucionado para ayudar a adaptarse al estrés (Kaur *et al.* 2013). Dado que se produce una dependencia acoplada entre la glicosilasa I y el Ni induciendo la regeneración de GSH y por lo tanto en la homeostasis. En este contexto, el Ni puede ser un elemento clave para la protección de las plantas frente a condiciones de estrés al disminuir el nivel de MG a través de la actividad de la glicosilasa. Existen fuertes evidencias acerca de la esencialidad de Ni en la modulación de la tolerancia al estrés (Sirhindi *et al.* 2016).

3. Expresión de miR398

Es interesante la maquinaria de los miRNAs debido a que son factores clave de la expresión génica, ya que tienen una amplia gama de procesos que pueden dirigir, tales como el desarrollo, la respuestas de adaptación al estrés y la regulación entre sí por otros miRNAs. La mayoría de los miRNAs no funcionan independientemente, sino que están involucrados en la superposición de redes de regulación y una característica evidente de la adaptación al estrés es el cambio en los perfiles de expresión génica por una amplia gama de procesos bioquímicos, celulares y fisiológicos.

De acuerdo a los resultados de la expresión del miRNA, las plantas expuestas *in vivo* al aire exhibieron una expresión diferencial del miR398 para las dos zonas y temporadas, se observó una baja expresión relativa en la época de secas para las dos zonas evaluadas.

Aunque no se han realizado estudios que evalúen el efecto de los contaminantes atmosféricos en la expresión del miR398, los resultados de metales pesados sugieren que la alta concentración de éstos en los tejidos de las plantas para la época de secas está provocando estrés oxidante. Esto conduce a una disminución en la expresión del miRNA, para permitir que aquellos mRNAs blancos que son inhibidos por el miR398 se acumulen y regulen el estrés oxidante celular. Esto concuerda con lo publicado por

Sunkar *et al.* (2006b) en *Arabidopsis thaliana* para quienes la exposición a metales pesados como Cu y Fe probaron su participación en reacciones tipo Fenton y su potencial para generar radicales hidroxilo (Dietz *et al.* 1999, Estevez *et al.* 2001), señalando que las SOD desempeñan papeles fundamentales en la respuesta al estrés oxidante mediante la disminución de radicales superóxido, por medio de la regulación del miR398 sobre la expresión de los transcritos de CSD2. Por lo tanto, tras la disminución del miR398, el transcrito de CSD2 usualmente incrementa y se acumula (Sunkar *et al.* 2006b, Yamasaki *et al.* 2007a).

4. Expresión de CSD2

Por otro lado, CSD2 tuvo una respuesta distinta a la del miR398, este mRNA se expresó significativamente en la temporada de secas en Altzomoni y CCA, siendo este último sitio el que supera la expresión de este gen ($p < 0.05$).

Esto indica que CSD2 está respondiendo ante el estrés oxidante provocado por contaminantes atmosféricos, en este caso se observa una concentración elevada para la época de secas en Altzomoni (19.80 ± 7.04) y CCA (119.67 ± 22.79), debido a que, como señala Mittler *et al.* (2004), las enzimas superóxido dismutasa tienen un papel fundamental como antioxidantes en la desintoxicación de radical O_2^- convirtiéndolo a H_2O_2 . Aunque las SOD se expresan en condiciones de estrés para permitir la desintoxicación, sin embargo en condiciones normales son reprimidas. En *A. thaliana*, el mRNA de CSD2 se acumula en respuesta a los tratamientos que inducen estrés oxidante, como el exceso de Cu y Fe (Sunkar *et al.* 2006b).

Las plantas utilizan una red compleja de señalización en la expresión de genes, en la regulación traduccional, post-traduccional, transcripcional y post-transcripcional. La regulación post-transcripcional de genes es dirigida por los siRNAs y miRNAs; estos últimos son reguladores clave debido a que determinan la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en diversas vías. Existen aproximadamente 20 familias de miRNAs

conservados en plantas, el miR398 está directamente asociado como regulador de estrés, este tiene como blancos a los mRNAs de CSD1 y CSD2, ya que estas enzimas regulan la desintoxicación en las células.

Un aspecto interesante que concuerda con los resultados encontrados en este trabajo son los estudios que muestran que existe una correlación negativa entre miR398 y el mRNA de CSD2 dentro de altas concentraciones de estrés provocado por Cu, Fe, Cd, P, N, entre otros (Adbel-Ghany y Pilon 2008, Jagadeeswaran *et al.* 2009, Sunkar *et al.* 2006b, Yamasaki *et al.* 2007a, 2009b).

El tiempo y el lugar de exposición de las plantas son factores clave en el efecto de los contaminantes atmosféricos (Becker *et al.* 2005, Roger *et al.* 2005, Rosas-Pérez *et al.* 2007). En el presente estudio el sitio de CCA en temporada de secas fue el que mostró una diferencia significativa con respecto al testigo tanto para la expresión relativa del miR398 y CSD2, debido a que es una zona mayormente afectada por las emisiones vehiculares e industriales (Molina y Molina 2005). Asimismo, el trabajo de Rosas-Pérez *et al.* (2007) indica que la localización geográfica y la composición del material particulado produce efectos celulares distintos. Aunque en este trabajo solo se determinó la concentración de ocho metales pesados en las hojas, algo importante que destaca en la composición de la atmósfera es su complejidad, ya que existen mezclas heterogéneas de componentes orgánicos e inorgánicos compuestos que son un resultado de la emisión primaria de contaminantes, reacciones secundarias como resuspensión de polvo, partículas generadas por la abrasión mecánica de superficies por neumáticos y carreteras.

Igualmente el tiempo es un factor determinante para la expresión relativa del miR398 y CSD2. En temporada de secas se observa una mayor diferencia en expresión relativa. También existe una mayor concentración de metales en las plantas de la zona de Altzomoni comparada con la concentración de metales para el sitio de CCA, la respuesta de los genes se muestra mucho menos marcada que para el sitio de Altzomoni con respecto al

testigo, esto posiblemente se debe a las numerosas variables involucradas en la atmósfera. En el estudio realizado por Calderón-Segura *et al.* (2004) encontraron que las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos fueron más altos en abril y más bajos en agosto; ya que el tipo de sustancias químicas contaminantes dependía de las condiciones meteorológicas, induciendo genotoxicidad.

El sitio de Altzomoni en temporada de secas, fue el que mostró una mayor concentración de metales pesados esto quizá se deba a la emisión de contaminantes por el volcán Popocatépetl, ya que en la composición de las cenizas volcánicas se encuentran metales de transición como el azufre, manganeso, cobre y zinc en material particulado de 2.5 μm (Narváez y Cano 2004).

Aunque Altzomoni en tiempo de secas fue donde se encontró una mayor concentración de metales, esto no coincide con los resultados obtenidos de la expresión de relativa del miR398 y CSD2, quizá porque están interviniendo otros contaminantes atmosféricos en la expresión de dichos genes. Además, cabe destacar que se detectaron en mayor proporción Cd, Ni y V en las plantas expuestas en el sitio de CCA secas, estos pueden ser los causantes de las diferencias de expresión para el miR398 y CSD2.

En el estudio de Gajewska y Sklodowska (2010) se señala que el Cd no tiene ninguna función biológica conocida en los organismos y muestra un impacto más tóxico en comparación con otros metales, la exposición de Cd en bromelias (Kováčik *et al.* 2014) y en *Arabidopsis thaliana* (Martínez *et al.* 2012) provoca un aumento en la concentración de H_2O_2 reduciendo la eficiencia fotosintética. Igualmente, en las algas, el Cd incrementó las EROs provocando un efecto inhibitor en el crecimiento (Piotrowska *et al.* 2012) y desmetilación del DNA (Kumar *et al.* 2012).

Por otro lado, el Ni que se consideraba un elemento esencial para las plantas (Brown *et al.* 1988), sin embargo, se mostró posteriormente como fitotóxico cuando se encontraba en altas concentraciones (Sheoran y Singh

1993), puesto que es absorbido como catión Ni^{2+} (Mishra y Kar 1974, Uren 1992) y es transportado rápidamente a los sitios metabólicamente activos, ocasionando múltiples efectos tóxicos en el crecimiento (Mishra y Kar 1974, Sheoran y Singh 1993, Krämer *et al.* 1997), interfiriendo en la absorción y transporte de otros nutrientes a los diferentes órganos de las plantas provocando serias deficiencias (Rubio *et al.* 1994). Así como generando la expresión de EROs en *Hypnum plumaeforme*, *Thuidium cymbifolium* y *Brachythecium piligerum* (Sun *et al.* 2010a).

Un resultado interesante de este trabajo de investigación fue la elevada concentración de V en los tejidos de las plantas expuestas para el sitio de CCA en temporada de secas (2181 $\mu\text{g/g}$). Aunque este metal participa en la síntesis de clorofila (Lagerkvist *et al.* 1986), cabe destacar que es uno de los elementos traza presentes en los combustibles fósiles y en grandes ciudades se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4 $\mu\text{g/m}^3$ y en áreas rurales cantidades menores a 0.024 $\mu\text{g/m}^3$ (Lagerkvist *et al.* 1986, IPCS 1988). Para la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan 0.114 $\mu\text{g/m}^3$ en aeropartículas de 10 μm y 0.093 $\mu\text{g/m}^3$ en las de 2.5 μm (Gutiérrez *et al.* 2006). Esto coincide con lo encontrado en este estudio, ya que para el sitio de CCA localizado al sur de la Ciudad de México se encontró en mayor concentración en comparación con el sitio de Alzomoni donde se observan bajas cantidades.

Los resultados demuestran que el aire de las dos zonas de estudio para la época de secas influye en la modulación de la expresión del miR398 y CSD2 con respecto al testigo. Posiblemente, esta actividad molecular está vinculada a procesos de estrés oxidante provocado por el aumento de metales pesados en los tejidos de las hojas de *Taraxacum officinale*.

En este estudio la época del año es una variable determinante en la expresión de genes, de modo que los tipos y la concentración de contaminantes, la luz del sol, el tamaño de partícula, la lluvia, el viento, la temperatura y los gases son factores clave en la respuesta molecular de las

plantas, debido a que proporcionan variación importante en el análisis de la expresión relativa de los genes estudiados.

Como último punto, es necesario realizar más estudios que demuestren la capacidad que tiene la maquinaria celular y molecular de las plantas para eliminar los compuestos atmosféricos, procesos que finalmente interaccionan entre sí. Debido a la importancia ecológica de las plantas como productores primarios, base de la cadena trófica y hábitat de muchos organismos, es importante considerar su participación en el filtrado de contaminantes y el suministro de oxígeno a la atmósfera.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados se concluye que:

- Existe una disminución de la expresión relativa de tof-miR398 para la época de secas de ambos sitios (Altzomoni y CCA).
- La expresión relativa de CSD2 se ve aumentada en época de secas, siendo para el sitio de CCA donde se observa una mayor expresión relativa. Esto probablemente debido a los altos niveles de concentración del Cd, Ni y V.
- Se observó un aumento de estrés oxidante asociado a la época de secas para ambos sitios de estudio.
- Los resultados de la expresión diferencial del tof-miR398 y su mRNA blanco CSD2 en *Taraxacum officinale* sugieren como bioindicadores de contaminación atmosférica.

PERSPECTIVAS

- Determinar la concentración de proteínas de CSD2 en las células de *Taraxacum officinale*.
- Identificar nuevos miRNAs que participen en la respuesta a estrés oxidante, por análisis de microarreglos y RT-qPCR para la identificación de las redes de regulación de los miRNAs en las células de *Taraxacum officinale* ante la exposición a contaminantes atmosféricos.
- Evaluar los daños de los contaminantes atmosféricos a nivel celular.
- Estudiar el efecto de otros contaminantes atmosféricos en *Taraxacum officinale*, en especial el O₃, NO₂ y el SO₂, que son los que se reportan en altas concentraciones en la atmósfera
- Investigar el efecto de la lluvia en *Taraxacum officinale*, exponiendo directamente a un grupo de plantas y alternamente otro que esté protegido de la precipitación de contaminantes atmosféricos, observando la respuesta de ambos grupos en la absorción de contaminantes y expresión de genes.
- Enfocarse en proyectos de mitigación de contaminantes basados en el papel que juegan las plantas, no solo como marcadores de daño biológico, sino también como sumideros, particularmente en ciudades con elevados índices de contaminación atmosférica, como es el caso de la Ciudad de México, proponiendo a especies de plantas como mitigadores de contaminantes atmosféricos.

Anexo I

Cuadro VII. Promedio y E.E. de tof-miR398

CCA Lluvias	CCA Secas	Alzomoni Lluvias	Alzomoni Secas	Testigo Negativo
0.000123±0.00035	0.00088±0.0003	0.056±0.051	0.002±0.0006	1±0.159

Cuadro VIII. Promedio y E.E. del mRNA CSD2

CCA Lluvias	CCA Secas	Alzomoni Lluvias	Alzomoni Secas	Testigo Negativo
0.0024±0.004	119.67±22.79	0.040±0.09	19.80±7.04	1±0.143

Cuadro IX. Promedio y E.E. Potencial Oxidante

CCA Lluvias	CCA Secas	Alzomoni Lluvias	Alzomoni Secas	Testigo Negativo
0.12± 0.031	1.27±0.169	0.59±0.079	1.07±0.128	1±0.027

Cuadro X. Concentraciones promedio ($\mu\text{g/g}$) de metales en las hojas de *Taraxacum officinale*: Testigo negativo, los dos sitios de exposición en dos épocas del año.

	Testigo Negativo	Altzomoni lluvias	CCA lluvias	Altzomoni secas	CCA secas
Al ($\mu\text{gL-1}$)	194.11	0.196	15.5	932.3	178
Cd ($\mu\text{gL-1}$)	49	0.187	0.076	75	145
Cr ($\mu\text{gL-1}$)	0.1572	53.6	58.6	241	44
Fe ($\mu\text{gL-1}$)	0.4096	95.8	67	165	114
Mn ($\mu\text{gL-1}$)	0.1015	104.7	140.5	281	215
Ni ($\mu\text{gL-1}$)	101.3	385	19.7	274.2	338
Pb ($\mu\text{gL-1}$)	0.386	0.733	0.452	0.718	0.381
V ($\mu\text{gL-1}$)	0	14	951	0	2181
Total	243.4986	723.4165	1252.828	1900.018	1475.1579

REFERENCIAS

- Abdel-Ghany S.E. y Pilon M. 2008. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 15932–15945.
- Ahmad M. S. A., Hussain M., Saddig R. y Alvi A.K. 2007. Mung bean: a nickel indicator accumulator or excluder. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 319-324.
- Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Bonner J.C, Clifford Murray J., Rosas I., Ponce de León Rosales S. y Osornio-Vargas A. 2002. Biologic effects induced *in vitro* by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives* 110, 715–720.
- An J., Jeong S., Moon H., Jho E. y Nam K. 2012. Prediction of Cd and Pb toxicity to *Vibrio fischeri* using biotic ligand-based models in soil. *Journal of Hazardous Materials* 203, 69–76.
- Arrivabene H., Souza I., Có W., Conti M. Wunderlin D. y Milanez C. 2015. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. *Chemosphere* 127, 27-34.
- Barber J., Thomas G., Kerstiens G. y Jones K. 2004. Current issues and uncertainties in the measurement and modelling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs. *Environmental Pollution* 128, 99-138.
- Bartel D. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Baumberger N. y Baulcombe D.C. 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11928–11933.
- Becker S., Dailey L.A., Soukup J. M., Grambow S. C., Devlin R. B. y Huang Y. T. 2005. Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives* 113, 1032-1038.
- Birbaum K., Brogiolo R., Schellenberg M., Martinoia E., Stark W., Günther D. y Limbach L. 2010. No evidence for cerium dioxide nanoparticle translocation in maize plants. *Environmental Science and Technology* 44, 8718–23.
- Bonnet J., Wuyts P. y Rouze P.Y. 2004. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11511–11516.
- Brown P., Welch R. y Cary E. 1988. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology* 85, 801-803.
- Calderón G., Madeleine S. y Vollenweider P. 2013. Foliar symptoms triggered by ozone stress in irrigated holm oaks from the City of Madrid, Spain. *PLoS ONE* 8, e69171.
- Calderón-Segura E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Butterworth M. F. y Amador-Muñoz O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic

- properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutation Research* 558, 7–17.
- Carbonell A., Fahlgren N., Garcia-Ruiz H., Gilbert K.B., Montgomery T.A., Nguyen T., Cuperus J.T. y Carrington J.C. 2012. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 14,3613–3629.
- Carrasco S., Estebaranz M., Medel D., Millán R. y Hernández L. 2012. Influence of nitrate fertilization on Hg uptake and oxidative stress parameters in alfalfa plants cultivated in a Hg-polluted soil. *Environmental and Experimental Botany* 75, 16–24.
- Chamberlain A. 1983. Fallout of lead and uptake by crops. *Atmospheric Environment* 17, 693–706.
- Chekulaeva M. y Filipowicz W. 2009. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 452–460.
- Chen F., Gao J. y Zhou Q. 2012. Toxicity assessment of simulated urban runoff containing polycyclic musks and cadmium in *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. *Environmental Pollution* 162, 91–97.
- Circu M. y Aw T. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 749–762.
- CONAPO. 2012. Proyecciones de la población 2010-2050. Disponible en: http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones_Datos.
- Corpas F., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J. y Barroso J. 2011. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* 181, 604–611.
- Dietz K., Baier M. y Krämer U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants, in heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems, N. V. Prasad and J. Hagemeyer (Berlin: Springer-Verlag) 73-97.
- Doran J., Abbott S., Archuleta J., Bian X., Chow J., Coulter R., Wekker S., Edgerton S., Elliott S., Fernandez A., Fast D., Hubbe J., King C., Langley D., Leach J., Lee J., Martin T., Martinez D., Martinez J., Mercado G., Mora V., Mulhearn M., Pena J. Petty R., Porch W., Russell C., Salas R., Shannon J., Shaw W., Sosa G., Tellier L., Templeman B., Watson J., White R., Whiteman C. y Wolfe D. 1998. The IMADA-AVER boundary layer experiment in the Mexico City area. *American Meteorological Society* 79, 2497-2508.
- Edgerton S., Bian X., Doran J., Fast J., Hubbe J., Malone E., Shaw W., Whiteman C., Zhong S., Arriaga J., Ortiz E., Ruiz M., Sosa G., Vega E., Limon T., Guzman F., Archuleta J., Bossert J., Elliott S., Lee J., McNair L., Chow J., Watson J., Coulter R., Doskey P., Gaffney J., Marley N., Neff W. y Petty R. 1999. Particulate Air Pollution in Mexico City: A Collaborative Research Project. *Journal of the Air and Waste Management Association* 49, 1221-1229.
- Erofeeva E. 2014. Dependence of dandelion (*Taraxacum officinale* Wigg.) seed reproduction indices on intensity of motor traffic pollution. *Dose Response* 12, 540-50.
- Estevez M., Malanga G. y Puntarulo S. 2001. Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science* 161, 9-17.
- Fabian M., Sonenberg N. y Filipowicz W. 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 79, 351–379.

- Floris M., Mahgoub H., Lanet E., Robaglia C. y Menand B. 2009. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International Journal of Molecular Science* 10, 3168-85.
- Gajewska E., Sklodowska M., Slaba M. y Mazur J. 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biology Plant* 50, 653-659.
- Gajewska E. y SkLodowska M. 2010. Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 996-1003.
- Gier L. J. y Burrell, R. M. 1942. Anatomy of *Taraxacum officinale* 'Weber'. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 45: 94–97.
- Gjorgieva D., Kadifkova-Panovska T., Bačeva K. y Stafilov T. 2011. Assessment of heavy metal pollution in Republic of Macedonia using a plant assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 233-40.
- Grant W.F. 1988a. Higher plant assays for the detection of genotoxicity in air polluted environments. *Ecosystem Health* 4, 210-229.
- Grant W.F. 1994b. The present status of higher bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 310, 175-185.
- Grantz D., Garner J. y Johnson D. 2003. Ecological effects of particulate matter. *Environment International* 29, 213–39.
- Gupta P., Sharma R., Sharma R., Gupta K. y Sharma I. 2014. MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. *Plant Molecular Biology* 84, 1-18.
- Gutiérrez C., Roubicek D., Cebrián G., De Vizcaya R., Sordo C. y Ostrosky W. 2006. Effect of chemical composition on the induction DNA damage by airborne particulate matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47, 199-211.
- He J., Qin J., Long L., Ma Y., Li H., Li K., Jiang X., Liu T., Polle A. y Liang Z. 2011. Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus × canescens*. *Physiologia Plantarum* 143, 50–63.
- Huang T., Zhu M., Li X. y Zhao S. 2008. Discovery of porcine microRNAs and profiling from skeletal muscle tissues during development. *PLoS One* 3, e3225.
- Holm, L., Doll J., Holm E., Pancho J. y Herberger J. 1997. *World weeds: natural histories and distribution*. John Wiley and Sons, New York, NY. 1129 p.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. 1988. Vanadium. *Environmental Health Criteria*, World Health Organization, Ginebra, No. 81.
- Jagadeeswaran G., Saini A. y Sunkar R. 2009. Biotic and abiotic stress down regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Plant* 229, 1009–1014.
- Jaspers P. y Kangasjärvi J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* 138, 405–413.
- Johnston R. y Hobert O. 2003. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845–849.

- Jones-Rhoades M. y Bartel D. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14, 787–799.
- Jun Y., Tongbin C., Mei L., Xiaoyong Z., Qifei H., Chuang M., Runyao G. y Guanghui G. 2015. New isotopic evidence of lead contamination in wheat grain from atmospheric fallout. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Kapoor M., Arora R., Lama T., Nijhawan A., Khurana J.P., Tyagi A.K. y Kapoor S. 2008. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics* 14, 451.
- Karlowski W.M., Zieleszinski A., Carrere J., Pontier D., Lagrange T. y Cooke R. 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 14, 4231–4245.
- Kaur C., Vishnoi A., Ariyadasa T. U., Bhattacharva A., Singla-Pareek S. L. y Sopory S. K. 2013. Episodes of horizontal gene-transfer and gene-fusion led to co-existence of different metal ion specific glyoxalase I. *Scientific Reports*. 3076, 1-10.
- Khalil A. y Rinn J. 2011. tRNA-protein interactions in human health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 359-365.
- Kováčik J. Babula P., Klejdus B., Hedbavny J. 2014. Comparison of oxidative stress in four *Tillandsia* species exposed to cadmium. *Plant Physiology Biochemistry* 80:33-40.
- Kovalchuc I. y Bokyo A. 2008. Epigenetic control of stress response. *Environmental Molecular Mutagenesis* 49, 61-72.
- Krämer U., Smith R., Wenzel W., Raskin I. y Salt D. 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* hálácsy. *Plant Physiology* 115, 1641-1650.
- Kumar M., Bijo A., Baghel R., Reddy C. y Jha B. 2012. Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiology Biochemistry* 51, 129–138.
- Lagerkvist G., Nordberg G. y Vouk V. 1986. Handbook on the toxicology of metals. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, Vol. II, pp. 638-663.
- Levy J., Hammit J. y Spengler J. 1999. Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between- study variability. *Environ Health Perspectives* 108, 109-117.
- Little P. 1978. Deposition of exhaust lead and its impact on plants. Symposium “The impact of road traffic on plants”, supplementary report 1978, 49–54.
- Liu X., Hou F., Li G. y Sang N. 2015. Effects of nitrogen dioxide and its acid mist on reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity in *Arabidopsis* plants. *Journal Environmental Sciences* 34, 93-9.
- Madany I., Ali S. y Akhter M. 1990. Assessment of lead in roadside vegetation in Bahrain. *Environmental International* 16, 123–6.
- Maïna F., Hany M., Elodie L., Christophe R. y Benoît M. 2009. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3168-3185.

- Martínez P., Graña E., Reigosa M. y Sánchez M. 2012. The early response of *Arabidopsis thaliana* to cadmium and copper-induced stress. *Environmental and Experimental Botany* 78, 1–9.
- Mishra D. y Kar M. 1974. Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review* 40, 395-452.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. y Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Sciences* 9, 490–498.
- Molina, L. y Molina, M. (2005). La calidad del aire en la megaciudad de México. Un enfoque integral. México: Fondo de Cultura Económica. 463 p.
- Moller P., Folkmann J.K., Forchhammer L., Bräuner E.V., Danielsen P.H. y Risom L. 2008. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Letters* 266, 84-97.
- Morina F., Jovanovic L., Mojovic M., Vidovic M., Pankovic D. y Veljovic Jovanovic S. 2010. Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia Plantarum* 140, 209–224.
- Mustafiz A., Ghosh A., Tripathi A. K., Kaur C., Ganguly A. K. y Bhavesh N. S. 2014. A unique Ni²⁺-dependent and methylglyoxal-inducible rice glyoxalase I possesses a single active site and functions in abiotic stress response. *Plant Journal* 78, 951-963.
- Nair R., Varghese S., Nair B., Maekawa T., Yoshida Y. y Kumar D. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179, 154–63.
- Narváez-Porras O. y Cano-Valle F. 2004. Cenizas volcánicas contaminación ambiental. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 17, 232-238.
- Parker J.S. y Barford D. 2006. Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends in Biochemical Sciences* 14, 622–630.
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- Pfeiffer H. N. y Barclay E. 1992. The use of a single lichen species, *Hypogymnia physodes*, as an indicator of air quality in northwestern Ontario. *The Bryologist* 95, 38-41.
- Piotrowska N., Bajguz A., Zambrzycka E. y Godlewska Ż. 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology Biochemistry* 52, 52–65.
- Piraino F., Aina R., Palin L., Prato N., Sgorbati S., Santagostino A. y Citterio S. 2006. Air biomonitoring: assessment of air pollution genotoxicity in the Province of Novara (North Italy) by using *Trifolium repens* L. and molecular markers. *Science of the Total Environment* 372, 350-359.
- Opdenakker K., Remans T., Keunen E., Vangronsveld J. y Cuypers A. 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany* 83, 53–61.
- Pope A. y Douglas W. 2006. Health effects of fine particulate air pollution. *Lines that Connect. Air and Waste Management Association* 56, 709–742.

- Pourrut B., Pohn A., Pruvot C., Garçon G., Verdin A., Waterlot C., Bidar G., Shirali P. y Douay F. 2011. Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8 year field trial Part 2. Influence on plants. *Science of the Total Environment* 409, 4504–4510.
- Quintana R., Serrano J., Gómez V., de Foy B., Miranda J., Garcia-Cuellar C., Vega E., Vázquez-López I., Molina L.T., Manzano-León N., Rosas I. y Osornio-Vargas A.R. 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.
- Rao M. y Dubey P. 1992. Occurrence of heavy metals in air and their accumulation by tropical plants growing around an industrial area. *Science of the Total Environment* 126, 1-16.
- Rascio N. y Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180, 169–181.
- Calderón de Rzedowski, G. y Rzedowski J. 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- Risom L., Møller P. y Loft S. 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research* 592, 119-137.
- Rosas-Pérez I., Serrano J., Alfaro-Moreno E., Baumgardner D., García-Cuellar C., Martín Del Campo J.M., Raga G.B., Castillejos M., Colín R.D. y Osornio-Vargas A.R. 2007. Relations between PM₁₀ composition and cell toxicity: a multivariate and graphical approach. *Chemosphere* 67, 1218-28.
- Roger D., Peng R.D., Dominici F., Pastor-Barriuso R., Zeger S.L. y Samet J.M. 2005. Seasonal analyses of air pollution and mortality in 100 US cities. *American Journal Epidemiology* 161, 585-594.
- Rubio M., Escrig I., Martínez C., López B. y Sanz A. 1994. Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regulation* 14, 151-157.
- Ryan B.M., Robles I.A. y Curtis C. 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews Cancer* 10, 389-402.
- Sánchez-Parra B., Figueiras A. M., Abd El-Moneim D., Contreras R., Rouco R., Gallego F. J. y Benito C. 2014. The role of two superoxide dismutase mRNAs in rye aluminium tolerance. *Plant Biology* 17, 694-702.
- Sarma H., Deka S., Deka H. y Saikia R. 2011. Accumulation of heavy metals in selected medicinal plants. *Reviews Environmental Contamination Toxicology* 214, 63–86.
- Schreck E., Foucault Y., Geret F., Pradere P. y Dumat C. 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. *Chemosphere* 85, 1562-1555.
- Schreck E., Foucault Y., Sarret G., Sobanska S., Cécillon L., Castrec-Rouelle M., Uzu G. y Dumat C. 2012. Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: mechanisms involved for lead. *Science of the Total Environment* 427, 253–262.

- SEDEMA-GDF (Secretaría de Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal). 2013. Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero de la Zona Metropolitana del Valle de México 2012. Disponible en: <http://www.aire.df.gob.mx/default.php?opc=Z6Bhnml=&dc=Zg==>.
- SEDESOL, INEGI y CONAPO. 2012. Delimitación de las zonas metropolitanas en México 2010. México. 216 pp. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/Sistemas/multiarchivos/doc/702825003884/DZM20101.pdf>.
- Sirhindi G., Mir M.A., Abd-Allah E.F., Ahmad P. y Gucl S. 2016. Jasmonic acid modulates physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in glycine max under nickel toxicity. *Plant Science* 7, 1-12.
- Shannon J. D., Shaw W. J., Sosa G., Tellier L., Templeman B., Watson J. G., White R., Whiteman C. D. y Wolfe D. 1998. The IMADA-AVER boundary layer experiment in the Mexico City area. *Bulletin of the American Meteorological Society* 79, 2497–2508.
- Shengben L., Lin L., Xiaohong Z., Yu Y., Xigang L., Xia C., Lijuan J., Zhiqiang P., Xiaofeng C., Beixin M., Fuchun Z., Natasha R., Liwen J. y Xuemei C. 2013. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* 153, 562–574.
- Sheoran I. y Singh R. 1993. Effect of heavy metals on photosynthesis in higher plants. pp. 451-468.
- Sloof J.E. 1993. Environment lichenology: biomonitoring trace-element air pollution Thesis Delft University of Technology.
- Spósito J., Crispim B., Mussury R. y Grisolia A. 2015. Genetic instability in plants associated with vehicular traffic and climatic variables. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120, 445-8.
- Sun L., Zhang Y., He L., Chen Z., Wang Q., Qian M. y Sheng X. 2010a. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology* 101, 501–509.
- Sun Q., Hong X. y Wold L. 2010b. Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure. *Circulation* 121, 2755-2765.
- Sunkar R. y Zhu J.-K. 2004a. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2001-2019.
- Sunkar R., Kapoor A. y Zhu JK. 2006b. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18, 2051–2065.
- Swanson S. y Gilroy S. 2010. ROS in plant development. *Physiologia Plantarum* 138, 384–392.
- Tzintzun-Cervantes G., Rojas-Bracho L. y Fernández-Bremauntz A. 2005. Las partículas suspendidas en tres grandes ciudades mexicanas. *Gaceta Ecológica* 74, 29-44.
- Tiwari S., Agrawal M. y Marshall F. 2006. Evaluation of ambient air pollution impact on carrot plants at a suburban site using open top chambers. *Environmental Monitoring and Assessment* 119, 15-30.

- Tolia N.H. y Joshua-Tor L. 2007. Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology* 14, 36–43.
- Uren N. 1992. Forms, reactions, and availability of nickel in soils. *Advances in Agronomy* 48, 141-203.
- Voinnet O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136, 669-687.
- Ward NI. 1990. Lead contamination of the London orbital (M25) motorway (since it's opening in 1986). *Science of the Total Environment* 93, 277–84.
- Whiteside J., Box C., McMillan T. y Allinson S. 2010. Cadmium and copper inhibit both DNA repair activities of polynucleotide kinase. *DNA Repair* 9, 83–89.
- Yamasaki H., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Kobayashi Y., Shikanai T. y Pilon M. 2007a. Regulation of copper homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 16369–16378.
- Yamasaki H., Hayashi M., Fukazawa M., Kobayashi Y. y Shikanai T. 2009b. SQUAMOSA promoter binding protein-like 7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 347–361.
- Yin Z.J. y Shen F.F. 2010. Identification and characterization of conserved microRNAs and their target genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Genetics and Molecular Research* 22, 1186-96.
- Zhang B. y Pan X. 2009. RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver, *Environmental Health Perspectives* 117, 231–240.
- Zhou Z., Huang S. y Yang Z. 2008. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374, 538–542.
- ZongBo Qiu., BenZhai Hai., JunLi Guo., YongFang Li., Liang Zhang. 2016. Characterization of wheat miRNAs and their target genes responsive to cadmium stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 101, 60-67.