



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO OCASIONADO POR COMPUESTOS
ORGÁNICOS EXTRAÍDOS DE PM 2.5 DE TRES SITIOS DE LA ZONA METROPOLITANA DEL
VALLE DE MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JAVIER ANCONA TORRES

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. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA, FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA, UAT.

CD. MX. ENERO, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Cubierta



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO OCASIONADO POR COMPUESTOS
ORGÁNICOS EXTRAÍDOS DE PM 2.5 DE TRES SITIOS DE LA ZONA METROPOLITANA DEL
VALLE DE MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JAVIER ANCONA TORRES

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. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA, FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA, UAT.

MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019.

OFICIO CPCB/052/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de noviembre de 2018, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ANCONA TORRES JAVIER** con número de cuenta **309043126** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO OCASIONADO POR COMPUESTOS ORGÁNICOS EXTRAÍDOS DE PM 2.5 DE TRES SITIOS DE LA ZONA METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO"**, realizada bajo la dirección de la DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO:

- Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
- Vocal: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
- Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
- Suplente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
- 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 enero de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de mi preparación profesional durante mis estudios de maestría.

Al programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización del presente trabajo (CVU: 774577).

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

A los integrantes del comité tutorial:

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por el apoyo incondicional, infinitas gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo así como abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana por sus aportaciones al presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Zel, muchas gracias por apoyarme en el laboratorio y fuera de él, por siempre estar en los momentos donde no daba más, por darme claridad cuando se estaba terminando y por mis notas que eran el impulso en cada día de experimento largo, infinitas gracias! ¡TE AMO!

A mi madre, por el apoyo incondicional y fundamental durante mi tiempo en el laboratorio y más aún cuando se terminó, infinitas gracias por todo y por ayudarme a terminar esta tesis. A mis tíos por el apoyo incondicional y por ser un ejemplo toda la vida. ¡Gracias ma, gracias Andrés, gracias Cesar, gracias Ulises!.

A la maestra Ana Rosa Flores Márquez por el apoyo técnico en éste trabajo, sin usted no hubiera podido realizarse de la manera que se hizo, muchas gracias por todas sus enseñanzas, por siempre estar al pie del cañón conmigo y el proyecto, por no rendirse cuando todo parecía que no salía, muchas gracias por todo lo que me brindo estos dos años y sobre todo por ayudarme a crecer en mi formación dentro de la investigación.

A la Dra. Sandra, muchas gracias por creer en mí y abrirme las puertas de su laboratorio, por siempre estar en los momentos más importantes en el desarrollo del proyecto y por orientarme siempre.

A mis amigas del laboratorio, Pao, Cynth, Adri, Zel y Denisse muchas gracias por todas las risas, por las “reuniones”, por las vacaciones, por todas las salidas, sencillamente son las mejores.

A Vicky, por siempre brindarme tu amistad y por en cada momento tener las palabras adecuadas de aliento y apoyo, por todas las veces que me ayudaste cuando algo me hacía falta, ¡Mil gracias Vicky!

A la Q. Alejandra Diosdado Hernandez por su invaluable apoyo en la parte química del proyecto, por seguir brindando su apoyo aun cuando se complicaban los horarios, infinitas gracias por todo!

Al Dr. Omar por proporcionarme las muestras para realizar el proyecto y por siempre ayudarme cuando necesitaba preparar algo o tenía alguna duda sobre el trabajo.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Contaminación atmosférica.....	1
1.1.2. Contaminación en la Ciudad de México.....	1
1.2. Partículas suspendidas: composición y efectos sobre la salud.....	2
1.3. Partículas suspendidas y compuestos orgánicos.....	4
1.3.1. Compuestos orgánicos y genotoxicidad.....	5
1.4. Pruebas para detectar genotoxicidad.....	7
1.4.1. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) pH>13.....	7
1.5. Antecedentes.....	8
2. Justificación.....	9
3. Hipótesis.....	9
4. Objetivos.....	9
4.1. Objetivo General.....	9
4.2. Objetivos Particulares.....	10
5. Método.....	10
5.1. Área de estudio.....	10
5.1.1. Sitios de colecta.....	10
5.1.1.1. Tlalnepantla.....	10
5.1.1.2. La Merced.....	10
5.1.1.3. Coyoacán.....	11
5.1.2. Temporadas estacionales de colecta.....	11
5.2. Extracción de la materia orgánica.....	11
5.3. Trabajo de Laboratorio.....	12
5.3.1. Grupos experimentales.....	12
5.3.2. Aislamiento de linfocitos.....	12
5.3.3. Viabilidad celular.....	12
5.3.4. Conteo celular.....	13
5.3.5. Testigos de efecto genotóxico.....	13
5.3.6. Fracción microsómica S9 de hígado de rata.....	13
5.3.7. Exposición celular.....	14
5.3.8. Electroforesis unicelular alcalina.....	15
5.4. Análisis estadístico.....	16
6. Resultados.....	16
6.1. Daño genético de temporadas por estación.....	16
6.1.1. Tlalnepantla.....	16
6.1.2. La Merced.....	18
6.1.3. Coyoacán.....	19
6.2. Daño genético de estaciones por temporada.....	21
6.2.1. Noviembre (secas frías).....	21
6.2.2. Marzo (secas cálidas).....	23
6.2.3. Julio (lluvias).....	25
7. Discusión.....	27
8. Conclusión y comentarios.....	30
9. Perspectivas.....	32
10. Referencia.....	32

Resumen

Los compuestos orgánicos asociados con las partículas suspendidas del aerosol atmosférico y que son medidas en la materia orgánica extraíble (MOE), incluyen una gran variedad de sustancias entre las que es posible destacar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que han sido ampliamente estudiados debido al potencial mutagénico y carcinogénico que poseen. El daño al material genético representa la primera etapa involucrada en la mutagénesis, en la carcinogénesis y en el envejecimiento, dichas alteraciones se pueden evidenciar en forma de aductos, rompimientos de cadena sencilla, modificación de bases nitrogenadas, formación de sitios apúricos y apirimídicos (sitios AP), entrecruzamientos DNA-proteínas y sitios álcali-lábiles.

Con el fin de evaluar el riesgo por exposición a los contaminantes presentes en el material particulado, es necesario contar con muestras lo más integrales posibles. La complejidad debida a la cantidad y a la variedad de especies químicas que las componen ha llevado a determinar los efectos producidos por la muestra total y la variación de ésta dependiendo del lugar de origen y la época en la que fue colectada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico de la mezcla completa de material orgánico extraído del aerosol atmosférico y compararlo entre diferentes localidades con actividades comerciales distintas para verificar la relación que existe entre el tipo de partículas que se emiten y el daño al DNA. Para esto se probó la MOE colectada de 3 zonas del área metropolitana de la Ciudad de México (Tlalnepantla, La Merced y Coyoacán) en la época de secas frías (noviembre), secas cálidas (marzo) y lluvias (julio). Se expusieron linfocitos aislados de sangre completa a 4 diferentes concentraciones de dichas muestras, las cuales fueron 20, 40, 60 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un tiempo de tratamiento de 4 horas en presencia y ausencia de la fracción enzimática S9 de hígado de rata con el fin de llevar a cabo el metabolismo de compuestos que lo requieran para generar efectos adversos al organismo y así poder evaluar tanto compuestos de acción directa como indirecta de la misma muestra. Se realizó la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa para detectar migración de fragmentos de DNA por célula, se analizaron 100 cometas por cada laminilla, se realizaron por duplicado en cada grupo experimental, el momento de la cauda se tomó como valor representativo del daño al DNA. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Dunn para evaluar las diferencias entre cada tratamiento.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, en el caso del daño genético de cada sitio por temporada en noviembre (secas frías) se observó diferencia entre todas las concentraciones del grupo con S9 y en el que carecía de ella en Tlalnepantla y Coyoacán, para el caso de La Merced 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no fue diferente entre ambos grupos. Los valores más altos de momento de cauda en ausencia de fracción enzimática en la concentración más alta se observaron en Coyoacán, para el caso del grupo en presencia de S9 la mayor cantidad de daño se presentó en La Merced para las 4 concentraciones. En marzo (secas cálidas) únicamente en las muestras de Tlalnepantla se notó diferencia entre el grupo con S9 y sin ella en todas las concentraciones utilizadas de MOE. Los valores más elevados de momento de cauda se manifestaron en las muestras de Tlalnepantla y la Merced en 60 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el grupo expuesto sin fracción enzimática, los más altos en el grupo con presencia de S9 no mostraron diferencia entre las 3 estaciones. En julio (lluvias) con las muestras de Tlalnepantla, La Merced y Coyoacán se presentó diferencia entre el grupo de linfocitos expuesto con S9 y en ausencia de ésta. El momento de cauda más elevado en los grupos sin fracción enzimática se evidenció en Tlalnepantla, para los grupos con S9 en la Merced se mostró el momento de cauda más elevado en casi todas las concentraciones, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lo compartió con Coyoacán.

En el caso del daño genético de temporada por estación, en Tlalnepantla los tratamientos con la MOE de esta estación demostraron que tanto en noviembre como en marzo hubo diferencia entre los grupos con S9 y sin ella en todas las concentraciones, en julio solo se apreció esto en 60 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los valores más altos en los grupos que se expusieron con fracción enzimática no presentó diferencias entre las 3 temporadas, para el caso de los grupos que contaron con la presencia de S9, la mayor cantidad de daño se apreció en noviembre y en marzo. En las muestras de La Merced se presentaron diferencia

entre el grupo con S9 y el que carecía de ella en casi todas las concentraciones en noviembre, marzo y julio. Los valores más altos de momento de cauda se manifestaron en noviembre y marzo en 80 $\mu\text{g/mL}$, esto en el caso de los grupos que no tuvieron fracción enzimática, en los que si hubo ocurrió en 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$ en noviembre. En Coyoacán los tratamientos con las muestras correspondientes a noviembre presentaron diferencia entre el grupo en presencia de S9 y en ausencia de ella en todas las concentraciones de MOE, en marzo solo en 80 $\mu\text{g/mL}$ y en julio a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$. El momento de cauda más alto, en los grupos sin fracción enzimática, se observó en noviembre en casi todas las concentraciones, en presencia de dicha fracción no se observó diferencia significativa entre las 3 temporadas.

Estos resultados muestran que existen diferencias en los niveles de daño al DNA en linfocitos expuestos a MOE en presencia y ausencia de S9 entre las temporadas y los sitios. Este comportamiento refleja que la respuesta de los linfocitos a la MOE se debe a la composición de la misma, la cual varía en los diferentes sitios debido a las fuentes de emisión de contaminantes. En los grupos con mayor daño en ausencia de S9 podría deberse a que predominan los compuestos de acción directa y donde hubo la mayor respuesta con fracción enzimática es reflejo de la presencia y abundancia de compuestos que requieren activación metabólica para generar efectos adversos.

En cuanto a las temporadas la mayor cantidad de daño se observó en temporada de secas frías lo cual se puede deber a diversos factores, siendo la inversión térmica uno de los principales y en el caso de los valores elevados observados en secas cálidas es posible explicarlo por la oxidación de compuestos debido al incremento de las temperaturas en esta temporada, el decremento en lluvias se puede deber a que factores ambientales como el viento y la humedad que se ven incrementados ayudan a que se eliminen los compuestos que son emitidos y pueden generar diversas afectaciones en el organismo.

Es posible concluir que si bien el tipo de emisiones de cada sitio varía y tiene relevancia para la generación de daño al DNA, son las condiciones ambientales las que ejercen un papel muy importante en el potencial genotóxico de los compuestos orgánicos emitidos a la atmósfera, éstas pueden afectarlo para volverlos más reactivos o facilitar la interacción de los mismos para generar nuevos compuestos con mayores posibilidades de generar efecto adverso.

Abstract

The organic compounds associated with the particle matter within the atmospheric aerosol can be measured through the organic extracted matter (OEM), includes a wide range of compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), which have been widely investigated due to their mutagenic and carcinogenic potential. Damage to the genetic material is the first step involved in mutagenicity, carcinogenicity and aging, these alterations can be shown in various forms like adducts, single strand breaks, nitrogenous base modification, formation of apurinic and apyrimidic sites (AP sites), DNA-protein exchange and alkali-labile sites.

In order to assess the exposure risk to contaminants present in the particulate matter it is necessary to have integrated samples. The complexity due the amount and variety of chemical species that compose them lead to determine the effects produced by the complete mixture and his variation that occurred through seasons and sites where it was collected.

The objective of this study was to evaluate the genotoxic effect of the complete mixture of organic extracted matter from atmospheric aerosol and to compare it between various sites with different commercial activities to verify the relation between the type of particle that are emitted and the DNA damage. The OEM was collected from three sites of the metropolitan area of Mexico City (Tlalnepantla, La Merced and Coyoacán) in cold dry (November), hot dry (March) and rainy season (July). Isolated lymphocytes were exposed to 4 different concentration of these samples, 20, 40, 60 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, during four hours in the presence and absence of the enzymatic fraction S9 from rat liver to carry out the metabolism of compounds who require it to generate negative effects on the organism and to evaluate both direct and indirect compounds of the same sample. Alkaline electrophoresis was performed to detect DNA fragments migration, 100 cells were assessed per slide, each experimental group had his duplicate, tail moment was took as representative value for DNA damage. The results were statistically analyzed with Kruskal-Wallis test and Dunn *post hoc* to evaluate differences between each treatment.

The results obtained were as follow, for the genetic damage in each site by season in November (cold dry) differences between every concentration was observed in the group with S9, without it in Tlalnepantla and Coyoacán, in the case of la Merced 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was not different in both groups. The highest values of tail moment without S9 in the highest concentration were observed in Coyoacán, with the enzymatic fraction la Merced presented this value in the four concentrations. In March (hot dry) only Tlalnepantla shows difference between the group with and without S9 in all the OEM concentrations. The highest values of tail moment were evidenced in Tlalnepantla and La Merced in 60 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in absence of S9, when it was present no difference were show between the 3 sites. July (rainy) shows difference between all the sites in the groups with and without S9. The maximum tail moment was shown in Tlalnepantla in absence of the enzymatic fraction, in presence of this La Merced and Coyoacán show the highest value in 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

For the genetic damage by season in each site, Tlalnepantla shows differences between treatments with and without S9 in November and March, July only shows this behavior in 60 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The highest values in the groups exposed with S9 were not different between the 3 seasons, in the opposite case the maximum values were observed November and march. La Merced shows difference between the groups with and without S9 in almost every concentration of OEM in November, March and July.

The maximum values of tail moment in absence of S9 were observed in November and March at the concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, when it was present this occurred in 60 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in November. The Coyoacán samples that correspond to November presented differences between groups with and without S9 in every concentration of OEM, in March only at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and July from 40 to 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The highest tail moment without enzymatic fraction occurred in November in almost all concentration, with S9 there was no difference between the 3 seasons.

These results showed the differences between DNA damage levels in lymphocytes exposed to OEM in the presences and absence of S9 between seasons and sites of collect. This behavior reflects that the

lymphocytes respond to OEM depending on the composition of the samples which varies through the different sites due to the emission sources in each one of them. The effect on the groups with the highest levels of damage without S9 fraction could depend on the predominance of compounds that cause damage directly while those groups that presented high levels of DNA damage in presence of the enzymatic fraction could be the reflection of the compounds that requires metabolic activation to fulfill their genotoxic potential.

As for the seasons, the maximum values of tail moment were observed on dry cold which could be due to various factors that influence the composition being thermal inversion one of the most important, the damage observed in warm cold could be explain by the oxidation of compounds because of the increase of temperature in this season, the decrease of the DNA damage observed in rain season may be due to ambient factors like wind and humidity which help clean the air and get ride off the compounds that may generate adverse effects to the organism.

It is possible to conclude that although the type of emissions of each site varies and has relevance for the generation of damage to DNA, it is the environmental conditions that exert a very important role in the genotoxic potential of the organic compounds emitted to the Atmosphere, because they can affect it to make them more reactive or facilitate the interaction of them to generate new compounds with greater chances of generating adverse effect.

1. Introducción

1.1. Contaminación atmosférica

Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia de origen químico o biológico que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales. Dichos contaminantes atmosféricos pueden ser de origen natural, tales como los productos de la erosión y de los incendios forestales o antropogénico. Estos últimos se han incrementado rápidamente debido a la industrialización y la urbanización (Mayer 1999, Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2004, INECC 2012).

Los contaminantes atmosféricos se clasifican por su origen en:

- **Primarios:** se encuentran en la atmósfera tal y como fueron emitidos por procesos naturales o por actividades del ser humano, por ejemplo: plomo, monóxido de carbono, óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno, hidrocarburos y partículas suspendidas (Vallejo *et al.* 2003, INECC 2012).
- **Secundarios:** son originados en la atmósfera por la interacción química o fotoquímica entre dos o más contaminantes primarios, por ejemplo: ozono, sulfatos y nitratos (Vallejo *et al.* 2003).

1.1.2. Contaminación en la Ciudad de México

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) comprende las 16 alcaldías de la Ciudad de México, 59 municipios del Estado de México y uno de Hidalgo (OECD 2015). La ZMVM es una megaciudad, es decir, un área metropolitana con más de 10 millones de habitantes y es considerada una de las ciudades más contaminadas de México y del mundo (Molina y Molina 2004). Debido al acelerado crecimiento de la población y, por tanto, de los servicios, existe una enorme demanda de energía y de transporte lo que ha generado importantes consecuencias en la atmósfera (Roubicek *et al.* 2007). El inventario de emisiones de la ZMVM reporta que las emisiones anuales de contaminantes son mayores a los 3 millones de toneladas, de los cuales 2.7 millones provienen de los vehículos, 35 000 de las industrias y servicios y el restante de otras fuentes como suelos y vegetación (Rivero-Rosas *et al.* 1997, Amador-Muñoz *et al.* 2001, Molina y Molina 2006). Con el fin de medir la calidad del aire y contribuir al bienestar de la población, se han identificado ciertos

contaminantes como altamente nocivos para la salud de los seres humanos y se les ha denominado “contaminantes criterio” que incluyen a los compuestos orgánicos volátiles, el monóxido de carbono, los óxidos de azufre, los óxidos de nitrógeno, el ozono y a las partículas suspendidas (PM₁₀ y PM_{2.5}) (SMA 2010, INECC 2012).

1.2. Partículas suspendidas: composición y efectos sobre a la salud

Las partículas suspendidas (PS) son una mezcla compleja de sólidos y líquidos que se pueden formar de compuestos orgánicos, metales o de partículas de suelo y polvo. Generalmente, están constituidas de un núcleo de carbón inerte cubierto por moléculas contaminantes que se adsorben a su superficie, entre los que se encuentran metales, sales, compuestos de azufre, pequeños componentes orgánicos y materiales traza (Roubicek *et al.* 2007). Estas partículas actúan como vehículos de otras sustancias tóxicas que se adosan a su superficie e incluyen sustancias como compuestos orgánicos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos, sulfatos, nitritos y determinados metales pesados (Machado *et al.* 2008).

- Partículas burdas con un diámetro aerodinámico menor a 10 µm (PM₁₀) pueden entrar directamente al aparato respiratorio y depositarse en diferentes regiones. Éstas provienen principalmente de la suspensión o resuspensión de polvo, suelo u otros materiales que surgen del pavimento, minas, volcanes, entre otros (Vallejo *et al.* 2003, Pope III y Dockery 2006).
- Partículas finas con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm (PM_{2.5}), permanecen más tiempo en el aire y se transportan a mayores distancias que las PM₁₀, debido a esto tienen más impacto en la salud, ya que estas partículas pueden penetrar hasta los alveolos pulmonares en donde se depositan. Son originadas por las fuentes móviles, particularmente las que usan diésel (Vallejo *et al.* 2003, SMA 2010, INECC 2012).
- Partículas ultrafinas son aquellas que tienen un diámetro aerodinámico menor a 1 µm, están compuestas por los productos de quemas agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diésel. Sin embargo, permanecen aisladas en la atmósfera durante periodos de tiempo corto ya que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (Vallejo *et al.* 2003, INECC 2012).

El efecto sobre la salud de las PS depende de su tamaño y composición química. Las partículas con diámetro mayor a 10 μm tienen una vida media en suspensión relativamente baja y son filtrados fácilmente por la nariz, conforme disminuye el tamaño de estas partículas tienen una mayor probabilidad de penetrar hasta los alveolos y llegar a la circulación para distribuirse a lo largo de todo el organismo. En cuanto al origen, estas partículas pueden provenir de diferentes fuentes. Las burdas (PM 10) se generan naturalmente del suelo, las finas (PM 2.5) se derivan principalmente de los procesos de combustión e incluyen compuestos orgánicos secundarios, así como orgánicos volátiles, debido a esto dichas partículas son las más abundantes en zonas urbanas debido a la alta combustión (Pope III y Dockery 2006).

La Organización Mundial de la Salud estima que las concentraciones de PM 2.5 contribuyen aproximadamente con 800 000 muertes prematuras por año posicionando a las PM en el lugar décimo tercero de causas de mortandad a nivel mundial (WHO 2005). Se ha descrito que las PS generan efectos adversos a la salud, entre éstos se han asociado problemas respiratorios, cambios en el ritmo cardíaco, así como severas alteraciones pulmonares y de corazón que conllevan a la muerte (Thurston *et al.* 1994, Schwartz *et al.* 1996, Pope 2000, Davidson *et al.* 2007). Además, se observa mayor impacto sobre grupos vulnerables como lo son la población infantil y los adultos mayores. En los niños menores de un año se afecta el desarrollo pulmonar y en los adultos mayores se asocia con el aumento de muertes por enfermedades respiratorias, complicaciones cardiovasculares y cáncer de pulmón (WHO 2005, González-Villalba *et al.* 2006, Gutiérrez-Castillo *et al.* 2006, Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009). Las PS pueden contribuir a enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares mediante inflamación sistémica, activación directa o indirecta de la coagulación y translocación directa a circulación sistémica (Anderson *et al.* 2012).

Según la Organización Panamericana de la Salud, los efectos de la contaminación se asocian primordialmente con los provenientes de la quema de combustibles fósiles, es decir, las fuentes móviles son las principales responsables y por lo tanto del deterioro de la calidad del aire, lo cual está estrechamente relacionado con el incremento y la antigüedad de los vehículos y la calidad de los combustibles. En la ZMVM este problema se ha agravado por las condiciones climáticas y topográficas (Ferrer-Carbonell y Escalante Semerena 2009).

1.3. Partículas suspendidas y compuestos orgánicos

La composición química de las PS varía ampliamente y depende de diversos factores, tales como, fuentes de combustión, clima, temporada y el tipo de contaminantes urbanos o industriales que se emiten. Los principales componentes del material particulado son compuestos orgánicos adsorbidos a otras partículas, los cuales pueden ser especies orgánicas volátiles o semivolátiles como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), nitro-HAPs, metales de transición, iones, gases reactivos, materiales de origen biológico y minerales (de Kok *et al.* 2006, Valavanidis *et al.* 2008).

La fracción de PM 10 consta de diversos materiales, sal marina y factores biológicos como polen y bacterias, y son generados por procesos mecánicos a diferencia de las PM 2.5 cuya principal vía de generación son los procesos de combustión y que constan principalmente de metales, especies orgánicas y partículas secundarias (Squadrito *et al.* 2001).

Los mecanismos de formación del aerosol orgánico secundario son complejos y los tipos de productos que se generan dependen de diversas condiciones de combustión, así como de las peculiaridades atmosféricas y meteorológicas (Lim y Ziemann 2009). Las partículas más pequeñas tienden a ser las formadas por procesos de combustión o de conversión gas-partícula lo que resulta en la composición compleja del material particulado e incluyen generalmente sulfatos, nitratos y compuestos orgánicos, particularmente polares oxidados (Finlayson-Pitts y Pitts 1997). Éstos, dependiendo de su naturaleza, pueden tener efectos en la salud de manera directa o indirecta.

Los compuestos de acción directa son los que al ser emitidos ya poseen la reactividad necesaria para interactuar con su blanco y por tanto generar efectos adversos al organismo. Se han identificado varios nitro-HAPs, como 1-nitropireno, 3-nitrofluoranteno y varios di-nitropirenos que tienen un potencial mutagénico directo muy fuerte (IARC 1989). Diversos compuestos con estas características como mono y di-nitro-HAPs se han identificado en extracto de partículas generadas de combustión primaria colectada de hollín de diésel, escapes de automóviles, ceniza de carbón, humo de madera y aire de ambientes contaminados (Westerholm y Egeback 1994, Finlayson-Pitts y Pitts 1997).

Por otro lado, los compuestos de acción indirecta requieren activación metabólica para volverse electrofilicos y así ejercer sus potencial carcinogénico. Entre los principales agentes de esta clase que se encuentran como contaminantes en el aerosol atmosférico están los HAPs como el benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(a)pireno (Amador-Muñoz 2001, de Kok *et al.* 2006).

Los compuestos orgánicos presentes en el material particulado se pueden estudiar mediante la separación de dicha fracción utilizando una serie de disolventes orgánicos para así asegurar la mayor cantidad de compuestos, a ésta se le conoce como materia orgánica extraída (MOE). Keane *et al.* (1991) demostraron que dicha fracción genera una respuesta mutagénica tanto de compuestos de acción directa como indirecta.

1.3.1. Compuestos orgánicos y genotoxicidad

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales el material particulado genera efectos adversos a la salud, el más importante es el estrés oxidante a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Schnelle-Kreis *et al.* 2001) que dan inicio a la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Ávila-Costa *et al.* 2004). Los radicales libres presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, lo que le da una configuración inestable. Estos radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies generadas en los sistemas biológicos. Las ROS son agentes tóxicos y generadores de patologías debido a que constituyen un mecanismo molecular de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales des-ionizantes. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes causa efectos tóxicos y la producción de radicales libres es un fenómeno implicado en el envejecimiento y en la carcinogénesis (Avello y Suwalsky 2006, Valko *et al.* 2006, Mayor-Oxilia 2010).

Los radicales libres causan distintos tipos de daño al DNA. Pueden formar aductos, rompimientos de cadena sencilla, modificación de bases nitrogenadas, formación de sitios apúricos y apirimídínicos (sitios AP), entrecruzamientos DNA-proteínas, sitios sensibles al álcali y con menor frecuencia, ruptura de cadena doble. Los efectos genotóxicos pueden ser provocados por la interacción directa de los xenobióticos con el material genético o de manera secundaria por el estrés oxidante (Risom *et al.* 2005, Metha *et al.* 2008, Manke *et al.* 2013).

Se ha desarrollado un modelo de 3 pasos para explicar el proceso por el cual el estrés oxidante genera daño celular y subsecuentemente efectos adversos a la salud. En la primera fase, diversos factores de transcripción (como el factor nuclear eritroide-2, Nrf2) inducen diversas enzimas antioxidantes, tales como la catalasa y la superóxido dismutasa, las cuales aminoran la presencia de ROS y así evitan que se lleve a una respuesta desfavorable al organismo (Li *et al.* 2003, Cho *et al.* 2010). En la segunda fase, si la respuesta antioxidante falla o no es suficiente para solventar los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno resulta en una situación proinflamatoria, mediada por MAP-cinasas y cascadas de señalización de NF- κ B que son responsables de la expresión de citocinas y quimosinas (Chan y Kan 1999, Xia *et al.* 2006). La tercera fase ocurre cuando los niveles de estrés oxidante son altos y los mecanismos antioxidantes se han visto rebasados, en este caso se involucra la mitocondria que libera factores que inducen apoptosis (Hiura *et al.* 2000, Valavanidis *et al.* 2008).

Diversos estudios han demostrado que el potencial oxidante de las partículas finas y ultrafinas es resultado de la gran cantidad de compuestos orgánicos presentes, tales como, quinonas y HAPs. El potencial carcinogénico de las quinonas es consecuencia de la formación de ROS mediante reacciones redox y la inclusión de iones metálicos y NADPH (Qui y Cadenas 1997, Hirakawa *et al.* 2002). Por otro lado, las principales vías de activación metabólica de los HAPs son: generación de dioles epoxídicos catalizados por el citocromo p450 lo que lleva a la formación de aductos, producción de radicales cationes catalizados por peroxidasas del citocromo y constitución de quinonas redox-activas catalizadas por dihidrodiol deshidrogenasas, lo cual contribuye a la carcinogénesis causada por los HAPs (Danissenko *et al.* 1996, Ohnishi y Kawanishi 2002).

Estudios recientes muestran que las partículas de diésel de escapes generan radicales libres de oxígeno, aniones superóxido y otras especies de oxígeno lo cual causa peroxidación lipídica, así como lesiones al DNA. El daño al material genético representa la primera etapa involucrada en la mutagénesis, en la carcinogénesis y en el envejecimiento (Risom *et al.*, 2005, Mayor-Oxilia 2010, Manke *et al.* 2013).

1.4. Pruebas para detectar genotoxicidad

Los seres humanos están expuestos a una amplia variedad de agentes que son potencialmente peligrosos para el DNA. Existen diferentes técnicas para detectar el daño al material genético, entre ellas se encuentran:

- Ensayo de micronúcleos: detecta la pérdida de material genético debido a procesos aneugénicos o clastogénicos (Fenech 2000).
- Ensayo cometa: es una prueba dependiente de pH en donde el DNA es desnaturalizado y sometido a electroforesis para analizar el daño primario sobre el material genético, identificado como rompimientos en las hebras de DNA (Tice *et al.* 2000).

1.4.1. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa pH>13)

Entre las pruebas más utilizadas para detectar actividad genotóxica se encuentra la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa. Esta técnica ha sido propuesta como un método sensible para la detección de daño y reparación del DNA (Altamirano-Lozano *et al.* 1996, Tice *et al.* 2000, Mussali-Galante *et al.* 2005).

Entre las ventajas de este ensayo se encuentran: la aplicación en una gran variedad de células eucariontes, la alta sensibilidad para detectar bajos niveles de daño (de 50 a 15 000 rompimientos por célula), la poca cantidad de muestra que requiere (de 10 000 a 50 000 células), es poco invasiva si se trabaja con sangre periférica, se puede aplicar en muestras frescas o congeladas, además es de fácil y rápida realización (Tice *et al.* 2000).

Este método consiste en embeber células en geles de agarosa, lisarlas en una solución rica en sales y detergentes, posteriormente el DNA expuesto es sometido a electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH>13), éste se neutraliza, se fija con etanol absoluto y por último se fluorocromiza con fluorocromos. La apariencia final asemeja un cometa: la cabeza, que está formada por DNA intacto y la cola por los fragmentos (Mussali-Galante *et al.* 2005).

Dependiendo de la variante utilizada, esta técnica permite detectar rompimientos de cadena sencilla y doble, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos DNA-DNA/DNA-proteínas y sitios retardados de reparación (Tice *et al.* 2000, Mussali-Galante *et al.* 2005). La evaluación del daño al material genético evidenciado mediante el ensayo cometa se puede cuantificar de

diversas maneras como el índice de migración propuesto por Rodríguez-Mercado *et al.* (2011) o la implementación de diferentes programas computacionales, por ejemplo “Comet Assay IV”, el cual proporciona diversos parámetros entre los cuales el momento de la cauda, que se define como el producto de la longitud de la cauda y la cantidad de DNA presente en la misma, y cuyo valor es utilizado frecuentemente como el parámetro principal de daño al material genético (Burlison *et al.* 2007).

1.5. Antecedentes

Con respecto a los compuestos presentes en el material particulado, éste puede variar por un gran número de razones, entre las que se pueden destacar, clima, estación del año y tipo de emisiones de la zona (Valavanidis *et al.* 2008). Se han llevado a cabo diferentes estudios con material orgánico extraído (MOE) de partículas para determinar sus efectos genotóxicos. Oh *et al.* (2011) evaluaron el efecto de PM 2.5 colectada de áreas con elevadas cantidades de tráfico en la ciudad de Suwon, Corea utilizando la línea celular BEAS-2B de epitelio bronquial a través del ensayo de micronúcleos, obtuvieron el incremento de éstos de manera dosis dependiente y al utilizar agentes antioxidantes se vio disminuida la genotoxicidad producida por estas muestras, por último realizaron el fraccionamiento parcial del material colectado y encontraron que los compuestos alifáticos, aromáticos y ligeramente polares como HAPs, nitro HAPs, quetonas y quinonas fueron los agentes con mayor implicación en este comportamiento. Carreras *et al.* (2013), utilizando el ensayo cometa y de micronúcleos, evaluaron la composición y efecto mutagénico de HAPs asociados a partículas en Córdoba, Argentina durante 3 periodos: Marzo-Abril, Junio-Julio y Noviembre-Diciembre, las mayores concentraciones de HAPs y sus nitroderivados se encontraron durante el invierno en ambas pruebas de genotoxicidad, respecto a estos últimos 9-nitropireno, 3-nitrofenantreno y 9-nitrofenantreno fueron los más abundantes, lo cual concuerda con otro estudio realizado en México por Valle-Hernández *et al.* (2010). Entre los estudios realizados en México evaluando compuestos orgánicos y su efecto genotóxico y que tienen alta relevancia para la presente investigación se encuentra el de Villalobos-Pietrini *et al.* (2007), que utilizaron dos cepas de *Salmonella typhimurium*, las cuales responden tanto a agentes de acción directa como indirecta, además de ser sensibles a HAPs, realizaron el fraccionamiento por polaridad de la MOE y encontraron correlación entre los niveles de mutagenicidad que presentaron las

bacterias y la polaridad de la muestra, por lo que las fracciones más polares fueron las que provocaron la mayor actividad mutagénica. De igual manera observaron que al combinar las fracciones se notó una reducción del potencial mutagénico lo cual se debió a la interacción de los compuestos presentes en la muestra y no a una actividad antimutagénica por parte de las bacterias, y el de Amador-Muñoz *et al.* (2013) donde realizaron un análisis de 4 años midiendo la cantidad de HAPs en PM 10 y encontraron que existe diferencia en las concentraciones de masa a través de las estaciones del año, siendo la temporada de secas (noviembre-abril) donde se presenta la mayor cantidad. Diversos factores como humedad, temperatura y viento actúan como mecanismo de limpieza de la atmósfera para eliminar el material particulado y los compuestos orgánicos en la atmósfera lo que explica las variaciones estacionales observadas.

2. Justificación

Debido a la problemática de la contaminación ambiental ocasionada por el aumento de la población y flota vehicular así como a la falta de estudios de los compuestos presentes en la fracción orgánica del aerosol atmosférico, resulta de gran importancia evaluar el daño que la contaminación atmosférica ocasiona en el DNA debido a que la estabilidad de esta biomolécula es de crucial importancia.

3. Hipótesis

Si los agentes que componen la fracción orgánica de la MOE generan daño de manera directa, se observará un elevado nivel de éste al DNA en las concentraciones sin fracción enzimática S9, pero si estos compuestos necesitan ser metabolizados para generar el máximo efecto genotóxico, los grupos tratados con el agente metabólico afectarán en mayor medida el material genético.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar en linfocitos humanos de sangre periférica en ausencia o presencia de la fracción enzimática S9 el efecto genotóxico de la MOE de PM_{2.5} de diferentes sitios y temporadas de monitoreo en la ZMVM.

4.2. Objetivos Particulares

- 1.- Evaluar el efecto genotóxico de la MOE producido tanto por compuestos de acción directa como de acción indirecta, estos últimos mediante la implementación de la fracción enzimática S9.
- 2.- Comparar los niveles de daño al DNA ocasionados por MOE de 3 temporadas en las diferentes estaciones para determinar la existencia de variaciones en la composición y efecto de las muestras por temporada y sitio de colecta.

5. Método

5.1. Área de estudio

5.1.1. Sitios de colecta

En el caso de los sitios de colecta, en la ZMVM se presentan zonas drásticamente diferentes tanto por las actividades que se llevan a cabo, como por su nivel económico, por lo que se decidió seleccionar tres zonas que fueran contrastantes en los ámbitos antes mencionados y éstas fueron Tlalnepantla, que representa la zona noroeste, La Merced, la zona centro y Coyoacán, el suroeste de la ciudad.

5.1.1.1 Tlalnepantla

Tlalnepantla de Baz es uno de los 125 municipios pertenecientes al Estado de México y consta de 83.74 km² de superficie y posee 683 808 habitantes. De acuerdo al Inventario de Emisiones de 2014 este municipio es uno de los 3 principales dentro de la ZMVM en cuanto a concentración de industrias, siendo los sectores más abundantes la industria química, la manufactura de productos metálicos, elaboración de plástico y hule y la industria metálica básica, este tipo de actividades contribuyen en gran medida a las emisiones de PM 2.5 debido a los procesos de combustión y el manejo de material prima.

5.1.1.2. La Merced

La Merced es un barrio perteneciente a la alcaldía Cuauhtémoc, la cual tiene una población de aproximadamente 521 348 habitantes y una superficie de 32.44 km². De acuerdo al Inventario de Emisiones de 2014, esta alcaldía es donde se concentran la mayoría de los

comercios y servicios regulados de la CDMX, siendo los más abundantes restaurantes, sector hotelero y tiendas de autoservicio y departamentales. La relevancia del sector de comercios y servicios en términos de la calidad del aire, se debe a la cantidad y la diversidad de actividades que desarrollan, las cuales de manera individual generan bajas emisiones; sin embargo, en su conjunto éstas pueden llegar a ser significativas, este sector genera compuestos orgánicos volátiles.

5.1.1.3. Coyoacán

Coyoacán es una de las 16 alcaldías de la Ciudad de México, posee una superficie de 54.4 km² y tiene alrededor de 620 416 habitantes. Esta alcaldía no figura en el Inventario de Emisiones pero debido al tipo de actividades que se llevan a cabo ahí, principalmente el turismo, aunado al cambio del paisaje que existía en este lugar debido al rápido crecimiento de la mancha urbana también genera emisiones entre las que se podrían encontrar compuestos derivados de la quema de combustibles fósiles como PM, compuestos orgánicos volátiles y una variedad de metales de transición, por ejemplo el vanadio.

5.1.2. Temporadas estacionales de colecta

Las temporadas estacionales de colecta se determinaron de acuerdo al estudio de Amador-Muñoz *et al.* (2010), en el cual dividieron en temporada de lluvias (mayo-octubre) y secas (noviembre-abril) de acuerdo a las variaciones de humedad relativa y las coincidencias históricas del comportamiento de las estaciones observadas por Jáuregui (2000). Asimismo, subclasificaron la temporada de secas en cálidas y frías en función de la variación de temperatura. De acuerdo a esto las temporadas que se utilizaron fueron secas frías correspondiente al mes de noviembre 2016, secas cálidas marzo 2017 y lluvias julio 2017.

5.2. Extracción de la materia orgánica

Los filtros colocados en cada sitio para el muestreo de PM 2.5 se trataron para la extracción de la materia orgánica, la cual se llevó a cabo empleando la tecnología patentada (Amador-Muñoz *et al.* 2014a y Amador-Muñoz *et al.* 2014b) de celda de extracción a micro-escala asistida por ultrasonido con filtración en línea y reflujos (CAMUF) y sistema de múltiples deflexiones para la reducción del disolvente y recuperación de los analitos y fueron

facilitadas por el Dr. Omar Amador Muñoz del Laboratorio de Especiación Química del Centro de Ciencias de la Atmósfera

5.3. Trabajo de laboratorio

5.3.1. Grupos experimentales

Se utilizaron linfocitos aislados los cuales fueron obtenidos de 3 individuos de sexo masculino con un rango de edad entre los 23 y 25 años, un peso promedio de 75 kg y con buen estado de salud, no presentaban enfermedades crónico-degenerativas ni toxicomanías.

5.3.2. Aislamiento de linfocitos

El aislamiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el manual de Lymphoprep. Se extrajeron 10 mL de sangre periférica heparinizada de los tres donadores. Ésta se diluyó en una proporción 1:1 con solución salina balanceada de Hank's (HBSS), de dicha mezcla se tomaron 6 mL, los cuales se colocaron en un tubo de centrifuga con 3 mL de Lymphoprep y se centrifugaron por 20 min a 2010 rpm, con la finalidad de separar los linfocitos de los demás tipos celulares por gradiente de densidad. Se tomó la fase intermedia o blanca para mezclarla con HBSS y realizar una centrifugación a 1500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante por decantación y se agregó de nuevo HBSS mezclando bien hasta romper el botón y se realizó una vez más el paso anterior. Se eliminó de nuevo el sobrenadante por decantación y el botón se mezcló con 3.5 mL de medio RMPI 1640 (GIBCO). En un microtubo se colocó una alícuota de la suspensión celular para determinar tanto, la viabilidad como el número de células por mililitro.

5.3.3. Viabilidad celular

Se preparó una solución con 0.01 g de diacetato de fluoresceína (FDA) disuelto en 2 mL de acetona, 0.01 g de bromuro de etidio disuelto en 5 mL de amortiguador de fosfatos (PBS). Esta solución se preparó antes de utilizarse en las siguientes proporciones: 100 µL de la solución de bromuro de etidio, 15 µL de la solución de FDA y 2 mL de PBS.

La suspensión celular se mezcló con la solución anterior en una proporción 1:1 y se colocó en la incubadora a 37 °C por 7 minutos. Pasado este tiempo, los linfocitos se observaron al microscopio de fluorescencia con un filtro dual para detectar ambos colores. De un total de

100 células por muestra se cuantificó el número de células muertas (fluorescencia roja) y células vivas (fluorescencia verde) determinando de esta forma el porcentaje de linfocitos viables, el cual debe ser mayor al 90% para poder realizar la exposición a la MOE.

5.3.4. Conteo celular

El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer donde se colocaron 10 µL de suspensión y se contaron los linfocitos que se encontraban contenidos en 4 recuadros de 4x4. Para obtener el número de células por mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$x = \frac{n \times 10,000}{4}$$

Donde n corresponde al número de células en los cuatro cuadrantes de 4x4 y x es la cantidad de linfocitos contenidos en 1 mL de suspensión celular.

Debido a que se requiere mantener constante el número de linfocitos en todos los tratamientos, se obtuvo el volumen de suspensión celular en que estuvieran contenidas 125,000 células. Siempre se mantuvo la relación de ese número de linfocitos en 250 µL de volumen final.

5.3.5. Testigos de efecto genotóxico

Para el presente estudio se utilizaron dos agentes de efecto genotóxico (testigos positivos), bleomicina y benzo(a)pireno cuyo mecanismo de acción es de manera directa e indirecta, respectivamente. La bleomicina se preparó como indica el fabricante y se empleó en una concentración de 45 µg/mL. En el caso del benzo(a)pireno se utilizó en una concentración de 80 µg/mL.

5.3.6. Fracción microsómica S9 de hígado de rata

Diversos compuestos presentes de la fracción orgánica del aerosol atmosférico deben pasar por un proceso de activación metabólica para alcanzar su potencial mutagénico. De manera natural, en el organismo dicha transformación se lleva a cabo por diversos mecanismos particularmente el complejo de citocromos P450 (Hakkola *et al.* 1998). En el caso de los estudios *in vitro* y dependiendo del modelo de estudio, éste puede realizar la activación metabólica por sí solo, por ejemplo algunas líneas celulares como la A549 de

adenocarcinoma de pulmón, pero en el caso de los linfocitos se requiere adicionar un agente metabólico que realice este proceso, por ejemplo, la fracción microsómica de hígado de rata S9. Esta fracción se ha utilizado en diferentes modelos y han demostrado la activación de diversos compuestos como el 2-acetilaminofluoreno, 3-metilcolantreno y benzo(a)pireno (Ames *et al.* 1975).

Para la detección de compuestos de acción indirecta, en este trabajo se utilizó la fracción enzimática S9 Moltox, la cual se preparó de acuerdo a lo descrito por Maron y Ames (1983). La mezcla se realizó al 4% en la cual por cada 50 mL se agregaron 2.0 mL de fracción enzimática S9, 1.0 mL de solución de MgCl₂-KCl, 0.25 mL de solución 1 M de glucosa-6-fosfato, 2.0 mL de NADP 0.1 M, 25.0 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.4 y 19.75 mL de agua destilada estéril.

5.3.7. Exposición celular

Con el fin de determinar las concentraciones de MOE de cada una de las muestras y el tiempo de tratamiento de los linfocitos aislados, se hicieron experimentos preliminares. Con base en la viabilidad se seleccionó 80 µg/mL como la concentración máxima en 4 horas de exposición, ya que en ésta se obtuvo un valor de células vivas de 70-73%, que es el límite inferior para considerar evaluar la genotoxicidad. De tal manera que los linfocitos aislados de sangre periférica se expusieron a 4 concentraciones de la MOE (20, 40, 60 y 80 µg/mL) de cada una de las muestras a probar por 4 horas en presencia y en ausencia de la fracción microsómica S9 de hígado de rata, la cual se utiliza, como se mencionó anteriormente, para metabolizar los compuestos que requieren de este paso para desarrollar su potencial genotóxico y así poder evaluar el daño que éstos producen. Como testigo negativo se empleó dimetilsulfóxido al 1% (disolvente de las muestras) y como positivos benzo(a)pireno (BaP) y bleomicina para los grupos con y sin S9, respectivamente.

Se prepararon 12 grupos por individuo, esto se realizó en microtubos de 1.5 mL donde se llevó a un volumen final de 750 mL, de éstos el 10% correspondió a las muestras, 10% al agente metabólico (en los que fue requerido), se colocó el volumen necesario de suspensión celular y el resto fue medio RPMI 1640.

5.3.8. Electroforesis unicelular alcalina

La técnica se realizó de acuerdo con Singh *et al.* (1998) para detectar los rompimientos de cadena sencilla en el DNA. De cada una de las concentraciones se hicieron 2 preparaciones.

De cada microtubo se tomó un volumen de 10 μ L de la suspensión de linfocitos ésta se mezcló con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (37 °C) y fueron colocados en laminillas previamente cubiertas con una capa de agarosa regular al 0.5%. Esta muestra se extendió con ayuda de un cubreobjetos completamente limpio para no dañar la muestra. Las preparaciones se colocaron en hielo durante 5 minutos para permitir la solidificación de la segunda capa de agarosa y así poder retirar el cubreobjetos sin riesgo de maltratar la muestra, al remover el cubreobjetos se colocó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%.

Una vez solidificada la última capa de agarosa se retiró el cubreobjetos y se colocaron las laminillas en una solución de lisis compuesta por NaCl 2.5 M, Tris 0.01 M, EDTA Na₂ 0.1 M, Tritón X-100 (1%) y DMSO (10%). Se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4 °C en condiciones de total oscuridad por al menos una hora.

Para la realización de la electroforesis horizontal, las preparaciones fueron colocadas en una solución con NaOH 0.3 M y EDTA Na₂ 0.001 M a pH >13. Se dejaron por 20 min en dicha solución (para desenrollar el DNA) y transcurrido este tiempo se les sometió a una corriente de 300 mA y 25 V durante 20 min. Posteriormente, se neutralizaron con una solución de Tris 0.4 M (pH 7.5) 3 veces por 5 min. Para la fijación de las laminillas se utilizó etanol absoluto por 10 minutos y se les dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez fijadas, las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axiostar Plus (Carl Zeiss) equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Para visualizar los cometas se fluorocromizaron las laminillas con 50 μ L de bromuro de etidio (2 μ g/mL).

Para el registro de cometas se tomaron al azar 100 nucleos por laminilla de cada individuo por cada uno de los tratamientos y los cometas se capturaron con el programa “Comet Assay IV” (Perceptive Instruments). Se utilizaron dos parámetros para determinar genotoxicidad:

a) momento de la cauda del cometa, que es determinado por el programa, y b) frecuencia de cometas (núcleos con daño al DNA).

5.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron con el programa GraphPad Prism 5 y se realizó un análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y la prueba *post hoc* de Dunn para evaluar las diferencias entre cada uno de los tratamientos de cada individuo. Las diferencias se consideraron como significativas cuando el valor de P fue ≤ 0.05 .

6. Resultados

Para el análisis de resultados se tomó en cuenta el valor de momento de cauda proporcionado por el programa Comet Assay IV. Debido a que los resultados entre los 3 individuos no presentaron diferencia significativa entre ellos, se tomaron como repeticiones y fueron agrupados.

6.1. Daño genético de temporadas por estación.

Se analizaron las diferencias significativas de cada sitio entre las 3 temporadas.

6.1.1. Tlalnepantla

En la temporada de secas frías y cálidas, que corresponden a los meses de noviembre y marzo, respectivamente, se observó diferencia con el testigo a partir de la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ en ausencia de S9 y desde 40 $\mu\text{g/mL}$ en presencia de S9. En lluvias, que correspondió al mes de julio, sólo 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$ fueron diferentes del testigo en el grupo que no fue expuesto junto con la fracción enzimática, en el caso opuesto solo 80 $\mu\text{g/mL}$ presentó tal diferencia.

En este sitio se observaron diferencias significativas en la temporada de secas frías, que corresponde al mes de noviembre, entre los grupos expuestos con fracción enzimática S9 y en ausencia de ésta a partir de la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de secas cálidas se evidenció la diferencia significativa entre el grupo con S9 y el que carecía de ella en todas las concentraciones de exposición a MOE y en lluvias la diferencia significativa entre ambos grupos se presentó sólo en 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$. Se analizaron los valores más altos de cada concentración en las distintas temporadas con y sin S9. En el primer caso, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$, el momento de cauda más alto se produjo en noviembre y marzo, la de 60 $\mu\text{g/mL}$ registró la

mayor cantidad de daño en noviembre y en la concentración más alta, 80 µg/mL, no hubo diferencias significativas entre las 3 temporadas. Para el segundo caso, en 20 µg/mL no se encontró diferencia significativa entre las temporadas y para 40, 60 y 80 µg/mL los valores más altos de momento de cauda se mostraron en secas frías y cálidas, noviembre y marzo, respectivamente (Figura 1).

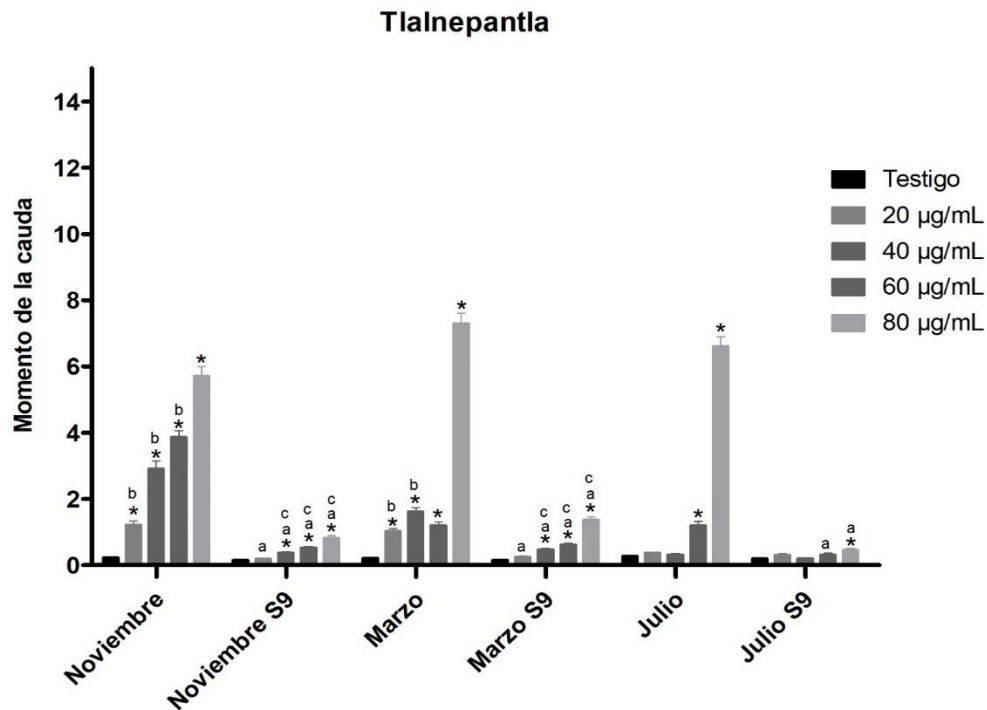


Figura 1. Momento de la cauda de los linfocitos expuestos a las muestras de la estación de Tlalnepantla, en 3 temporadas (noviembre, marzo y julio) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9. Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. $P \leq 0.05$. *Diferente a grupo testigo. a Diferente de en ausencia de S9. b Valores más altos de las 3 temporadas sin S9. c Valores más altos de las 3 temporadas con S9.

6.1.2. La Merced

En los datos obtenidos con las muestras de esta estación la diferencia con el testigo se presentó desde 20 $\mu\text{g/mL}$ que fue la concentración más baja, tanto en el grupo que fue expuesto junto la fracción enzimática como en el que carecía de ella, esto en noviembre. En marzo el momento de cauda fue idéntico en ausencia de S9 pero en presencia de ella 20, 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$ presentaron diferencia con el grupo testigo pero no así 40 $\mu\text{g/mL}$. Julio se comportó de la misma manera que noviembre y marzo, sin S9, siendo todas las concentraciones diferentes al testigo, en el caso del grupo con S9 la significancia se notó a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$.

En los linfocitos tratados con las muestras de la estación de La Merced se observaron diferencias significativas entre los grupos de Tlalnepantla con S9 y Tlalnepantla sin ella en 3 concentraciones, que fueron 20, 40 y 60 $\mu\text{g/mL}$. En la temporada de secas cálidas (marzo) se presentaron diferencias significativas entre el grupo en presencia de fracción enzimática y en ausencia de ella a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$ y hasta la concentración más alta y por último en la temporada de lluvias (julio), las diferencias entre grupos con S9 y sin ella se observaron en todas concentraciones de MOE. En el caso de los valores más altos de momento de cauda de cada concentración, para los grupos sin fracción enzimática, las de 20, 40 y 60 $\mu\text{g/mL}$ presentaron los valores más altos en la temporada de secas frías (noviembre), en 80 $\mu\text{g/mL}$ se manifestó el valor más alto de momento de cauda, se presentó tanto en noviembre como en marzo (secas frías y cálidas, respectivamente). Por otro lado, en el caso de los grupos sin S9 en la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ se encontró la mayor cantidad de daño en noviembre y en La Merced, en 40 $\mu\text{g/mL}$ se reportó el valor más alto en noviembre y julio y por último 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$ presentaron los valores mayores de momento de cauda en la temporada de secas frías, noviembre (Figura 2).

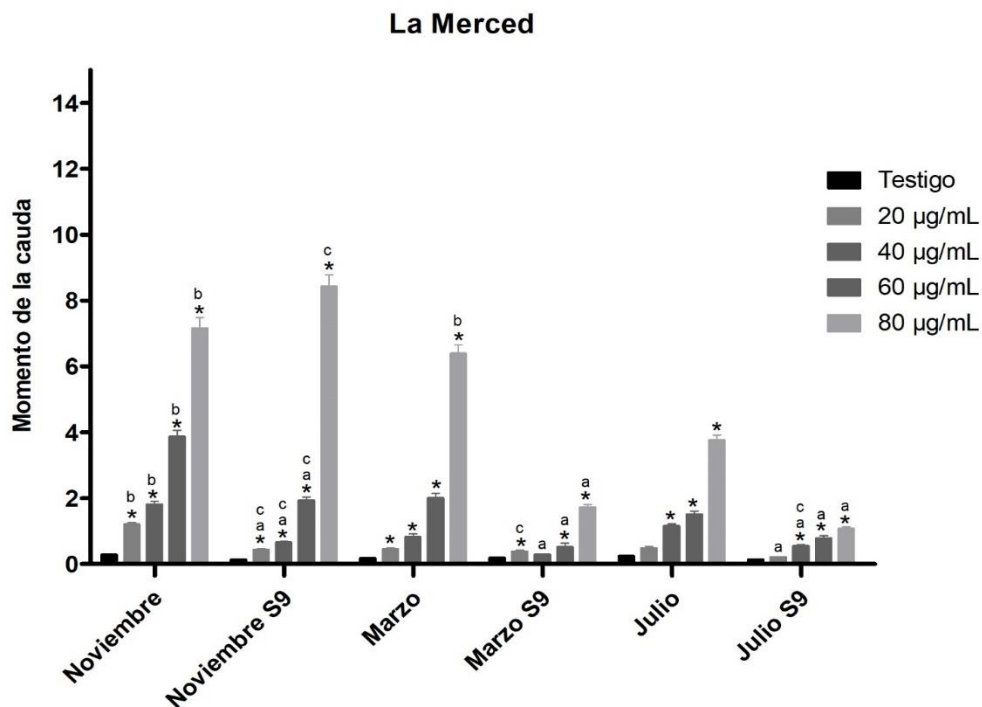


Figura 2. Momento de la cauda de los linfocitos expuestos a las muestras de la estación de La Merced, en 3 temporadas (noviembre, marzo y julio) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9. Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. $P \leq 0.05$. *Diferente a grupo testigo. a Diferente de en ausencia de S9. b Valores más altos de las 3 temporadas sin S9. c Valores más altos de las 3 temporadas con S9.

6.1.3. Coyoacán

En los tratamientos con las muestras de Coyoacán en noviembre, se observó diferencia entre el testigo y todas las concentraciones de MOE en el grupo en ausencia de S9, en presencia de dicha fracción solo hubo diferencia con el testigo a partir de 40 µg/mL. En marzo sólo se observó diferencia con el grupo testigo en 60 y 80 µg/mL tanto, en presencia como en ausencia de S9. Para la temporada de lluvias y en el grupo que no se expuso junto con la fracción enzimática se observó diferencia del testigo desde 40 µg/mL y en el caso opuesto solo 60 y 80 µg/mL mostraron diferencias con el testigo.

En la estación de Coyoacán se encontraron diferencias significativas entre los grupos expuestos a MOE con S9 y en ausencia de ella, en la temporada de secas frías (noviembre)

todas las concentraciones presentaron diferencias significativas entre el grupo expuesto con y sin fracción enzimática, en la temporada de secas cálidas (marzo) sólo se evidenciaron diferencias entre la presencia y la ausencia de S9 en la concentración más alta, correspondiente a 80 µg/mL, por último en lluvias (julio) la diferencia entre ambos grupos se observó desde los 40 µg/mL. De igual manera al comparar las concentraciones entre las distintas temporadas se observó que los valores más altos se dieron en noviembre desde 20 µg/mL y hasta 80 µg/mL, con la excepción que en 60 µg/mL la mayor cantidad de daño se comparte entre noviembre y julio, esto para el caso de los grupos sin fracción enzimática, en el caso de la presencia de S9 no se notó diferencia significativa en las 4 concentraciones entre las 3 temporadas (Figura 3).

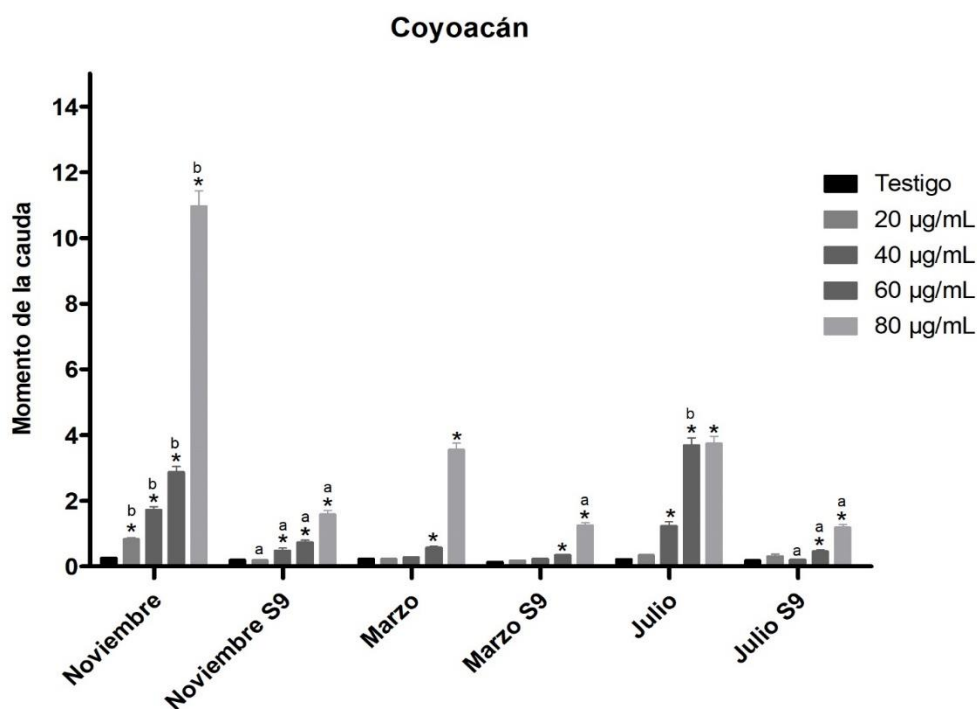


Figura 3. Momento de la cauda de los linfocitos tratados con las muestras de la estación de Coyoacán, 3 temporadas (noviembre, marzo y julio) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9. Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. $P \leq 0.05$. *Diferente a grupo testigo. a Diferente de en ausencia de S9. b Valor más alto de las 3 temporadas sin S9. c Valor más alto de las 3 temporadas con S9.

6.2. Daño genético de estaciones por temporada

Se analizaron las diferencias significativas de cada temporada estacional entre los 3 sitios.

6.2.1. Noviembre (secas frías)

En los linfocitos expuestos a la MOE de PM 2.5 de Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán de noviembre y en ausencia de S9 se observaron diferencias significativas con el grupo testigo desde la concentración más baja que fue de 20 $\mu\text{g/mL}$, en presencia de dicha fracción en Tlalnepantla y Coyoacán se observó esta diferencia a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$ y en la Merced desde 20 $\mu\text{g/mL}$.

En esta temporada se observó diferencia entre todas las concentraciones del grupo con S9 y el grupo que carecía de ella en Tlalnepantla y Coyoacán, para el caso de La Merced 80 $\mu\text{g/mL}$ no fue diferente entre ambos grupos. Los valores más altos de momento de cauda en ausencia de fracción enzimática se observaron en Tlalnepantla para el caso de 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ no presentó diferencia entre las 3 estaciones, 60 $\mu\text{g/mL}$ fue tanto en Tlalnepantla como en la Merced y 80 $\mu\text{g/mL}$ en Coyoacán, para el caso del grupo en presencia de S9 la mayor cantidad de daño se presentó en la Merced para las 4 concentraciones (Figura 4).

Por otra parte se observó la frecuencia de cometas en cada grupo experimental y en la temporada de secas frías y en los grupos que no fueron expuestos con S9 se observa el aumento gradual de los cometas alcanzando el valor máximo en 80 $\mu\text{g/mL}$, los valores más altos en todas las concentraciones se observaron en Coyoacán, 97%, posteriormente en La Merced, 91%, y por ultimo Tlalnepantla con 71%. En el caso de los grupos que tenían dicha fracción enzimática, se notó el mismo comportamiento dosis-dependiente pero con valores significativamente más bajos, En La Merced es en el que se presentó el mayor porcentaje de cometas en 80 $\mu\text{g/mL}$, 78%, seguido de Coyoacán con 31% y por último Tlalnepantla con 25% (Figura 5).

Noviembre

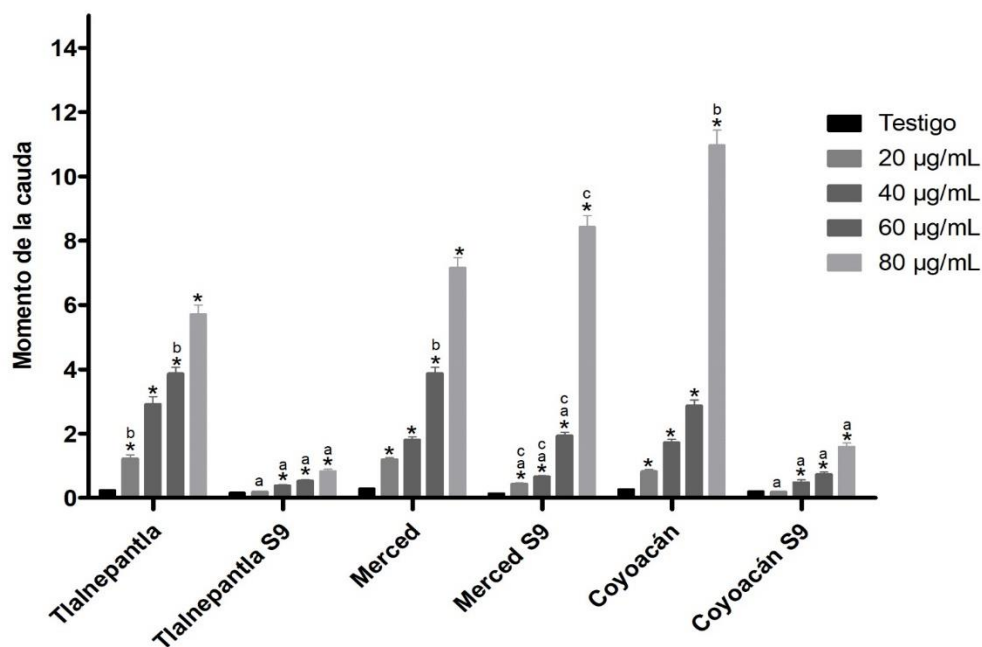


Figura 4. Momento de la cauda de los linfocitos tratados con las diferentes muestras en la temporada de secas frías en 3 sitios de la ZMVM (Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9. Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. $P \leq 0.05$. *Diferente a grupo testigo. a Diferente de en ausencia de S9. b Valores más altos de las 3 estaciones sin S9. c Valor más alto de las 3 estaciones con S9.

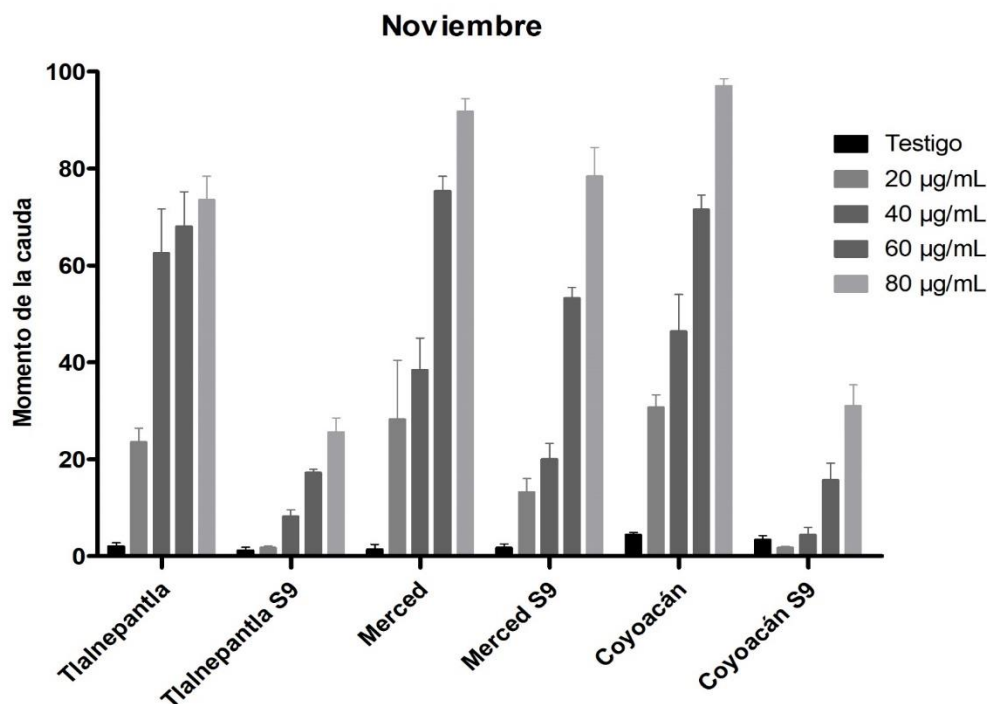


Figura 5. Porcentaje de cometas en los linfocitos tratados con las diferentes muestras en la temporada de secas frías, de 3 sitios de la ZMVM (Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9.

6.2.2. Marzo (secas cálidas)

En los linfocitos expuestos a las muestras correspondientes a Tlalnepantla y la Merced se observó un aumento significativo del momento de la cauda a partir de la concentración de 20 µg/mL y en Coyoacán desde 60 µg/mL en comparación con el grupo testigo, esto sin fracción enzimática, en el caso contrario esta diferencia se presentó en Tlalnepantla desde 40 µg/mL, en la Merced ocurrió a partir de la concentración más baja, con la excepción de 40 µg/mL que no tuvo esta diferencia, y Coyoacán solo en 60 y 80 µg/mL.

En esta temporada únicamente en las muestras de Tlalnepantla se presentó diferencia entre el grupo con S9 y sin ella en todas las concentraciones de MOE, en la Merced se observó a partir de 40 µg/mL y en Coyoacán solo 80 µg/mL fue diferente. Los valores más elevados de momento de cauda se presentaron en Tlalnepantla en 20 y 40 µg/mL, en 60 y 80 µg/mL compartió la mayor cantidad de daño con la Merced, todo esto en el grupo expuesto sin

fracción enzimática, los más altos en el grupo con presencia de S9 se manifestaron en las muestras de La Merced para 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$, esta última junto con Tlalnepantla, y el resto de concentraciones no mostraron diferencia entre las 3 estaciones (Figura 6).

En la temporada de secas cálidas se observa que conforme aumenta la concentración de MOE se incrementa la cantidad de cometas, en el caso de los grupos sin S9 en La Merced fue en donde se presentó el mayor porcentaje en todas las concentraciones, en la máxima alcanzando 97%, posteriormente Tlalnepantla con 84% y por último Coyoacán que mostró una disminución importante en todas las concentraciones y en 80 $\mu\text{g/mL}$ alcanzó 58%. Por otro lado, los grupos que contaron con la presencia de fracción enzimática se observó el mismo comportamiento pero no es tan gradual pues se nota un incremento abrupto entre 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$, el orden de estaciones fue el mismo siendo La Merced el primero con 45% en la concentración más alta, Tlalnepantla en segundo con 40% y por último Coyoacán con 38% (Figura 7).

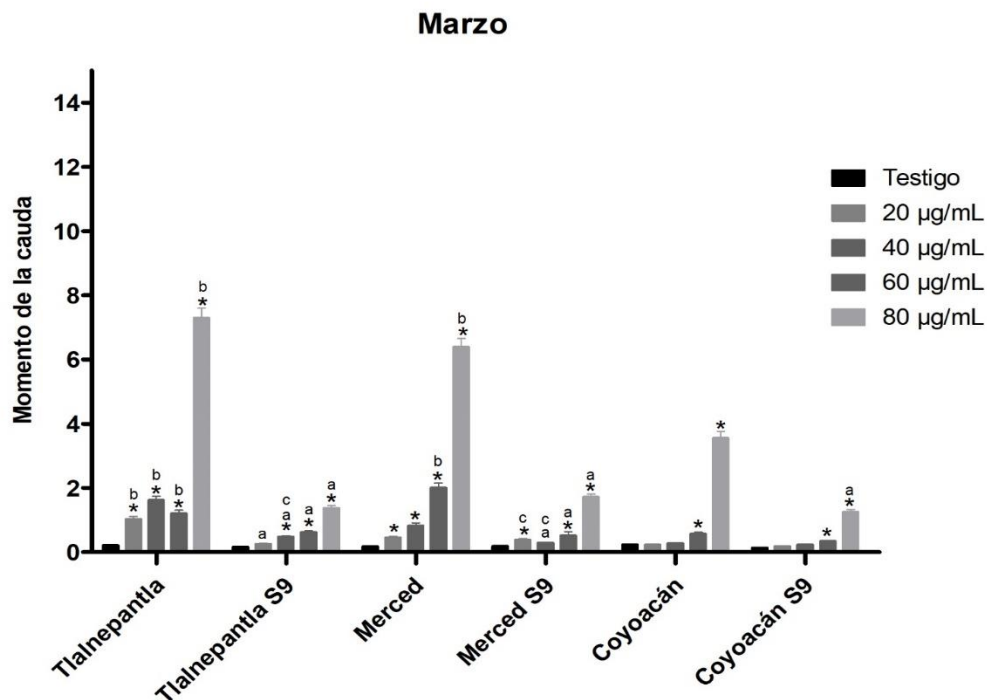


Figura 6. Momento de la cauda en los linfocitos tratados con las diferentes muestras en la temporada de secas cálidas, de 3 sitios de la ZMVM (Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9. Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. $P \leq 0.05$. *Diferente a grupo testigo. a Diferente de en ausencia de S9. b Valores más altos de las 3 estaciones sin S9. c Valores más altos de las 3 estaciones con S9.

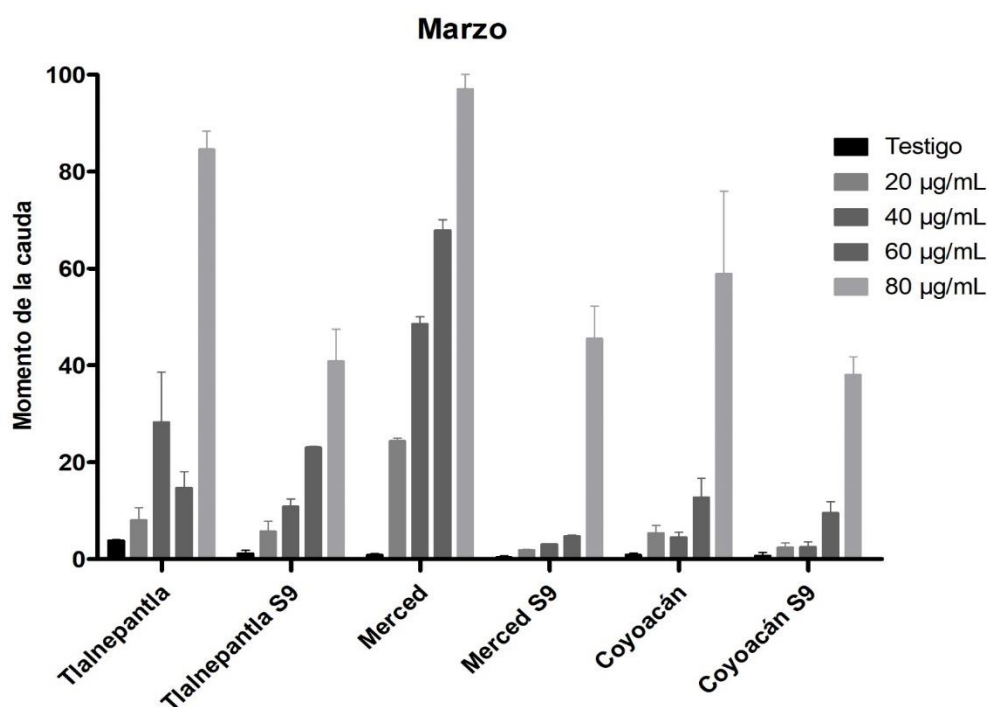


Figura 7. Porcentaje de cometas en los linfocitos tratados con las diferentes muestras en la temporada de secas cálidas, de 3 sitios de la ZMVM (Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9.

6.2.3. Julio (lluvias)

En los tratamientos con las muestras del sitio Tlalnepantla sin S9 se notó un aumento significativo en el momento de la cauda con respecto al grupo testigo solo en las concentraciones más altas, es decir en la de 60 y 80 µg/mL, la Merced desde 20 µg/mL y en Coyoacán a partir de 40 µg/mL, en presencia de dicha fracción enzimática en Tlalnepantla se presentó diferencia significativa con el testigo en 80 µg/mL, en la Merced a partir de 40 µg/mL y en las muestras de Coyoacán desde 60 µg/mL.

En julio, con las muestras de Tlalnepantla se presentó diferencia entre el grupo expuesto con S9 y en ausencia de ésta sólo en 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$, La Merced en todas las concentraciones y Coyoacán a partir de 40 $\mu\text{g/mL}$. El momento de cauda más elevado en los grupos sin fracción enzimática se presentó en la Merced y Coyoacán para 40 $\mu\text{g/mL}$, de igual manera esta estación evidenció el valor más alto para 60 $\mu\text{g/mL}$ y 80 $\mu\text{g/mL}$ en Tlalnepantla, en el caso de 20 $\mu\text{g/mL}$ no hubo diferencia entre las 3 estaciones, para los grupos con S9 en La Merced se mostró el momento de cauda más elevado en casi todas las concentraciones, 80 $\mu\text{g/mL}$ lo compartió con Coyoacán (Figura 8).

Para la temporada de lluvias y en ausencia de S9 sigue el comportamiento dependiente de la concentración y el incremento gradual salvo con la MOE Tlalnepantla donde es más abrupto, en este sitio se presenta el valor más alto en 80 $\mu\text{g/mL}$ con 87%, seguido de La Merced con 77% y por último Coyoacán con 63%, en las demás concentraciones Tlalnepantla es el que muestra la menor cantidad de cometas. Los grupos que fueron adicionados con la fracción enzimática, la MOE de la Merced fue la que indujo el porcentaje más alto de cometas con 34% en la concentración más alta, seguido por la de Coyoacán con 28% y por último la de Tlalnepantla con 9%, en el resto de concentraciones el orden se mantiene (Figura 9).

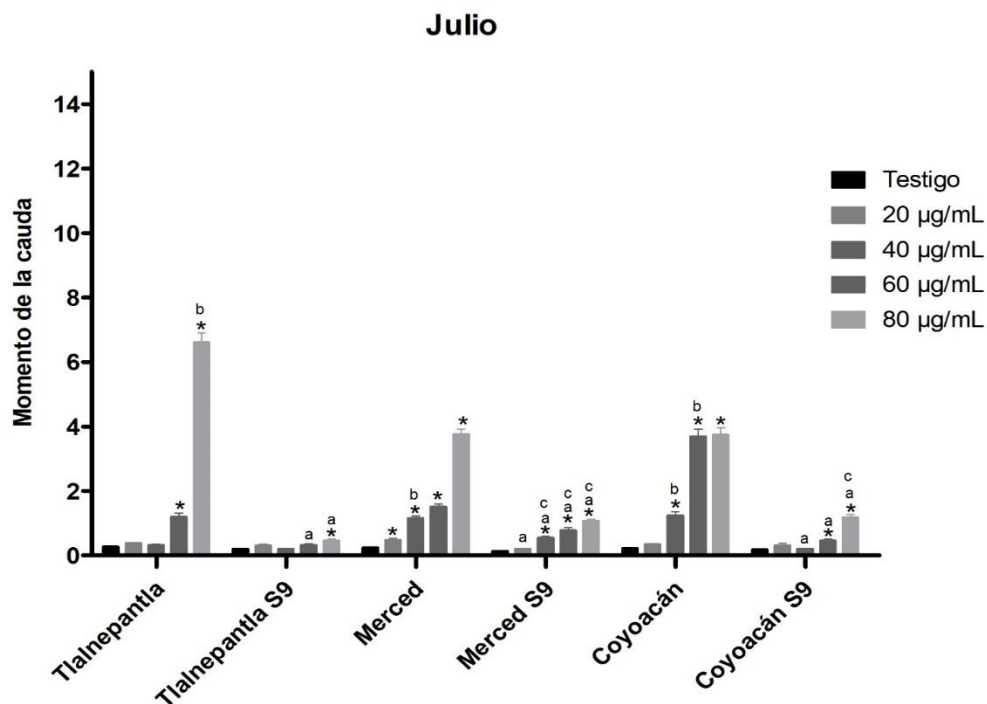


Figura 8. Momento de la cauda de los linfocitos expuestos a las muestras correspondientes a la temporada de lluvias en 3 sitios de la ZMVM (Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9. Kruskal-Wallis *post hoc* Dunn. $P \leq 0.05$. *Diferente a grupo testigo. a Diferente de en ausencia de S9. b Valores más altos de las 3 estaciones sin S9. c Valores más altos de las 3 estaciones con S9.

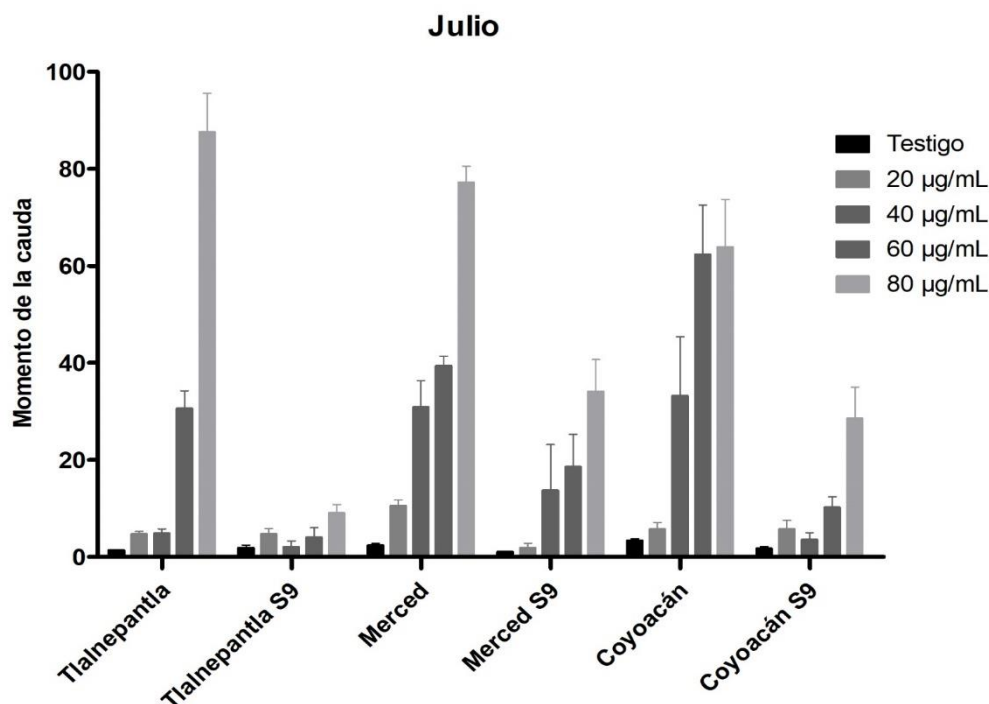


Figura 8. Porcentaje de cometas de los linfocitos expuestos a las muestras correspondientes a la temporada de lluvias en 3 sitios de la ZMVM (Tlalnepantla, la Merced y Coyoacán) en presencia y en ausencia de fracción enzimática S9.

7. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos la MOE de los sitios que generaron la mayor cantidad de daño al DNA fueron Tlalnepantla y La Merced en todas las temporadas con la excepción de noviembre donde Coyoacán toma el lugar de Tlalnepantla. En cuanto a estos resultados, Viras *et al.* (1990) encontraron que los valores más altos de mutagenicidad a través del ensayo de AMES ocurrió en la zona centro y Villalobos-Pietrini *et al.* (1994) reportaron que

los valores más elevados en esta temporada fueron en la zona industrial, con los resultados obtenidos por los autores se corroboran los de esta investigación donde los valores de momento de cauda observados se deben a los tipos de contaminantes presentes en estas zonas que son principalmente originados por quema de combustibles ocasionado por el denso tráfico que se da en la zona centro y a las emisiones de industria que se suman en el área de Tlalnepantla, lo cual genera una gran variedad de compuestos oxidados. En cuanto a los resultados obtenidos en presencia de S9 concuerdan en su mayoría con los del grupo de Viras *et al.* (1990) quienes observaron que no había efecto genotóxico o se veía disminuido en comparación con los grupos que no fueron expuestos junto con la fracción enzimática, lo cual también varía dependiendo del tipo de emisiones que se generen en la localidad.

La mayor cantidad de daño, con y sin fracción enzimática, de acuerdo a las temporadas se dio en la época de secas, tanto en frías como en cálidas con la excepción de las muestras de Coyoacán donde los valores máximos se observaron solo en noviembre. Por un lado, el que en secas frías se presenten valores tan altos de momento de cauda coincide con lo observado por Valle-Hernández *et al.* (2010) y Amador-Muñoz *et al.* (2011) quienes reportaron que en MOE colectada durante estas temporadas existe una mayor presencia de HAPs y n-alcanos. Trejo-Pacheco (2018) determinó las muestras utilizadas en esta investigación correspondientes a noviembre 2016, y encontró que referente a hidrocarburos aromáticos policíclicos los más abundantes fueron benzo(ghi)perileno, benzo(b)fluoranteno, indeno[1, 2, 3-cd]pireno, benzo(e)pireno y cliclopenta[cd]pireno, y los nitro-HAPs con medianas más elevadas fueron 3-nitrobifenilo, 1,3-dinitronaftaleno, 1, 5-dinitronaftalno, 4-nitrofenantreno, 3-nitrofenantreno, 2 nitrofluoranteno y 6 nitrobenzo(a)pireno, esto sumado a lo reportado por Calderón-Segura *et al.* (2004) quienes observaron que en cultivos celulares expuestos a diferentes concentraciones de MOE, en secas frías se evidenció la mayor cantidad de intercambio de cromátidas hermanas tanto, en presencia como en ausencia de fracción S9, al realizar el análisis de las muestras también indicaron que fue el mes con la mayor cantidad de HAPs, los cuales son compuestos de acción indirecta lo que puede explicar los resultados obtenidos en esta investigación con la MOE de La Merced. Este comportamiento se puede deber a la menor fotólisis que ocurre durante los meses más fríos así como a la mayor frecuencia de inversiones térmicas, mayor estabilidad atmosférica y a las menores temperaturas lo que reduce la capa donde se llevan a cabo las mezclas e interacción de

compuestos por lo que aumentan las concentraciones de los contaminantes primarios y por tanto a los agentes de acción directa (Carreras *et al.* 2013), por ejemplo nitro-HAPs como 9-nitroantraceno, que pueden generar metabolitos que se unen covalentemente al DNA (Pope 2014 tomado de Trejo-Pacheco 2018), y el cual se ha reportado como producto de la combustión de diésel (Feilberg *et al.* 2001), lo que también concuerda con que los lugares con mayor cantidad de tráfico vehicular (Tlalnepantla y la Merced) presenten los mayores valores en casi todas las temporadas.

Por otro lado, el incremento de las temperaturas en secas cálidas permite a los compuestos que son emitidos oxidarse, volverse más reactivos y por tanto generar una mayor cantidad de estrés oxidante. Este comportamiento ha sido modelado en otros países y se observa que en los meses donde aumenta la temperatura se ven elevados los compuestos orgánicos oxidados (Shrivastava *et al.* 2006). El caso de Coyoacán es opuesto debido a que los valores más altos se observan en la MOE correspondiente al mes de noviembre, es decir secas frías, lo cual puede deberse a que las actividades que se realizan en esta zona son totalmente distintas al de los otros sitios siendo las principales, la manufactura, el comercio y los servicios de acuerdo al INEGI (2015). Debido a que las actividades que se llevan a cabo son de diferente naturaleza, las emisiones que se liberan también son múltiples y por tanto pueden ser menos propensas a oxidarse y por ello, no se incrementan los valores en marzo, de igual manera se ha reportado que en esta localidad dominan principalmente especies orgánicas secundarias con compuestos fotodegradados (Amador-Muñoz *et al.* 2011).

En los linfocitos expuestos a MOE del mes de julio existe una menor cantidad de daño al DNA en comparación con noviembre y marzo, esta variabilidad por temporada se ha observado en diversos estudios, Amador-Muñoz *et al.* (2011) reportaron aumento de 1.3 a 2 veces de concentración de masa en la MOE entre secas y lluvias. Esta disminución es ocasionada por diversas variables ambientales que funcionan como excelentes agentes para limpiar el ambiente y reducir la cantidad de contaminantes que están presentes en el aire, como el viento y la humedad, las cuales se ven incrementadas en la época de lluvias, esto podría explicar el decremento que se observó en el mes de julio en las 3 estaciones tanto, en presencia como ausencia de la fracción enzimática S9.

Debido a que la mayor cantidad de daño se observó en ausencia de S9 es posible suponer que hay mayor presencia de mutágenos de acción directa que de indirecta en la mayoría de los casos. Como se ha mencionado anteriormente, un punto muy importante del potencial genotóxico de la MOE es su composición, la cual varía por el tipo de emisiones que se generan en el lugar de la muestra, se ha reportado que este material orgánico puede contener hidrocarburos alifáticos, clorinados, HAPs y sus derivados alquilo, nitro-HAPs, quetonas y quinonas (Topinka *et al.* 2000, Oh *et al.* 2011), aunado a esto, diversos estudios han demostrado que la fracción neutra y ligeramente polar es la que posee la mayor cantidad de efectos adversos al DNA ya que es donde se encuentran la mayor parte de HAPs y derivados, así como nitro-HAPs, esto se ha observado en ensayo de AMES (Cerná *et al.* 2000, Sharma *et al.* 2007) hepatocitos de rata (Zhao *et al.* 2002), pulmón de criceto chino (Topinka *et al.* 2000) y en células de epitelio bronquial humano (Oh *et al.* 2011). La principal vía por la que estos compuestos generan daño al DNA es a través de los radicales libres y estrés oxidante, en cuanto a los agentes de acción directa este efecto puede estar dado por quinonas que se ha visto que generan ROS como el anión superóxido y radical hidroxilo en partículas originadas por emisiones de diésel (Sagai *et al.* 1993), de igual manera los nitro-HAPs y el 1-nitropireno se han reportado como generadores de especies reactivas de oxígeno (Kim *et al.* 2005, Andersson *et al.* 2009). Por otra parte, el daño ocasionado por compuestos que necesitan ser metabolizados, es decir, en presencia de S9 en la temporada de secas frías, correspondiente a noviembre en La Merced, puede deberse a la presencia de HAPs, ya que se ha reportado que esta zona es de las más abundantes en estos compuestos (Amador-Muñoz *et al.* 2011), los cuales pueden generar radicales libres mediante metabolismo fase I (CYP1A) y fase II [NADPH quinona oxidoreductasa -1 (NQO-1) en células epiteliales, los hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden producir metabolitos electrofílicos y reactivos que pueden asociarse con la formación de ROS (Nel *et al.* 2001, Valavanidis *et al.* 2005).

8. Conclusión y comentarios

Estos resultados muestran que existen diferencias en los niveles de daño al DNA en linfocitos expuestos a MOE de PM 2.5 en presencia y ausencia de S9 entre las temporadas estacionales y los sitios. Este comportamiento refleja que la respuesta de los linfocitos a la MOE se debe

a la composición de la misma, la cual varía en los diferentes sitios debido a las fuentes de emisión de contaminantes:

- Tlalnepantla: los compuestos presentes son menos variables debido a que en las 3 temporadas no hay diferencia en la concentración más alta y la respuesta con S9 fue muy similar, por lo que se puede decir que en este sitio predominan los compuestos de acción directa.
- La Merced: los contaminantes varían puesto que en noviembre es donde hubo la mayor respuesta con fracción enzimática, lo que es reflejo de la presencia y abundancia tanto de compuestos que requieren activación metabólica como de aquellos que no la necesitan para generar efectos adversos.
- Coyoacán: la mayor cantidad de daño ocurre en noviembre con una disminución y posterior mantenimiento del daño tanto en marzo como en julio, de igual manera los agentes que predominan de acuerdo al tipo de respuesta observado son los de acción directa.

En cuanto a las temporadas:

- En Tlalnepantla no se presenta diferencia entre ellas por lo que el tipo de contaminantes no varía de acuerdo a las condiciones atmosféricas características de cada estación, como temperatura o humedad.
- En La Merced las dos correspondientes a secas fueron las que presentaron los valores más altos lo cual es ocasionado en secas frías por diversos factores siendo la inversión térmica uno de los principales y en secas cálidas por la oxidación de compuestos debido al incremento de las temperaturas.
- En Coyoacán es muy similar en el caso de noviembre pero en marzo el daño disminuye lo cual se puede deber a que si bien la temperatura se incrementa, la cantidad de emisiones puede disminuir debido a las actividades económicas del lugar.

Por último, para la temporada de lluvias en la Merced y Coyoacán la disminución se puede deber a que factores ambientales como el viento y la humedad que se ven incrementados ayudan a que se eliminen los compuestos que son emitidos y pueden generar diversas afectaciones en el organismo.

Es posible decir que si bien el tipo de emisiones de cada sitio varía y tiene relevancia para la generación de daño al DNA, son las condiciones ambientales las que ejercen un papel muy importante en el potencial genotóxico de los compuestos orgánicos emitidos a la atmósfera, ya que éstas pueden afectarlo para volverlos más reactivos o facilitar la interacción de éstos para generar nuevos compuestos con mayores posibilidades de generar un efecto adverso al organismo

9. Perspectivas

Debido a las implicaciones ambientales en el efecto de la respuesta a exposición a MOE de PM 2.5, diversos pasos deben ser tomados para la mejor comprensión del daño en el organismo:

- 1.- Fraccionar las muestras por polaridad para determinar algún grupo de compuestos que pueda ser el principal participe en la respuesta observada.
- 2.- Investigar los mecanismos de generación de estrés oxidante por parte de los compuestos orgánicos para así conocer de manera fehaciente el mecanismo mediante el cual éstos generan daño al DNA para poder plantear estrategias para mitigarlo
- 3.- Determinar si este comportamiento es diferente en hombres y en mujeres pues en diversos estudios se ha observado la mayor susceptibilidad a ciertos compuestos por parte de ellas.
- 4.- Evaluar diferentes tipos de daño, así como diversos tiempos de para así tener un mejor entendimiento del comportamiento de estos agentes en el organismo.

10. Referencias

- Altamirano-Lozano M, Álvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara F, Valverde M, Rojas E. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1996; 16: 7-17.
- Amador-Muñoz O, Delgado-Rodríguez A, Villalobos-Pietrini R, Munive-Colín Z, Ortiz-Marttelo R, Bravo-Cabrera JL, Gómez-Arroyo S. Partículas suspendidas, hidrocarburos

- aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el sureste de la Ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2001; 17: 193-204.
- Amador-Muñoz, O, Villalobos-Pietrini R, Agapito-Nadales MC, Munive-Colín Z, Hernández-Mena L, Sánchez-Sandoval M, Gómez-Arroyo S, Bravo-Cabrera JL, Guzmán-Rincón J. Solvent extracted organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons distributed in size-segregated airborne particles in a zone of México City: Seasonal behavior and human exposure. *Atmospheric Environment*. 2010; 44: 122-130.
- Amador-Muñoz O, Villalobos-Pietrini R, Miranda J, Vera-Avila LE. Organic compounds of PM 2.5 in Mexico Valley: Spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Science of the Total Environment*. 2011; 409: 1453-1465.
- Amador-Muñoz O, Bazán-Torija S, Villa-Ferreira SA, Villalobos-Pietrini R, Bravo-Cabrera JL, Munive-Colín Z, Hernández-Mena L, Saldarriaga-Noreña H, Murillo-Tovar MA. Opposing seasonal trends for polycyclic aromatic hydrocarbons and PM10: Health risk and sources in southwest Mexico City. *Atmospheric Research*. 2013; 122: 199-212.
- Amador-Muñoz O, Santos-Medina GL, Jazcllevich-Diamant A, Valle-Hernández BL, Villalobos-Pietrini RJ, (2014a). Celda de extracción a microescala, asistida por ultrasonido, con y sin reflujo, acoplada a un sistema de filtración. Título de patente No. 325624. IMPI. Clasificación: Int. Cl.8: B01D3/00; B01D33/00; G01N1/00. Vigencia 20 años, Titular: UNAM.
- Amador-Muñoz O, Santos-Medina GL, Jazcllevich-Diamant A, Valle-Hernández BL, (2014b). Dispositivo integrado por múltiples deflexiones para la recuperación de compuestos orgánicos debido a la evaporación de disolventes orgánicos por arrastre de vapor. Título de patente No. 325625. IMPI. Clasificación: Int. Cl.8: B01D1/00; B01D1/14. Vigencia 20 años, Titular: UNAM.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*. 1975; 31: 347-364.
- Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearin the Air: A Review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of Medical Toxicology*. 2012; 8: 166-175.

- Andersson H, Piras E, Demma J, Hellman B, Brittebo E. Low levels of the air pollutant 1-nitropyrene induced DNA damage, increased levels of reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells. *Toxicology*. 2009; 262: 57-64.
- Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 2006; 494: 161-172.
- Ávila-Costa MR, Montiel-Flores E, Colín-Barenque, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG, Mussali-Galante P, Fortoul TI. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1365-1369.
- Burlison B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth international work group on genotoxicity testing: Results of the in vivo comet assay work group. *Mutation Research*. 2007; 627: 31-35.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Butterworth FM, Amador-Muñoz O. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airbourne particulates in Mexico City. *Mutation Research*. 2004; 558: 7-17.
- Carreras HA, Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Murillo-Tovar MA, Amador-Muñoz O. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. *Environmental Pollution*. 2013; 178: 403-410.
- Cerná M, Pochmanová D, Pastorková A, Benes I, Lenícek J, Topinka J, Binková B. Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part I: Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates. *Mutation Research*. 2000; 469: 71-82.
- Chan K, Kan YM. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1999; 96: 12731-12736.
- Cho SC, Kim BN, Hong YC, Shin MS, Yoo HJ, Kim JW, Bhang SY, Cho IH, Kim HW. Effect of environmental exposure to lead and tobacco smoke on inattentive and hyperactive

- symptoms and neurocognitive performance in children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2010; 51(9): 1050-1057.
- Danissenko MF, Pao A, Tang MS Pfeifer GP. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutation hotspots in p53. *Science*. 1996; 274: 430-432.
- Davidson CI, Phalen RF, Solomn PA. Airborne particulate matter and human health: A Review. *Aerosol Science and Technology*. 2007; 39(8): 737-749.
- De Kok TCM, Drieste HAL, Hogervorst JGF, Briedé JJ. Toxicology assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutation Research*. 2006; 613: 103-122.
- Feilberg A, Poulsen MWB, Nielsen T, Skov H. Occurrence and sources of particulate nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in Denmark. *Atmospheric Environment*. 2001; 35: 353-366.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.
- Ferrer-Carbonell JA, Escalante-Semerena RI. Contaminación atmosférica y efectos sobre la salud en la Zona Metropolitana del Valle de México. *Economía Informa*. 2009; 360: 22-39.
- Finlayson-Pitts BJ, Pitts JNJ. Tropospheric air pollution: Ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science*. 1997; 276: 1045-1051.
- González-Villalva A, Fortoul TI, Ávila-Costa MR, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Bizarro-Nevarez P, Díaz-Bech P, Mussali-Galante P, Colín-Barenque L. Thrombocytosis induced in mice after subacute and chronic V2O5 inhalation. *Toxicology and Industrial Health*. 2006; 22: 113-116.
- Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrían-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban particle matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2006; 47: 199-211.

- Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 1998; 28(1): 35-72.
- Hirakawa K, Oikawa S, Hiraku Y, Hirosawa I, Kawanishi S. Catechol and hydroquinone have different redox properties responsible for their differential DNA-damaging ability. *Chemical Research in Toxicology*. 2002; 15: 76-82.
- Hiura TS, Li N, Kaplan R, Horwitz M, Seagrave JC, Nel A. The role of mitochondrial pathway in induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *Journal of Immunology*. 2000; 165: 2703-2711.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. International Agency for Research on Cancer, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. 1989; 46: 1-458.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Capítulo 4: Partículas suspendidas, 2012. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/517/cap4.pdf>.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Consultado 28/05/2018 en <http://www.beta.inegi.org.mx/app/mapa/denue/>.
- Jáuregui EO. El clima de la Ciudad de México. UNAM, Plaza y Valdés, México. 2000.
- Keane MJ, Xing SG, Harrison JC, Ong T, Wallace WE. Genotoxicology of diesel-exhaust particles dispersed in simulated pulmonary surfactant. *Mutation Research*. 1991; 260: 233-268.
- Kim YD, KO YJ, Kawamoto T, Kim H. The effects of 1-nitropyrene on oxidative damage and expression of DNA repair enzymes. *Journal of Occupational Health*. 2005; 47: 261-266.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Scmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives*. 2003; 111: 455-460.

- Lim, YB, Ziemann PJ. Chemistry of secondary organic aerosol formation from OH radical-initiated reactions of linear, branched, and cyclic alkanes in the presence of NO_x. *Aerosol Science and Technology*. 2009; 43: 604-619.
- Machado A, García N, García C, Acosta L, Córdoba A, Linares M, Giraldoto D, Velásquez H. Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni y Cr) en aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto tráfico vehicular. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2008; 24: 171-182.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicology. *BioMed Research International*. 2013; p 1-15.
- Maron DM y Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 1983; 113: 173-215.
- Mayer H. Air pollution in cities. *Atmospheric Environment*. 1999; 33: 4029-4037.
- Mayor-Oxila R. *Instituto de Medicina Tropical*. 2010; 2: 23-29.
- Metha M, Chen LC, Gordon T, Rom W, Tang M. Particle matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutation Research*. 2008; 657: 116-121.
- Molina LT, Molina MJ. Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2004; 54 (6): 644-648.
- Molina Lt, Molina MJ. Air quality in the Mexico megacity. An integrated assessment. *Eure*. 2006; XXXII: 141-145.
- Mussali-Galante P, Ávila-Costa MR, Piñón-Zarate G, Martínez-Levy G, Rodríguez-Lara V, Rojas-Lemus M, Avila-Casado MC, Fortoul TI. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicology and Industrial Health*. 2005; 21: 155-166.
- Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2001; 7: 20-26.
- OECD (2015), *OECD Territorial Reviews: Valle de México, Mexico*, OECD Publishing, Paris

- Oh SM, Kim HR, Park YJ, Lee SY, Chung KH. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B-cells). *Mutation Research*. 2011; 723: 142-151.
- Ohnishi S, Kawanishi S. Double base lesions of DNA by metabolite of carcinogenic benzo(a)pyrene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 290: 778-782.
- Pope III CA. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: Biologic mechanisms and who's at risk?. *Environmental Health Perspectives*. 2000; 108(4): 713-723.
- Pope III CA, Dockery DW. Health effects of fine particle air pollution: Lines that connect. *Journal of the Air & Waste Management*. 2006; 56(6): 709-742.
- Qui XB, Cadenas E. The role of NAD(P)H: quinone oxidoreductase in quinone-mediated p21 induction in human colon carcinoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997; 346: 241-251.
- Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particle air pollution. *Mutation Research*. 2005; 592: 119-137.
- Rivero-Rosas H, Pfeifer GD, Lynam DR, Pedroza JL, Jullían-Sánchez A, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in México City air. *The Science of Total Environment*. 1997; 198: 79-96.
- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicology in Vitro*. 2011; 25: 1996-2002.
- Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo Me, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. Micronuclei induced by air particle matter from Mexico City. *Mutation Research*. 2007; 631: 9-17.
- Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y. Biological effects of diesel exhaust particles. In vitro production of superoxide dismutase and in vivo toxicity in mouse. *Free Radical Biology & Medicine*. 1993; 14: 37-47.

- Secretaria del Medio Ambiente (SMA). Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM 2008. 2010.
- Schnelle-Kreis J, Gebfögi I, Welzl G, Jaensch T, Kettrup A. Occurrence of particle-associated polycyclic aromatic compounds in ambient air of the city of Munich. *Atmospheric Environment*. 2001; 35(1): S71-S81.
- Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J. Air Waste Management Association*. 1996; 46: 927–939.
- Sharma AK, Jensen KA, Rank J, White PA, Lundstedt S, Gange R, Jacobsen NR, Kristiansen J, Vogel U, Wallin H. Genotoxicity inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incineration energy plant and urban air. *Mutation Research*. 2007; 633: 95-111.
- Shrivastava MK, Lipsky EM, Stanier CO, Robinson AL. Modeling semivolatile organic aerosol mass emissions from combustion systems. *Environmental Science & Technology*. 2006; 40: 2671–2677.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175: 184-191.
- Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particle matter. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31(9): 1132-1138.
- Tice RR, Arguella, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al. Single cell gel/ comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000; 36: 206-211.
- Thurston GD, Ito K, Hayes CG, Bates DV, Lippman M. Respiratory hospital admissions and summertime haze air pollution in Toronto, Ontario: Consideration of the role of acid aerosols. *Environmental Research*. 1994; 65: 271–290.

- Topinka J, Schwarz LR, Wiebel FJ, Cerna M, Wolff T. Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutation Research*. 2000; 469: 83-93.
- Trejo-Pacheco K. Variabilidad especial de hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitroderivados y ftalatos en PM_{2.5} del Área Metropolitana del Valle de México durante la temporada de secas frías. 2018. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Química. Facultad de Química. UNAM.
- Valavanidis A, Fiotakis K, Bakeas E, Vlahogianni T. Electron paramagnetic resonance study of the generation of reactive oxygen species catalysed by transition metals and quinoid redox cycling by inhalable ambient particulate matter. *Redox Report*. 2005; 10: 37-51.
- Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: Toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health*. 2008; 26(4): 339-362.
- Valle-Hernández BL, Mugica-Álvarez V, Salinas-Talavera E, Amador-Muñoz O, Murillo-Tovar MA, Villalobos-Pietrini R, De Vizcaya-Ruiz A. Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM₁₀ and PM_{2.5} collected in Northern Mexico-City. *Science of the Total Environment*. 2010; 408: 5429-5438.
- Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. 2003; 139: 57-63.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemical-Biological Interactions*. 2006; 160: 1-40.
- Viras LG, Athanasiou K, Siskos P. Determination of mutagenic activity of airborne particulates and the benzo(a)pyrene concentrations in Athens atmosphere. *Atmospheric Environment*. 1990; 24: 267-274.
- Villalobos-Pietrini R, Blanco S, Gómez-Arroyo S. Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmospheric Environment*. 1994; 29(4): 217-524.

- Villalobos-Pietrini R, Hernández-Mena L, Amador-Muñoz O, Munive-Colín Z, Bravo-Cabrera JL, Gómez Arroyo S, Frías-Villegas A, Waliszewski S, Ramírez-Pulido J, Ortiz-Muñiz R. Biodirected mutagenic chemical assay of PM10 extractable organic matter in Southwest Mexico City. *Mutation Research*. 2007; 634: 192-204.
- Westerholm R, Egeback KE. Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environmental Health Perspectives*. 1994; 102: 13-23.
- World Health Organization (WHO). Particle matter air pollution: how it harms health. 2005.
- Xia T, Kovichich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*. 2006; 6(8): 1794-1807.
- Zhao X, Wan Z, Chen G, Zhu H, Jiang S, Yao J. Genotoxicity activity of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutation Research*. 2002; 514: 177-192.