



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS SILVESTRES COMO ORGANISMOS CENTINELA EN LA
EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA INDUCIDA POR CONTAMINANTES
ATMOSFÉRICOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. PAOLA LOZA GÓMEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

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

DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. MARZO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS SILVESTRES COMO ORGANISMOS CENTINELA EN LA
EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA INDUCIDA POR CONTAMINANTES
ATMOSFÉRICOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PAOLA LOZA GÓMEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

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

DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. FEBRERO, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE GEOLOGÍA

OFICIO CPCB/089/2020

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 en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **04 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **LOZA GÓMEZ PAOLA** con número de cuenta **307218216** con la tesis titulada "**IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS SILVESTRES COMO ORGANISMOS CENTINELA EN LA EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA INDUCIDA POR CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS**", realizada bajo la dirección de la DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA
Suplente: DRA. ROCÍO GARCÍA MARTÍNEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO
Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de superarme profesionalmente y aportar conocimiento a la sociedad con la realización de 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: 850450).

A los integrantes del Comité Tutorial:

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por el apoyo con el proyecto, al brindarme consejos, tiempo y conocimientos que permitieron la realización de ésta investigación.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y a la Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo y por sus aportaciones valiosas para mejorar el proyecto en todos sus aspectos.

Dedicatorias

A mi papá, mi mamá y mi hermana, qué cada uno a su manera estuvieron siempre pendientes de todo lo que necesitara, dejando a mi alcance todas las posibles soluciones. Gracias por darme todo el cariño y consejos para ser una gran profesional, pero sobre todo un gran ser humano. Todo se los debo a ustedes y mejor familia no pude haber elegido. ¡Los amo!

A Maru quién me ha enseñado que los sueños se pueden cumplir, y que si hay alguien que te apoya en tus locuras es mil veces más divertido. Gracias por no dudar en ayudarme cuando más lo necesitaba, por quedarte conmigo hasta tarde o los fines de semana en tu laboratorio sufriendo con los cortes de parafina. Gracias por estar al pendiente de mí en los momentos de mayor frustración del proyecto y seguir apoyándome. Mil gracias por seguir conmigo y permitirme enseñarte lo que me gusta hacer y compartirme lo que te gusta a ti. Eres muy importante para mí, te quiero muchísimo.

A Pablo, amigo mil gracias por todo el apoyo brindado, por todas las risas, quejas chismes y experimentos que hicimos juntos para que todo esto pudiera culminarse. Espero que nuestra amistad dure muchos años más sin importar que siga en nuestro futuro. De corazón mil gracias por estar siempre.

A Zeltz, Yun y Adri, que a pesar del tiempo y la distancia, de las nuevos retos personales y los sueños que nos quedan por cumplir, seguimos unidas e igual de ridículas como siempre. Espero tengamos mil experiencias más por compartir. ¡Las quiero!

A Cyn (Quesito), Den, Norberto, Javs y la M. en C. Ana Rosa que se han vuelto amigos, familia y confidentes en las buenas, malas y peores, no saben lo importante que ha sido para mí sus consejos y el apoyo en todo momento.

A Majo por tantos años de amistad al pie de cañón y sin importar la distancia ser la responsable de haber realizado uno de los mejores viajes de mi vida.

Vicky no tengo palabras para agradecerte tanto, nunca dejes de ser esa gran persona y amiga. Sabes que si necesitas algo siempre voy a estar para ti cómo tú lo has estado para mí.

A Mary Rodríguez, ya que sin tu paciencia, ayuda y todo lo que estuviste pendiente, de todos los miles de trámites, tiempos y formatos y a que me correteaste todo el tiempo esto pudo culminarse. Eres una persona increíble y mejor responsable de posgrado no me pudo tocar.

A la M. en C. Flor Navarrete Cisneros por toda la ayuda para realizar el procesamiento de muestras y el análisis de metales pesados y por hacer esos momentos de mucho trabajo muy agradables y divertidos.

A la M. en C. Elizabeth Hernández Álvarez del Laboratorio ICPMS del Instituto de Geofísica de la UNAM, por su apoyo en la determinación de metales pesados en las hojas de las plantas estudiadas.

A la Dra. Reyna Lara Martínez del laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su apoyo en el procesamiento de las muestras, para su análisis morfológico por microscopía óptica.

A la Dra. Sandra Gómez, al Dr. Rafael Valencia y a la Dra. Rocío García por sus valiosas aportaciones y sugerencias para mejorar el trabajo.

A mi familia por apoyar mis locuras y estar siempre que necesitaba algo, y a Baghera y Rashka por darme esos momentos de felicidad y que sólo ustedes saben compartir.

A Moru quién me ha dejado un reto muy grande por delante, prometo seguir mejorando cada día. Me hubiera encantado tenerte aquí. ¡Te extraño!

Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Antecedentes	7
La atmósfera, sus contaminantes y las consecuencias en el ser humano	7
Importancia de las plantas como organismos centinela para el biomonitoreo ambiental	8
<i>Robinsonecio gerberifolius</i> (T. M. Barkley y Janovec, 1998)	10
<i>Senecio roseus</i> (Klatt, 1894)	11
Muerte Celular Programada (MCP)	12
Muerte Celular Programada Tipo I o Apoptosis	12
Muerte Celular Programada Tipo II o Autofagia	15
Muerte Celular Tipo III o Necrosis	16
Expresión de miRNAs	17
Participación de los organelos en la muerte celular programada en plantas	21
Ensayos para la evaluación de muerte celular programada en plantas	23
Expresión de genes de muerte	23
Evaluación de cambios morfológicos en células vegetales	24
Justificación	25
Objetivo general	26
Objetivos particulares	26
Hipótesis	26
Metodología	27
Recolección de plantas nativas	27
Aclimatación de las plantas	27
Exposición a los distintos sitios de estudio	27
Análisis de genes (M8, BCN1, NEP, CYTP450, miR403)	29
Extracción de RNA	29
Cuantificación de RNA	29
Síntesis de cDNA	30
PCR de punto final	30
Evaluación de la morfología celular	32
Descripción de los datos de contaminantes atmosféricos registrados por la RUOA	32
Análisis químico de la acumulación de metales pesados	33
Análisis estadístico	34
Resultados	35
Expresión de genes de muerte celular programada y estrés oxidante	35
Evaluación de cambios morfológicos	40
Detección de contaminantes en los sitios de estudio	44
Análisis químico de la acumulación de metales pesados	47
Discusión	54
Conclusiones	62
Literatura citada	63

Resumen

Se ha asociado a la mezcla de gases contaminantes presentes en la atmósfera de la Ciudad de México con diversas enfermedades de la población. Su efecto se puede estudiar en diversos sistemas biológicos, entre éstos, los vegetales son importantes por constituir gran parte del ecosistema y estar en la base de la cadena alimenticia. Entre las diversas estrategias para abordar este análisis, en este trabajo se eligió la Muerte Celular Programada (MCP), secuencia de eventos que dirigen la destrucción de la célula, ésta comprende tres tipos principales: apoptosis, autofagia y necrosis, cada uno presenta características morfológicas y mecanismos enzimáticos distintivos. Durante la apoptosis en plantas, la pared celular impide la formación de cuerpos apoptóticos, por lo que se ha descrito el término MCP-parecida a la apoptosis (AL-PCD por sus siglas en inglés).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la contaminación atmosférica del Valle de México, en la inducción de MCP empleando a *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus* como modelos, exponiéndolas en cuatro sitios distintos: Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA), Tlalnepantla (Tlal), Ecatepec (Eca) y Altzomoni (Alt), de 0 a 12 semanas en la temporada de secas y de lluvias del 2018. Se realizó el análisis por PCR de punto final de los genes M8, BCN1, NEP, CYTP450 y del miR403 y se evaluaron los cambios morfológicos en las células de las hojas. Los resultados se relacionaron con los valores de contaminantes del aire y las concentraciones de metales pesados acumulados en el tejido foliar.

Ninguno de los marcadores moleculares de MCP se expresó en los testigos negativos de ninguna especie, sitio ni temporada. En las muestras problema, los genes expresados no reflejaron un patrón uniforme en relación a las condiciones de exposición. Asimismo, el gen NEP no se expresó en ninguna de las condiciones evaluadas, por lo que se descartó el evento necrótico. El miR403 se expresó en *R. gerberifolius* en todos los casos durante la temporada de secas, experimentando desregulación en la época de lluvias en algunos sitios y tiempos de exposición, mientras que en *S. roseus*, la expresión-desregulación tampoco tuvo un patrón regular respecto a las variables estudiadas: tiempo de exposición, sitio o temporada. La morfología celular se evaluó en las muestras expuestas en la temporada de lluvias observando en ambas especies una característica morfológica de AL-PCD en plantas, la contracción del protoplasto a partir de la semana 4 de exposición en todos los sitios evaluados.

Se obtuvo de la Red Universitaria de Observatorios Atmosféricos (RUOA), el registro de los contaminantes del aire: CO, NO, NO₂, NO_x, O₃, SO₂, PM₁₀, PM_{2.5}, PM₁₀ y PM CO durante el tiempo de estudio. La concentración de los gases fue muy diversa, sin embargo, la prueba estadística mostró incremento significativo de O₃ en la temporada de secas y de NO, NO₂, y NO_x, en la temporada de lluvias. Los metales pesados acumulados en *R. gerberifolius* y en *S. roseus* fueron Al, Cr, Fe, Ni, Zn, Sb, V, Mn, Co, Cu, Cd y Pb, en general, se observó una mayor capacidad para acumular metales de la primera especie

con relación a la segunda. Asimismo, hubo mayor acumulación durante la temporada de lluvias comparativamente con la temporada de secas.

En conclusión, la exposición de las plantas a los contaminantes atmosféricos desencadenó eventos de AL-PCD en tiempos y temporadas específicas, por lo que las especies estudiadas pueden plantearse como modelos para estudios de biomonitorio de ambientes contaminados. Sin embargo, será importante realizar más evaluaciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas en otras especies vegetales, con la finalidad de corroborar estos resultados ya que las respuestas pueden ser diversas dependiendo de la sensibilidad.

Abstract

The mixture of air pollutants present in the atmosphere of Mexico City has been associated with various diseases in the human population; their effect can be evaluated in many biological systems, such as plants, which are important for constituting a large part of the ecosystems and occupying the lowest trophic level. From the different ways to approach its analysis, in this study Programmed Cell Death (PCD), a sequence of events that lead the destruction of the cell, was chosen. It comprises three main types: apoptosis, autophagy and necrosis. Each of them presents distinctive morphological characteristics and enzymatic mechanisms. During apoptosis in plants, the cell wall prevents apoptotic bodies from forming, so the term apoptosis-like PCD (AL-PCD) was described.

The objective of this research was to evaluate the effect of atmospheric pollution in the Valley of Mexico on PCD induction, exposing *Robinsonecio gerberifolius* and *Senecio roseus* to four different locations: Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA), Tlalnepantla (Tlal), Ecatepec (Eca) and Alzomoni (Alt), from 0 to 12 weeks, in dry and rainy seasons during 2018. End-point PCR analysis was performed in M8, BCN1, NEP, CYTP450 genes and in miR403 and morphological changes in leaf cells were evaluated. The results were associated with air pollutants values and heavy metals concentrations found in leaves.

None of the molecular markers of PCD was expressed in the negative controls of neither species, in any site or season. In the problem samples, the expressed genes did not reflect a uniform pattern in relation to the conditions of exposure. Likewise, NEP gene was not expressed under any of the conditions evaluated, so a necrotic event was discarded. In *R. gerberifolius*, miR403 was expressed in all the cases during the dry season and was downregulated in some of the sites and times of exposure during the rainy season. In the case of *S. roseus*, the expression-downregulation of this miRNA didn't show any regular pattern with respect to the studied variables: time of exposure, season or site of study. Cell-morphology was evaluated in the samples exposed during the rainy season, noticing in both species an AL-PCD morphological feature: protoplast contraction since the fourth week of exposure in all the evaluated sites.

Records of air pollutants CO, NO, NO₂, NO_x, O₃, SO₂, PM₁₀, PM_{2.5} and PM₁₀ were obtained from the University Network of Atmospheric Observatories throughout the present study. The gas concentrations were very diverse; nevertheless, the statistical analysis showed a significant increment of O₃ during the dry season and of NO, NO₂ and NO_x during the rainy season. The heavy metals accumulated in *R. gerberifolius* and *S. roseus* were Al, Cr, Fe, Ni, Zn, Sb, V, Mn, Co, Cu, Cd and Pb. In general terms, a greater capacity for metal accumulation was observed in the first one compared with that of the latter. Likewise, there was a greater accumulation of metals during the rainy season in contrast with the dry season.

In conclusion, exposing the plants to atmospheric pollutants triggered AL-PCD events in specific times of exposure and seasons, so the species selected can be proposed as

models in biomonitoring of polluted environments. However, it will be important to carry out biochemical, physiological and morphological assays in other plant species in order to confirm these results, since responses can vary depending on sensibility.

Introducción

La mezcla de gases contaminantes presentes en la atmósfera de la Ciudad de México se ha asociado con diversos daños a la salud humana, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) clasificó recientemente la contaminación ambiental como carcinogénica para los seres humanos (Grupo 1) y diversos estudios evidencian que la exposición a la misma es causa de cáncer de pulmón (WHO, 2003). Los efectos genotóxicos en plantas son importantes, ya que éstas constituyen gran parte del ecosistema y juegan un papel importante en la cadena alimenticia (Rajput y Agrawal, 2005; Loomis *et al.*, 2013).

Entre los principales contaminantes registrados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) en la Ciudad de México, están los de fase gaseosa como ozono, monóxido de carbono, bióxido de nitrógeno, óxidos de azufre, etc. (Grant, 1994). En ciudades europeas y de Sudamérica, se han realizado numerosos estudios sobre el riesgo que implica la exposición constante a los contaminantes atmosféricos (Pereira *et al.*, 2013). En contraste, en la Ciudad de México este tipo de análisis recibe poca importancia, particularmente en modelos vegetales.

El biomonitoreo *in situ* mediante plantas superiores como organismos centinela se utiliza para caracterizar contaminantes del aire en áreas específicas, dado que permite detectar agentes dañinos antes de que afecten al ser humano, debido a su alta sensibilidad a tiempos cortos de exposición, fácil manejo y mantenimiento económico (Oshima, 1974; Ceretti *et al.*, 2015). Se eligieron las plantas silvestres *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus*, dada su accesibilidad de colecta y a que presentan características importantes para establecerse como biomonitores de la contaminación del aire (Purayannur *et al.*, 2017).

La muerte celular programada (MCP) se define como una secuencia de eventos que dirigen la destrucción de la célula y se describen tres tipos principales: apoptosis, necrosis y autofagia, las cuales tienen rasgos morfológicos característicos que permiten diferenciarlas entre sí (Reape y McCabe, 2010). Asimismo presentan eventos bioquímicos que se asemejan a los que ocurren en los animales como la activación de metacaspasas, beclinas, citocromos o el gen *NEP*, activadores de diversas respuestas de defensa frente al estrés, incluyendo la muerte celular (Pérez *et al.* 2007; van Doorn *et al.* 2011).

Los microRNAs son RNAs no codificantes de cadena sencilla y formados de pocos nucleótidos (17 a 25), son importantes biológicamente por su papel en la regulación genética, tanto por represión transcripcional como por degradación post-transcripcional (Bartel, 2004). Se han asociado a diversas funciones en plantas como el control y desarrollo de hojas y flores, degradación de proteínas y respuesta a estrés ambiental o invasión patógena (Khaksefidi *et al.*, 2015).

Antecedentes

La atmósfera, sus contaminantes y las consecuencias en el ser humano

La atmósfera es una mezcla formada por diversos gases como el nitrógeno (78%), oxígeno (21%) y 1% de otros gases que están en contacto con diversos contaminantes primarios que al interactuar con la radiación solar y los cambios de temperatura pueden generar contaminantes secundarios como el ozono o los dióxidos de nitrógeno (Health Effects Institute, 2010; DeMarini, 2013).

La Ciudad de México fue considerada por la Organización Mundial de la Salud como la más contaminada de América Latina en la década de los noventa, la calidad de su aire puede variar dependiendo de diversos factores como el crecimiento poblacional y vehicular así como el consumo de energía; aunado a la orografía, la alta radiación solar y la altitud (SEDEMA, 2012).

La contaminación del aire genera diversas afectaciones a la salud humana asociadas con habitar y trabajar cerca de avenidas transitadas o en contacto con vehículos automotores o industrias (Janssen *et al.*, 2013). La IARC clasificó recientemente la contaminación atmosférica como carcinogénica para el humano (Grupo 1) debido a estudios que la relacionan con el cáncer de pulmón (WHO, 2005; Loomis *et al.*, 2013). Existen diversas enfermedades asociadas a cada tipo de contaminante del aire, y dado que en su mayoría son gases, pueden entrar por vía respiratoria o cutánea y causar distintos síntomas (Tabla 1) (Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

Tabla 1. Principales contaminantes del aire y su efecto en la salud humana.

CONTAMINANTE	FÓRMULA	EFFECTOS A LA SALUD	LIMITE MÁXIMO PERMISIBLE	NORMA	FUENTE
Monóxido de carbono	CO	Cardiopatías en ancianos Enfermedades respiratorias	11 ppm (8 h)	NOM-021-SSA1-1993	Sheppard <i>et al.</i> , 1999.
Óxidos de nitrógeno	NO _x	Enfermedades respiratorias	0.21 ppm (1 h)	NOM-023-SSA1-1993	Samoli <i>et al.</i> , 2006.
Óxidos de azufre	SO _x	Enfermedades respiratorias Enfermedades cardiovasculares	0.2 ppm (8 h)	NOM-022-SSA1-2010	Sunyer <i>et al.</i> , 2003.
Ozono	O ₃	Enfermedades respiratorias	0.07 ppm (8 h)	NOM-020-SSA1-2014	Gustafsson y Cotgreave, 1996.
Material particulado	PM _{2.5} , PM ₁₀	Enfermedades cardiopulmonares Cáncer de pulmón	45µg/m ³ (24 h), 75µg/m ³ (24 h)	NOM-025-SSA1-2014	Lim <i>et al.</i> , 2012.

Importancia de las plantas como organismos centinela para el biomonitoreo ambiental

Las plantas superiores son muy útiles para realizar biomonitoreo *in situ* para caracterizar contaminantes de un área específica, se han usado desde principios del siglo XX para evaluar diversos grados de daño, generados por factores físicos y químicos del ambiente (Ruston, 1921; Rodrigues *et al.*, 1997). Debido a su alta sensibilidad, estos organismos permiten detectar la presencia de gases contaminantes de la atmósfera como óxidos de azufre y nitrógeno,

ozono, formaldehídos, amoniacos e incluso otras mezclas complejas (Ceretti *et al.*, 2015).

El término centinela se refiere a cualquier organismo no humano que pueda reaccionar ante un contaminante ambiental antes de que impacte sobre los seres humanos y deben reunir ciertas características (Stahl, 1997; Van der Schallie *et al.*, 1999):

- a) Poseer una respuesta al agente a monitorear capaz de ser medida, es decir, ser sensible al reactivo.
- b) Habitar el territorio en el que se va a realizar la prueba.
- c) Contar con una población suficiente de individuos y
- d) Tener una relación íntima con la fuente de exposición.

Las ventajas de usar sistemas vegetales para biomonitoreo radican en que son muy sensibles a tiempos cortos de exposición de diversos agentes, su manejo es sencillo, económico y sustituyen equipos o instrumentos de medición de difícil adquisición (Oshima, 1974; Kovalchuk y Kovalchuk, 2008). Las plantas ejercen un papel vital en las cadenas tróficas, ya que son la base de la producción de energía y alimento, conduciendo a los contaminantes a niveles tróficos superiores (Grant, 1994). Existen distintos modelos de plantas, entre ellos: *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Tradescantia* clon 4430, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capilaris* y *Hordeum vulgare* (Gichner *et al.*, 2009; Valencia-Quintana *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2013).

Los contaminantes atmosféricos se encuentran todo el tiempo en contacto directo con las hojas, e ingresan por difusión pasiva por la apertura de estomas, los cuales son poros localizados en la superficie de todas las hojas donde se realiza el intercambio gaseoso con la atmósfera. La concentración con la que pueden ingresar los gases se controla por la resistencia estomática, ésta se condiciona por el número de estomas y su grado de apertura, si se reduce la

resistencia aumentará la conductancia estomática y esto elevará el flujo de los gases al interior de la hoja. El funcionamiento de los estomas puede afectarse por la temperatura, la humedad relativa del aire, la luz, los nutrientes o la concentración del CO₂ (Bermejo *et al.*, 2007).

***Robinsonecio gerberifolius* (T.M. Barkley y Janovec, 1998)**

Robinsonecio gerberifolius es una planta nativa, de identificación reciente que pertenece a la familia Asteraceae y se encuentra distribuida en México en regiones alpinas o subalpinas como el Pico de Orizaba, el Nevado de Toluca, el Popocatepetl o el Iztaccíhuatl a una altitud entre los 3500 y 4500 msnm. Se caracteriza por ser una planta herbácea perenne de 15 a 33 cm de longitud, con 1 a 3 escapos. Tiene hojas largas pecioladas de superficie gris-verde cubierta de una capa densa de fibras blancas y sus flores crecen en forma de disco en inflorescencias de color amarillo entre los meses de julio y diciembre (Pruski, 2012) (Fig. 1).



Figura 1. *Robinsonecio gerberifolius*.

***Senecio roseus* (Klatt, 1894)**

Perteneciente a la familia Asteraceae, *Senecio roseus* es una planta herbácea perenne, erecta, de 10 a 50 cm de alto, sus flores de color púrpura y rojizo se distribuyen en cabezuelas y sus tallos son huecos. Presenta hojas basales en forma de roseta, que de forma gradual se van volviendo angostas y las hojas superiores son bractiformes y sésiles. Se encuentra localizada en laderas de altas montañas a altitudes de 3000 a 4000 msnm, principalmente en bosques de *Pinus hartwegii* con pastizal y en las praderas alpinas y subalpinas. En México se ha reportado en el Nevado de Colima, Nevado de Toluca, la Malinche, el Pico de Orizaba, el Cofre de Perote y en algunas Montañas de Oaxaca (Fig. 2) (Calderón y Rzendowski, 2005). Las plantas utilizadas para este estudio presentan características evolutivas similares al pertenecer ambas a la familia Asteraceae, Tribu Senecionaceae y localizarse en áreas de distribución similares (Pelser *et al.*, 2007).



Figura 2. *Senecio roseus*.

Muerte Celular Programada (MCP)

La MCP se define como una secuencia de eventos que dirigen la muerte de la célula. Existen diversos estudios de la MCP en relación a los genes pro y anti-apoptóticos que controlan las actividades celulares (Danial *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los reguladores pueden modular una variedad de funciones celulares y mitocondriales generando diversos metabolitos modificados y la homeostasis celular (Murphy *et al.*, 2005).

Actualmente, hay teorías que indican que estas vías posiblemente ocurrieron en organismos unicelulares, aunque la idea de un suicidio celular no es del todo ventajosa en la naturaleza. Otras se refieren al hecho de que pueden formar colonias para garantizar su existencia. La MCP se basa en un mecanismo estricto de diferenciación celular durante varias etapas de desarrollo de las plantas, la coincidencia del número de células de su entorno y la defensa contra daño genético e infecciones, buscando la eliminación de células afectadas. Asimismo, cabe destacar que para que exista un evento de MCP se tienen que relacionar distintos programas y funciones efectoras de muerte (Ameisen, 2002).

Muerte Celular Programada Tipo I o Apoptosis

Existen características comunes entre la apoptosis de animales y plantas por lo que probablemente ambas provengan de un mismo ancestro unicelular (Lockshin y Zakeri, 2004). Sin embargo en células animales se presenta la formación de cuerpos apoptóticos y la presencia de células fagocíticas, las cuales no se han reportado en organismos vegetales (Reape y McCabe, 2010). Estas células no están en plantas debido a que la pared celular impide la ruptura de la célula en cuerpos apoptóticos y su respuesta es la vacuolización del citoplasma (Pérez *et al.* 2007; van Doorn *et al.* 2011).

Debido a esto se considera que las plantas presentan una muerte celular programada tipo-apoptosis (AL-PCD) (por sus siglas en inglés), la cual está involucrada en distintas etapas de su ciclo de vida, durante todo su desarrollo y hasta la senescencia (Beers, 1997; Rogers, 2005; Reape y McCabe, 2008).

La AL-PCD presenta como característica morfológica principal; la contracción del protoplasto lejos de la pared celular, que es mayor a medida que la condición de estrés aumenta (Reape y McCabe, 2013). Las plantas a su vez presentan mecanismos enzimáticos similares a la apoptosis de células animales por medio de meta caspasas (MC) que son proteasas activadoras de la muerte celular. Estas moléculas son generadas en la mitocondria, activadas por medio del citocromo C, lo que amplifica la activación de diversas proteasas (Reape y McCabe, 2008). El citocromo C durante la regulación de la AL-PCD puede generar rupturas en la cadena transportadora de electrones dentro de la mitocondria, que genera especies reactivas de oxígeno (EROs) que causarán una señal de inducción de estrés mayor, similar al producido al exponer a la célula a ácido salicílico o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la guiará a diversas vías de muerte (Jabs, 1999; Reape y McCabe, 2008, 2010, 2013).

Se han reportado nueve MC diferentes en *Arabidopsis thaliana*, estas están divididas en dos grupos principales: las tipo I (MC1-3) y las tipo II (MC 4-9) basadas en su estructura y similitud de la secuencia; ambos tipos tienen un dominio catalítico conservado tipo caspasa formado de dos subunidades. Las tipo II son exclusivas de plantas y no presentan pro dominios ni dedos de zinc, por lo que se cree que las tipo I son la unión evolutiva con los ancestros fotosintéticos (Fig. 3) (Coll *et al.* 2010; Ohja *et al.*, 2010). Cada MC tiene un papel específico en el organismo y se activan a diferentes pH dependiendo de su función y localización dentro de la célula (Lam y Zhang, 2012). Además de tener variadas acciones celulares, necesitan puntos de activación distintos: la MC 1 se encuentra en el cloroplasto y es un regulador positivo de la muerte

celular por lesiones (Castillo-Olamendi *et al.*, 2007), la MC 8 se relaciona con estrés oxidante por UV y H₂O₂ y se activa a pH básico (He *et al.*, 2008) y la MC 9 está en apoplasto y requiere pH bajo, por mencionar algunos casos (Fig. 4) (Hoeberichts *et al.*, 2003).

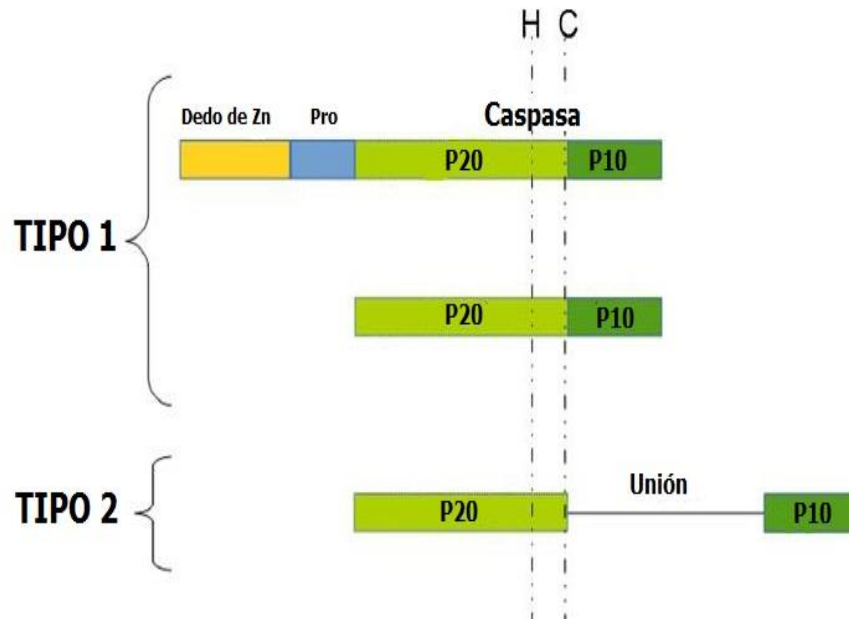


Figura 3. Estructura de las MC tipo I y II en plantas (modificado de Fagundes *et al.*, 2015).

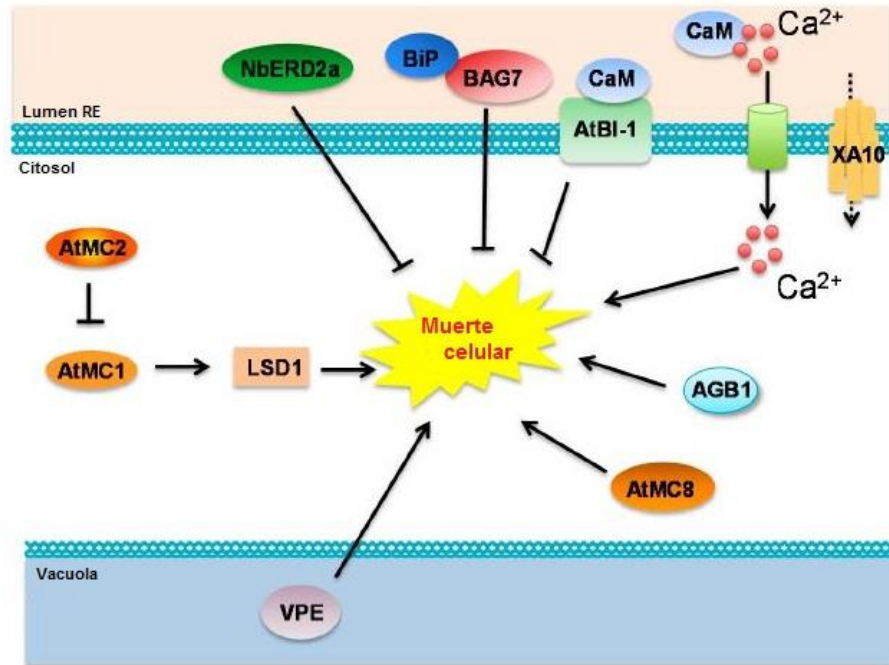


Figura 4. MC 1 y 8, iniciadores de muerte celular en plantas (modificado de Korner *et al.*, 2015).

Muerte Celular Programada Tipo II o Autofagia

La autofagia se considera como un mecanismo de citoprotección contra patógenos, en comparación con los animales, en plantas se encuentra ampliamente relacionado con eventos de enfermedad y desarrollo (Van der Wilden *et al.*, 1980). Se pueden describir diversas características morfológicas que indican este tipo de muerte: primero la formación masiva de autofagosomas y la organización del citoplasma y organelos en vacuolas líticas relacionado con la expansión de éstas y la ruptura del tonoplasto; como segundo punto se sugiere la degradación del cloroplasto durante la senescencia y finalmente la relación de la maquinaria autolítica que juega un papel principal en la respuesta de hipersensibilidad (RH) contra patógenos (Wittenbach *et al.*, 1982; Ishida *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009) (Fig. 5 y 6).

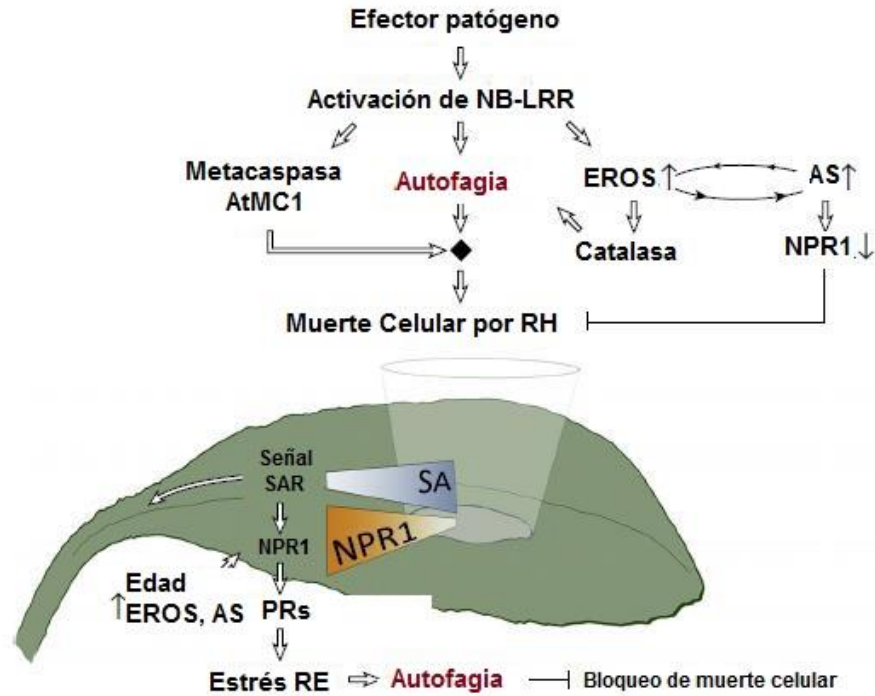


Figura 5. Vía de activación de autofagia en plantas por RH (modificado de Minina *et al.*, 2014).

Muerte Celular Tipo III o Necrosis

La necrosis es una muerte descontrolada en la que la célula pierde su capacidad de osmorregulación inundándose de iones y agua, debido a la incapacidad de activar vías apoptóticas (Lennon *et al.*, 1991). Durante este evento aumenta la fuerza osmótica de la célula. Principalmente, se causa por altas dosis de radiación UV-B o por altos niveles de estrés (Mammone *et al.*, 2000). En plantas se considera como una respuesta de hipersensibilidad, estando relacionada con otros tipos de muerte e incluso puede comenzar de forma accidental y terminar en vías programadas (Sansón y Zavaleta, 2011) (Fig. 6).

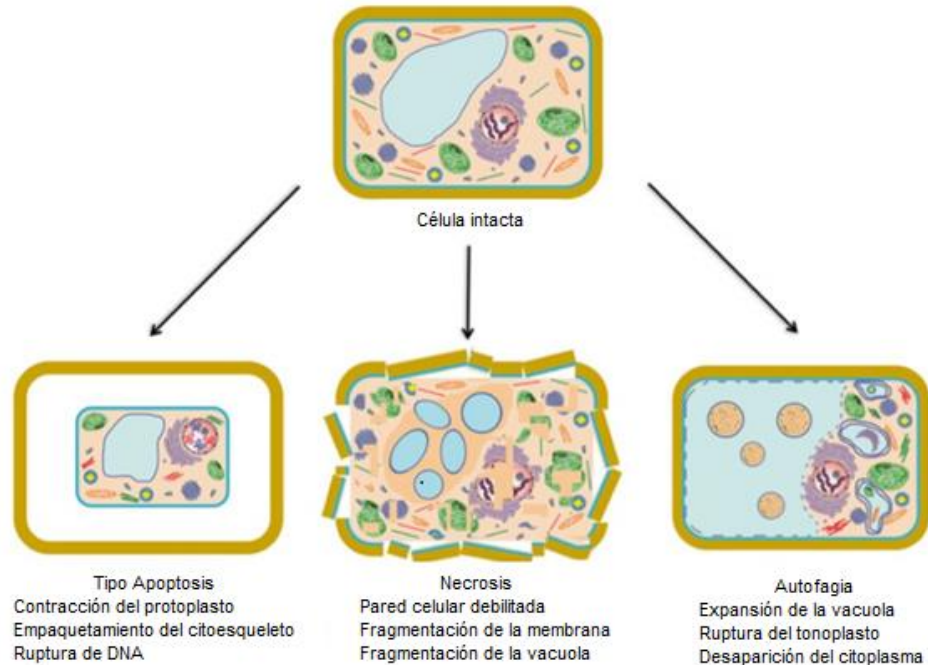


Figura 6. Características morfológicas de los distintos tipos de muerte celular en plantas (Modificado de Gunawardena y McCabe, 2015).

Expresión de miRNAs

Tanto el estrés biótico como el abiótico generan diversos cambios fisiológicos en las plantas como respuesta a condiciones adversas. Esto se realiza por la reprogramación de sus actividades celulares a través de mecanismos de regulación de múltiples genes incluyendo eventos post-traduccionales. Para que se lleve a cabo la traducción y las células puedan regular una gran variedad de funciones biológicas, se necesita realizar el proceso de transcripción en el que se generan moléculas de RNA. Solo el 4% es codificante, conocido como RNA mensajero (mRNA) y el 96% restante forma parte del RNA no codificante, el cual cumple varias funciones dentro de la célula y existen tipos, como son: RNA ribosómico (rRNA), que forma a los ribosomas donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas; RNA de transferencia (tRNA), que actúa en la síntesis de proteínas aportando los anticodones al mRNA; los RNA nucleares pequeños (snRNA o U-RNA), que actúan en el corte

y empalme; los RNA nucleolares pequeños (snoRNA), que modifican al rRNA; los RNA interferentes pequeños (siRNA); y los microRNA (miRNA) que regulan la expresión de genes individuales (Brown, 2008; Khaksefidi *et al.*, 2015).

Los miRNAs, son RNAs de cadena sencilla que varían de tamaño desde 17 hasta 25 nucleótidos (nt); todos sus precursores presentan estructuras de tipo tallo y asa y en general se transcriben de regiones intergénicas de forma individual o en grupos que están contenidos en un solo transcrito (Bartel, 2004).

Para la biogénesis de miRNAs en plantas, los genes se transcriben por las RNA polimerasas II o III y este transcrito primario se llama pri-miRNA, la proteína DCL1 ("Dicer-Like 1") procesa los pri-miRNAs a pre-miRNAs y después éstos son transformados a RNAs pequeños de doble cadena (Flores *et al.*, 2007). Se puede observar que el extremo 3' del miRNA maduro está metilado por la proteína HEN1, lo cual no se encuentra en los miRNAs de animales. Ya que están procesados los miRNAs dúplex de 21 pb se transportan al citoplasma por Hasty por medio de un mecanismo dependiente de RAN-GTP y ahí son reclutados por el complejo RISC, en el cual una de las hebras es degradada para dar lugar al RNA maduro (Fig. 7) (Yang y Li, 2012).

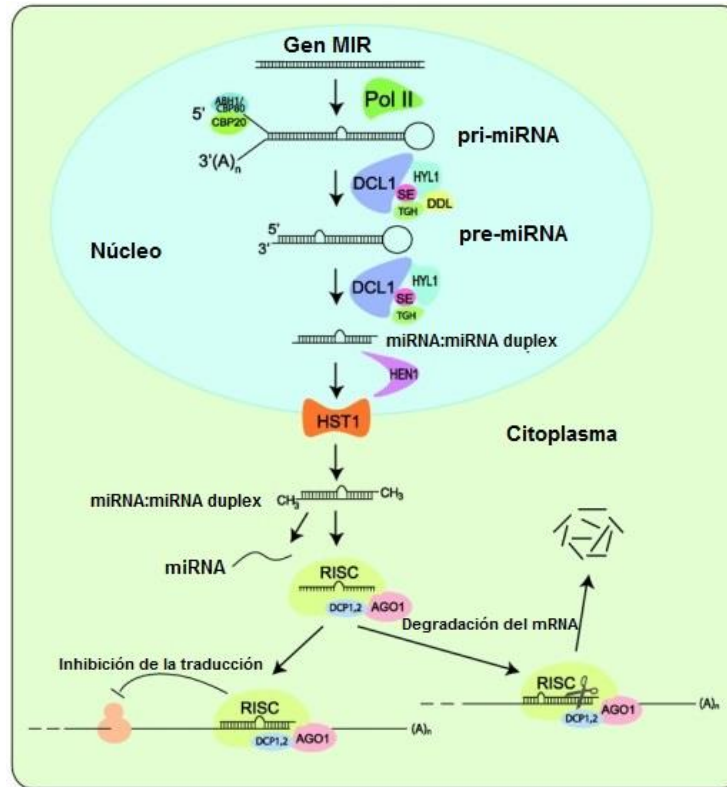


Figura 7. Biogénesis de miRNAs en plantas (modificado de Yang y Li, 2012).

La importancia del papel biológico que tienen los miRNAs está referida directamente a la regulación genética, tanto por represión transcripcional como por degradación post-transcripcional (Dugas y Bartel, 2004). Se han asociado a diversas funciones como el control de la proliferación celular, muerte, patrones neuronales en nematodos y en plantas se relacionan con el control y desarrollo de hojas y flores, degradación de proteínas y respuesta a estrés ambiental o invasión patógena (Aukerman y Sakai, 2003; Emery *et al.*, 2003; Johnston y Hobert, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Chen, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Actualmente, se hacen diversos experimentos tipo Northern blot para comprobar la expresión individual de los miRNAs en cuestión (Unver *et al.*, 2010; Kantar *et al.*, 2010, 2011).

Existen diversos miRNAs que se expresan en distintas condiciones de estrés por varios factores abióticos, como pueden ser la exposición a metales

pesados, alta salinidad, estrés hídrico, bajas o altas temperaturas, gases contaminantes, estrés oxidante o mecánico (Jin *et al.*, 2013; Panahi *et al.*, 2013; Barrera-Figueroa *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Se ha reportado que el miRNA 403 (miR403) varía su expresión dependiendo de las condiciones de estrés a las que se exponga, aumenta en presencia de altas temperaturas y está relacionado con su asociación a agentes químicos tóxicos, es de gran importancia ya que regula la expresión del gen AGO2 (Fig. 8), el cual está involucrado en varias vías de RNAs pequeños de silenciamiento de genes post-traduccionales relacionados a fenómenos epigenéticos como la metilación del DNA dirigida por RNA, la regulación de miRNAs mediados por la escisión del RNA llevado a cabo por otros miRNAs durante condiciones de estrés y juega un papel antiviral en las plantas (Ronemus *et al.*, 2006; Khaksefidi *et al.*, 2015).

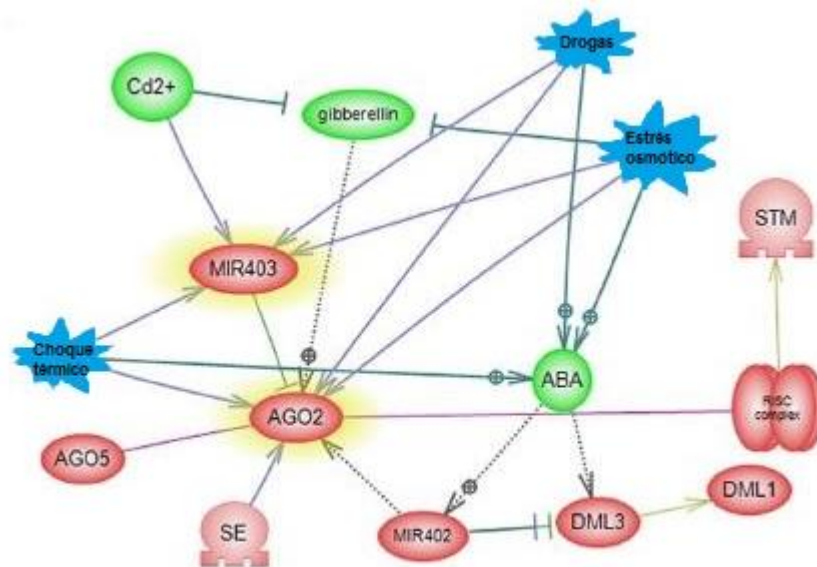


Figura 8. Papel del miRNA 403 con genes de desarrollo y fenómenos epigenéticos (modificado de Khaksefidi *et al.*, 2015).

Participación de los organelos en la muerte celular programada en plantas

Los eventos de MCP son ordenados y requieren de energía para el correcto control y ejecución del proceso, por lo que las mitocondrias y cloroplastos junto con otros organelos son elementos importantes para su regulación (Fig. 9).

Las plantas, como la mayoría de los seres vivos dependen del metabolismo de óxido-reducción de las mitocondrias, el cual en las hojas está estrechamente relacionado con los cloroplastos y con el núcleo (Pesaresi *et al.*, 2006; Nunes-Nesi *et al.*, 2005; Noctor *et al.*, 2007). Asimismo, se relaciona con otras funciones celulares como la homeostasis del calcio, el cual está involucrado en vías de muerte celular en y con canales de potasio sensibles a ATP en la membrana interna de la mitocondria que se relaciona con la permeabilidad de la membrana y puede incrementar su tamaño, permitiendo la liberación del citocromo C (Petrucci *et al.*, 2004; Giacomello *et al.*, 2007). La alteración de la permeabilidad se relaciona con eventos de MCP (Arpagaus *et al.*, 2002; Curtis y Wolpert, 2002; Diamond y McCabe, 2007; Scott y Logan, 2007 y 2008).

La liberación de citocromo C desde las mitocondrias ha sido demostrada en una gran variedad de plantas, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Yao *et al.*, 2004) y *Vicia faba* (Cortés-Eslava *et al.* 2018). Sin embargo, los mecanismos de acción no están del todo claros. Por otro lado, han encontrado una nucleasa dependiente de Mg^{2+} que está relacionada con la fragmentación del DNA de forma similar a la endonucleasa G de células animales (Balk *et al.*, 1999, 2003; Balk y Leaver, 2001; Vacca *et al.*, 2006).

Los cloroplastos son organelos responsables de los procesos fotosintéticos en las plantas, están relacionados con eventos de MCP por medio de las enzimas metabólicas denominadas porfirinas, importantes en la síntesis de clorofilas (Yaeno y Matzuda, 2004; Zapata *et al.*, 2005). En estos organelos se

encuentra el complejo Ndh, homólogo al complejo I de la mitocondria y proporciona electrones para el mantenimiento del estado redox para optimizar la producción de ATP; si aumenta la actividad de estos complejos disminuye el ciclo de Calvin y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) generando una cantidad insuficiente de H_2O_2 para eliminar los electrones y por lo tanto el cloroplasto produce O_2^- , daño oxidante y menor producción de ATP (Robert *et al.*, 2009). Asimismo, la relación con el complejo NADPH oxidasa juega un papel importante en la modulación de señales de desarrollo y defensa de las plantas (Casano *et al.*, 2000; Yao y Greenberg, 2006). Además, se ha encontrado que tratamientos con difenilenodonio (DPI), inhibidor del complejo NADPH oxidasa, suprime parcialmente la activación del proceso de autofagia bajo condiciones de estrés foto oxidante (Vanhee *et al.*, 2011; Pérez-Pérez *et al.*, 2012).

El retículo endoplásmico juega un papel importante en el restablecimiento de la homeostasis celular por acumulación de proteínas mal plegadas, señal de estrés que induce la expresión de chaperonas y otras proteínas relacionadas (Ron y Walter, 2007). Estas proteínas mal plegadas se translocan a citosol y se degradan vía proteosoma y autofagia, si las plantas sufren algún nivel de estrés en el retículo endoplásmico se induce autofagia igual que en animales y levaduras (Liu y Bassan, 2012; Robert, 2012).

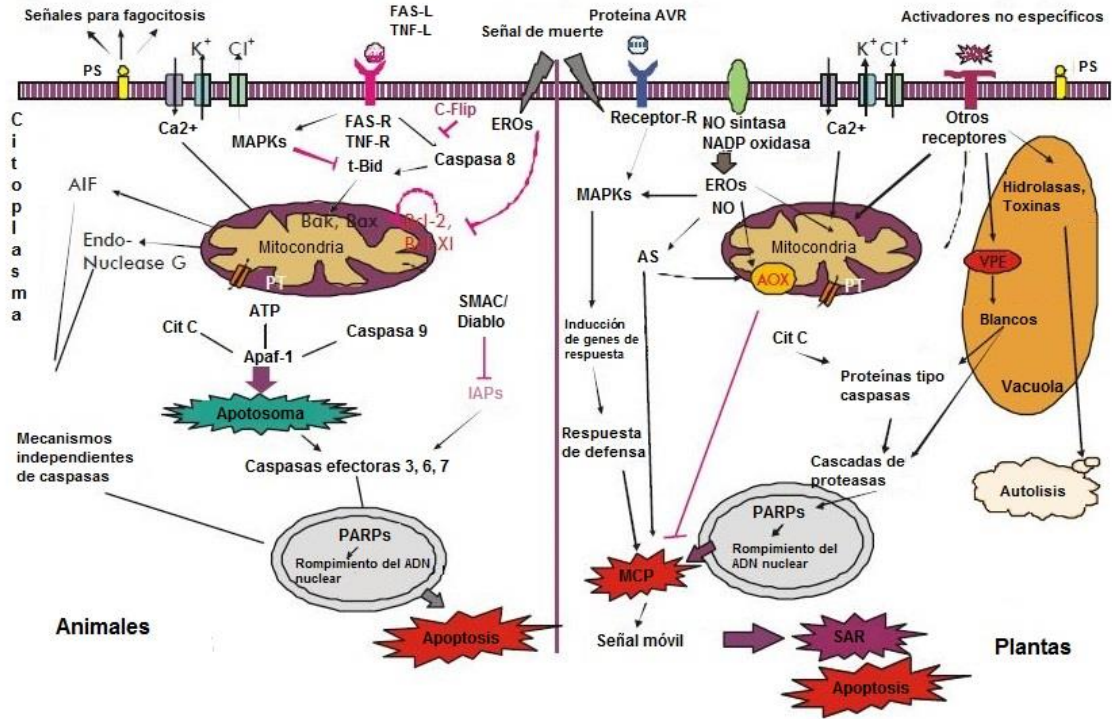


Figura 9. Relación de la MCP en animales y plantas con los diversos organelos celulares (modificado de Borrás *et al.*, 2006).

Ensayos para la evaluación de muerte celular en plantas

Expresión de genes de muerte

Para evaluar la presencia de MCP en los seres vivos existen técnicas que determinan la activación de moléculas que inician estos procesos, pueden elegirse diversos marcadores moleculares que indican si la detección es en una fase temprana (M8) o si está relacionada con algún tipo de estrés específico. Si estos marcadores se expresan (M8, BCN1, NEP, CYTP450) sugieren que las vías de señalización se están llevando a cabo como respuesta a cambios en el entorno o en el interior de las células (Benjamin *et al.*, 1998).

Evaluación de cambios morfológicos en células vegetales

En las células vegetales, la MCP puede observarse a través de cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la condensación de la cromatina. Si el proceso avanza se percibirá fragmentación nuclear y cambios en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico que se fusiona con la membrana plasmática. Estas modificaciones, así como la aparición de cuerpos apoptóticos pueden apreciarse por microscopía de luz de campo claro o fluorescencia donde se nota la organización celular, y si se quieren evidenciar cambios en la mitocondria o el retículo se recomienda utilizar la microscopia electrónica (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Alfaro *et al.*, 2000).

Justificación

La contaminación ambiental es una problemática mundial que afecta la salud de los seres vivos y en especial del humano. El uso de organismos centinela permite contar con alertas sobre las reacciones biológicas de los organismos frente a xenobióticos, antes de que impacten en el desarrollo de enfermedades. El uso de las plantas silvestres *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus*, como biomonitores de contaminación del aire carece de investigaciones asociadas; por lo que este estudio permitirá establecerlas como sensores biológicos permitiendo observar los efectos inmediatos, además de evaluar su capacidad de bioacumulación y sus repercusiones.

Asimismo, la correlación de la respuesta biológica con la determinación química de los metales pesados acumulados en las hojas y el análisis espectroscópico de los contaminantes presentes en el aire, puede aportar información para lograr conclusiones importantes.

Objetivo general

Evaluar el efecto de contaminantes atmosféricos y su acumulación en la inducción de muerte celular programada y expresión del miR403, empleando como organismos blanco dos plantas silvestres en tres sitios urbanos y uno rural del Valle de México durante las temporadas de secas y lluvias del 2018.

Objetivos particulares

- Valorar la expresión de genes de muerte celular programada y del miR403 en *Robinsonia gerberifolius* y *Senecio roseus* expuestas a sitios con distinto grado de contaminación.
- Observar los cambios morfológicos presentes en las células de las estructuras foliares de las plantas.
- Relacionar el contenido de metales pesados acumulados en las hojas y el análisis espectroscópico de los contaminantes atmosféricos presentes en los sitios de estudio con la respuesta celular.

Hipótesis

Dado que diversos contaminantes atmosféricos causan muerte en las células vegetales, se espera que al exponer plantas de *R. gerberifolius* y *S. roseus* a sitios urbanos y rurales del Valle de México con distinto grado de contaminación, se observará una respuesta diferencial que conduzca a muerte celular programada y a la inducción del miR403, en los diferentes sitios y temporadas de exposición.

Metodología

Recolección de plantas nativas

Se realizó manualmente la recolección de 40 individuos de cada una de las plantas nativas (*Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus*) en el Parque Nacional Izta-Popo de forma cuidadosa, para obtener a los individuos íntegros, sin generarles estrés o lesiones en algún tejido.

Aclimatación de las plantas

Las plantas fueron transportadas en contenedores con agua potable al laboratorio de Genotoxicología Ambiental en el Centro de Ciencias de la Atmósfera en Ciudad Universitaria. Se mantuvieron en estos recipientes por tres a cinco días para ayudar a la generación de nuevas raíces y permitir su recuperación del estrés del traslado. Posterior a este tiempo se colocaron en macetas limpias con tierra esterilizada libre de contaminantes y microorganismos teniendo cuidado de no dañar las hojas o raíces. Se mantuvieron en condiciones controladas de luz (12 horas luz/12 horas oscuridad), agua (20%) y temperatura (19 °C) y bajo observación por 4 semanas, finalmente se realizó la selección de las plantas asegurando que se encontrarán en estado óptimo para la experimentación.

Exposición a los distintos sitios de estudio.

Se realizó la exposición de las plantas en 4 sitios, tres urbanos: Tlalnepantla (Tlal) (19.5290 N, 99.2045 O), Ecatepec (Eca) (19.5329 N, 99.0303 O) y el Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA) (19.3262 N, 99.1761 O) y uno con menor tráfico vehicular y no industrial: Alzomoni (Alt) (19.0707 N, 98.3918 O), localizado dentro del Parque Nacional Izta-Popo en el Estado de México. El testigo se mantuvo bajo las mismas condiciones controladas de la aclimatación, dentro de una cámara de crecimiento libre de contaminantes. En cada sitio de

estudio las macetas se colocaron sobre dispositivos que las mantuvieron hidratadas durante los tiempos de exposición y se protegieron de la lluvia, manteniéndolas durante lapsos de 0 a 12 semanas. La colecta de muestras se realizó a distintos tiempos de exposición (0, 4, 8 y 12 semanas), siendo la temporada de secas la semana 4 del 23 de enero al 20 de febrero, la semana 8 al 20 de marzo y la semana 12 al 17 de abril; y la temporada de lluvias la semana 2 del 3 de septiembre al 17 de septiembre, la semana 4 al 1 de octubre, la semana 8 al 29 de octubre y la 12 al 26 de noviembre del 2018. Posteriormente, se trasladaron de nuevo al laboratorio y se sometieron a diversas pruebas para evaluar la inducción de muerte celular en cada una de las especies y en cada una de las temporadas de secas y lluvias del 2018 (Jaúregui, 1995) (Fig. 10).



Testigo



Tlalnepantla



Ecatepec



Altzomoni



**Centro de Ciencias
de la Atmósfera**

Figura 10. Sitios de exposición de cada una de las especies.

Análisis de genes (M8, BCN1, NEP, CYTP450, miR403)

Extracción de RNA

Las hojas de las plantas expuestas fueron pesadas y congeladas en la fecha de recolección. Posteriormente, se homogeneizaron con trizol (1 mL por 50-100 mg de tejido) y se incubaron por 5 minutos a una temperatura de 15 a 30 °C para permitir la disociación completa de los complejos núcleo proteicos. Se agregaron 200 µL de cloroformo por 1mL de trizol, se agitaron con vórtex por 15 segundos y se incubaron a una temperatura de 15 a 30 °C por 2 a 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 9,200 g por 15 minutos entre 2 y 8 °C. Al salir de la centrifuga se observaron tres fases: una roja en la parte inferior, una interfase fenol/cloroformo y una superior acuosa incolora. El RNA se tomó de la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio con 0.5 mL de isopropanol por 1 mL de trizol. Las muestras se incubaron a 4 °C por 24 horas y se centrifugaron a 9,200 g por 10 minutos entre 2 y 8 °C. El RNA se precipitó formando un botón al fondo del tubo, se decantó el sobrenadante, se lavó dos veces con etanol al 75% (1 mL de etanol por 1 mL de trizol). Se homogeneizó con vórtex y se centrifugó a 2,300 g por 5 minutos a 2 a 8 °C. Se dejó secar el botón de RNA al aire de 5 a 10 minutos, posteriormente se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de RNA

Se determinó la concentración y pureza del RNA total de cada muestra en un espectrofotómetro de UV para micro volúmenes Nanodrop-1000 (NanoDrop Lite Printer, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 nm, colocando un volumen de 2 µL de cada una de las muestras obtenidas previamente por extracción.

Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA se realizó empleando el "Kit" de Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis con la mezcla de reactivos específicos, para el cual se empleó una concentración de RNA final de 20 ng/μL. Las condiciones utilizadas en el termociclador (BIORAD- MJ MINI, modelo PTC-1148) fueron: ciclo 1 a 37 °C por 60 minutos, ciclo 2 a 70 °C por 15 minutos, ciclo 3 a 22 °C por 2 minutos y un último ciclo a 4 °C; a esta temperatura se mantuvieron hasta su uso.

PCR de punto final

La PCR de punto final se realizó mezclando reactivos específicos marca Thermo Scientific junto con los oligonucleótidos de cada uno de los genes estudiados (Tabla 2), los cuales fueron diseñados previamente y el cDNA sintetizado para cada una de las diversas condiciones evaluadas. Las muestras fueron colocadas en el termociclador y las condiciones aplicadas fueron: ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, ciclo de amplificación que consta de tres pasos, el primero a 94 °C por 30 segundos, el segundo a 42 -53 °C (dependiendo del gen en cuestión) por 30 segundos y el tercer paso a 72 °C por 30 segundos, repitiendo este proceso 40 veces; posteriormente se inició un ciclo a 72 °C por 5 minutos y un último ciclo a 20 °C por 5 minutos. Se mantuvieron las muestras a 4 °C hasta su corrimiento en los geles de poliacrilamida al 10% revelados con nitrato de plata, colocando un volumen final de 10 μL (5 μL productos de PCR + 5 μL de amortiguador 2x de carga de urea). Se corrió la electroforesis a 110 voltios durante 60 minutos. Y se capturó la imagen del gel obtenido analizando el peso molecular de cada una de las bandas observadas.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión de los genes estudiados por reacción en cadena de la polimerasa.

GEN	ESPECIE	SECUENCIA (5´-3´)	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO	Tm (°C)
AtmiR-403-F	<i>A. thaliana</i>	CGGCGTTAGATTCACGCACA	75	58
AtmiR-403-RT	<i>A. thaliana</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA		71
qAt-METACAS8-F	<i>A. thaliana</i>	TAG AGG AGA GAT AGA ATT AGA G	99	47
qAt-METACAS8-R	<i>A. thaliana</i>	CCC GGT TTG TTC CTT GAG AA		55
qAt-BCN1LIKE-F	<i>A. thaliana</i>	GATCGATCCGAATCTGCCG	100	56
qAt-BCN1LIKE-R	<i>A. thaliana</i>	AATCGACGCCGACGATGGT		59
DandeCYTP450-F	<i>T. officinale</i>	GATGTATTGATGGCGCACAG	102	60
DandeCYTP450-R	<i>T. officinale</i>	GAAATCGAGTCCGCCGGTG		55
To-NEP1-F	<i>T. officinale</i>	CAC AGA GCA AAA GGA AGA AAC	78	52
To-NEP1-R	<i>T. officinale</i>	CAT CGG TGA CGG TGA AAT C		54
DandeKNOX-1-F	<i>T. officinale</i>	ATCATCTGAAGAAGATCTGGAT	105	54
DandeKNOX-1-R	<i>T. officinale</i>	TCAACTCCTCTTCTTCAGCTT		55

Evaluación de la morfología celular

De las hojas se cortaron trozos de 1 cm² aproximadamente y se fijaron en paraformaldehído 4% por 60 min a 4 °C y se realizaron 3 lavados con PBS frío de 5 minutos cada uno. La deshidratación se realizó con cambios graduales de metanol (30 y 50%) a 4 °C y posteriormente metanol (70 y 90%) a -20 °C por 5 min cada uno. Se continuó con una pre-inclusión en metanol 90%:Lowycril (1:1) por 60 min, se pasaron a metanol 90%:Lowycril (1:2) por 60 min, posteriormente se colocaron en Lowycril puro por 60 min, 20 h y 1 h respectivamente, realizando todos los pasos a -20 °C. Para concluir las muestras se colocan en cápsulas para polimerizar a -20 °C por 24 h bajo luz UV y finalmente se dejan 24 h a temperatura ambiente en presencia de luz UV. Se realizaron los cortes de 2 µm de grosor en un ultramicrotomo colocándose en portaobjetos previamente cubiertos con poli-d-lisina (1:50 v/v). Se tiñeron con azul de toluidina al 0.5 % por 10 seg, se fijaron acercando a la llama del mechero y se retiró el exceso de colorante con agua destilada. Se observaron al microscopio óptico Zeiss modelo AXIO Scope. A1 con un aumento de 40x y se capturaron las fotos con una AXIOcam ICc5 para su posterior análisis.

Descripción de los datos de contaminantes atmosféricos registrados por la RUOA

Para tener una relación de los contaminantes presentes en los distintos sitios estudiados se ingresó a las páginas electrónicas www.aire.cdmx.gob.mx y www.ruoa.unam.mx y se descargaron los datos referentes a los tiempos de exposición de ambas temporadas, Estos se obtuvieron de la Red Universitaria de Observatorios Atmosféricos (RUOA). Posteriormente se calculó la media de cada una de las fechas y se compararon con los resultados obtenidos en los otros ensayos.

Análisis químico de la acumulación de metales pesados

Para el análisis de metales se lavaron las hojas con agua destilada, se colocaron en toallas de papel absorbente y se dejaron en el horno por 7 días entre 50 y 60 °C para su secado, se maceraron manualmente y posteriormente se pesaron 0.2 g de muestra y se les adicionaron 5 mL de ácido nítrico ultra puro. Se dejaron en pre digestión toda la noche dentro de una campana de extracción y a continuación se utilizó un digestor UltraWAVE marca Milestone. Al terminar este proceso de digestión por microondas, las muestras se enfriaron y se aforaron a 50 mL con ácido nítrico al 2%, se filtraron, etiquetaron y almacenaron hasta su análisis. Por cada 10 muestras de plantas se digirieron dos replicas Materiales de Referencia Certificados (MRC), 1547 Peach Leaves del NIST (Tabla 3), dos duplicados de muestras elegidas al azar y un blanco reactivo para monitorear posible aportación de contaminantes. Las mediciones de las muestras procesadas se realizaron con el apoyo de personal del Laboratorio ICP-MS del Instituto de Geofísica de la UNAM por el método de Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (por sus siglas en ingles ICP-MS), modelo iCAP Qc de la marca Thermo Scientific.

El instrumento fue optimizado previamente al análisis de las muestras, con una solución certificada acuosa de la marca High Purity Standards, la cual contiene un amplio intervalo de masas (Li, Co, In, Ba, Bi, Ce y U de $1\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente). Para el análisis de metales, se realizó una curva de calibración con 16 puntos (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 y $500\mu\text{g L}^{-1}$), a partir de una solución multielemental certificada acuosa de la marca High Purity Standards (QCS-26).

Tabla 3. Control de calidad para el MRC- 1547 Peach Leaves. (L.D.= Limite de detección; %DPR= Desviación Porcentual Relativa).

	L.D.	Certificado	Promedio (n=10)	Precisión %DPR	Exactitud %Error	%Recuperación
	$\mu\text{g L}^{-1}$	mg Kg^{-1}				
Al	0.7718	249	267.908	3.784	7.594	107.594
V	0.0065	0.37	0.351	6.060	5.192	94.808
Cr	0.0034	1	1.032	1.177	3.197	103.197
Mn	0.0083	98	94.936	2.876	3.127	96.873
Fe	0.5063	218	206.295	0.215	5.369	94.631
Co	0.0044	0.07	0.055	4.693	21.998	78.002
Ni	0.0354	0.69	0.752	0.307	8.992	108.992
Cu	0.8756	3.7	3.496	2.651	5.518	94.482
Zn	0.1781	17.9	13.935	2.607	22.153	77.847
As	0.0744	0.06	0.056	17.733	5.965	94.035
Cd	0.0016	0.026	0.025	12.013	2.750	97.250
Sb	0.0082	0.02	0.020	3.727	1.135	98.865
Pb	0.0248	0.87	0.768	2.926	11.776	88.224

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de contaminantes atmosféricos, se calcularon las medias de los valores obtenidos por la RUOA, RAMA y REDMA y se compararon los sitios y los tiempos de exposición de las temporadas de secas y lluvias. En el caso de los metales pesados se compararon las distintas condiciones experimentales contra el testigo. Se realizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis en el programa Graphpad Prism 6.0 considerando las diferencias significativas con una $p < 0.05$; en los casos donde existió una diferencia significativa entre las condiciones estudiadas se aplicó una prueba post hoc de Dunn.

Resultados

Expresión de genes de muerte celular programada y estrés oxidante.

Se obtuvo la expresión de diversos marcadores de eventos de muerte celular y estrés oxidante mediante PCR de punto final durante las temporadas de secas y lluvias en los distintos tiempos y sitios de exposición para ambas especies vegetales. Las bandas obtenidas se muestran en geles de poliacrilamida teñidos con plata en las figuras 11 a 14. Para validar el procedimiento, se corrió como constitutivo (Cons) el gen *Knox-1* de *T. officinale*.

En la figura 11 se observa la expresión del gen apoptótico M8 durante la temporada de secas en CCA semana 4.

El gen marcador de autofagia BCN1 se expresó en CCA y Alt semana 4, Tlal y Alt semana 8 y CCA semana 12 en secas; así como en lluvias en CCA, Tlal y Alt semana 4, Tlal semana 8 y CCA, Eca y Alt semana 12.

El estrés oxidante se detectó mediante el gen CYTP450 y el miR403 mostrándose el primero en secas en CCA y Alt semana 4, Alt semana 8 y CCA, Eca y Alt semana 12, mientras que el miR403 únicamente se registró en CCA semana 4. En la temporada de lluvias el CYTP450 se observó en CCA, Tlal y Alt semana 4 y Tlal semana 8. El otro marcador de estrés, el miR403 mostró desregulación en Tlal y Alt semana 2, CCA semana 4 y Eca semana 8.

El gen de necrosis NEP no mostró expresión en ninguna de las condiciones evaluadas.

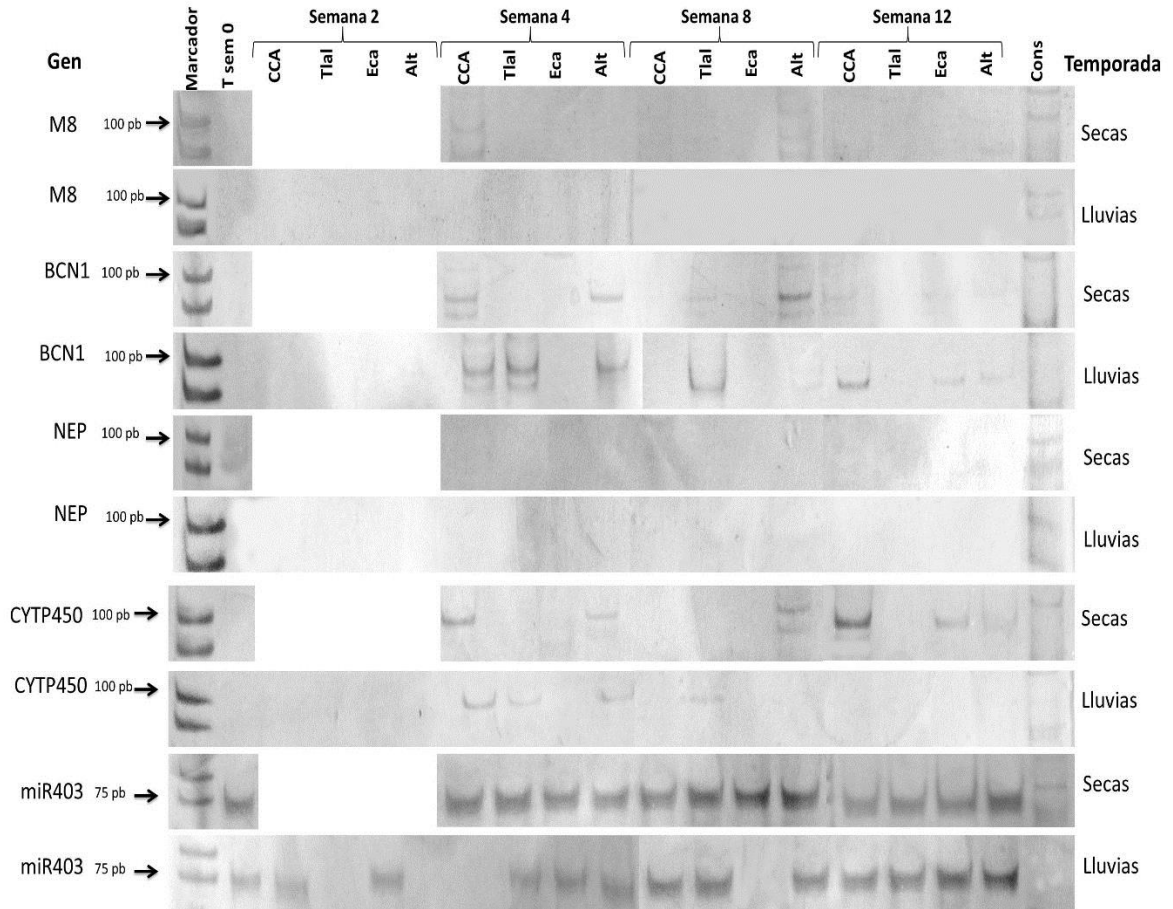


Figura 11. Expresión de genes de muerte en *R. gerberifolius* expuesta durante las temporadas de secas y lluvias. Abreviaturas: T: Testigo, CCA: Centro de Ciencias de Figura 11. Expresión de genes de muerte en *R. gerberifolius* expuesta durante las temporadas de secas y lluvias.

La figura 12 indica la expresión del gen constitutivo Knox en muestras de *R. gerberifolius* durante ambas temporadas y distintos sitios de exposición, mostrando su activación en todos los casos.

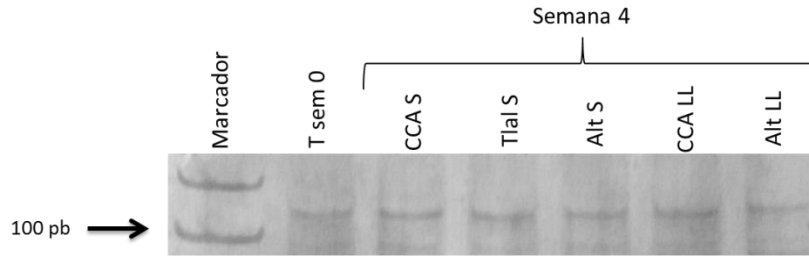


Figura 12. Expresión del gen constitutivo Knox en *R. gerberifolius* expuesta durante la temporada de secas (S) y lluvias (LL).

La expresión de los genes estudiados para *S. roseus* se muestran en la figura 13. La M8 se registró únicamente en la temporada de lluvias en Tlal semana 2 y CCA semana 8.

BCN1 se expresó en Tlal semana 2 y Tlal y Eca semana 4 en lluvias.

CYTP450 se observó en CCA, Tlal, Eca y Alt semana 8 y 12 durante la temporada de secas y CCA, Eca y Alt en semana 2, CCA, Tlal y Alt semana 4, Tlal, Eca y Alt semana 8 y CCA, Tlal, Eca y Alt semana 12 en lluvias.

La desregulación del miR403 se indujo en secas en las muestras expuestas en Alt semana 4 y Eca y Alt semana 8, y en lluvias CCA, Eca y Alt semana 2, Tlal y Alt semana 4, Tlal semana 8 y Tlal y Alt semana 12.

El gen NEP no mostró expresión en ninguna de las condiciones evaluadas.

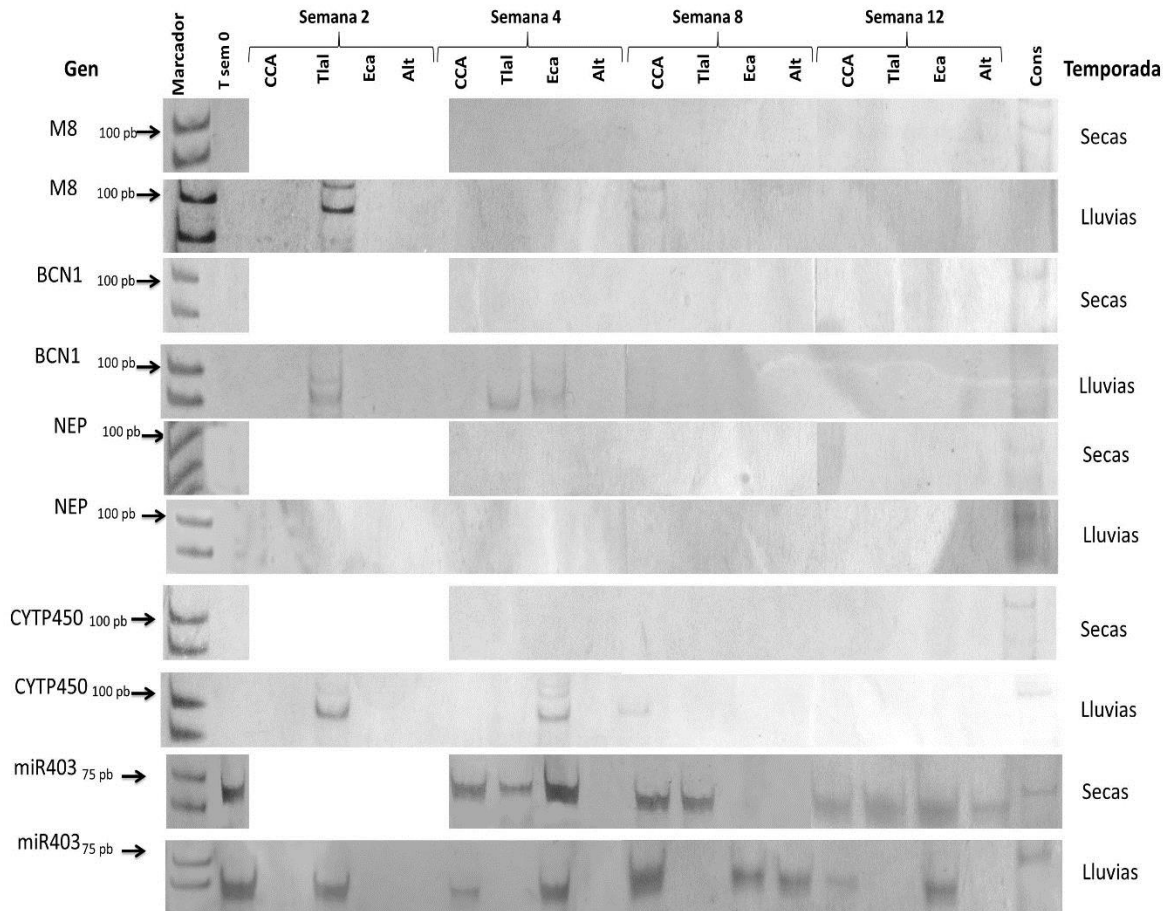


Figura 13. Expresión de genes de muerte en *S. roseus* expuesta durante las temporadas de secas y lluvias.

La figura 14 indica la expresión del gen constitutivo Knox en muestras de *S. roseus* durante ambas temporadas y en distintos sitios de exposición, mostrando su expresión en todos los casos.

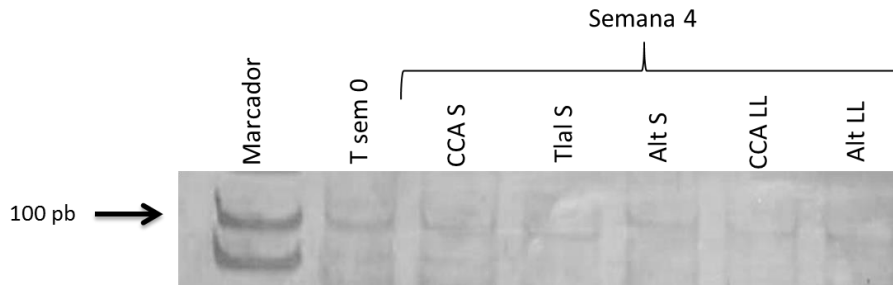


Figura 14. Expresión del gen constitutivo Knox en *S. roseus* expuesta durante la temporada de secas (S) y lluvias (LL).

Evaluación de cambios morfológicos.

Con relación a la morfología, se observaron modificaciones en las células de *R. gerberifolius* desde la semana 2 al comparar las muestras de los sitios de exposición con los T (Fig. 15). En el CCA se observó un alargamiento y la contracción del protoplasto en algunas de ellas. En Tlal no se realizó la evaluación debido la carencia de muestras por causas que no pudieron controlarse. En Eca las células presentaron forma oval y en la mayoría de los casos la separación del protoplasto de la membrana celular es evidente. Y en Alt la morfología es entre redonda y ovalada pero el protoplasto no se vió afectado en la mayoría de las células.

En la semana 4 de exposición, la morfología del T se muestra redondeada y con el protoplasto intacto. Comparando con el CCA destaca la contracción del protoplasto en la mayoría de las células, pero mantienen su forma original. En Tlal y Eca las células presentan un alargamiento y una contracción protoplástica muy evidente y Alt ha perdido la morfología por completo y la separación del protoplasto se localiza en más de la mitad de las células.

Los T en la semana 8 continuaron mostrando la forma celular redondeada y nula separación del protoplasto. En el CCA las células aparecieron amorfas y con una ligera contracción protoplástica, en Tlal no hubo cambios registrados. Pero en Eca se observaron formas y tamaños celulares diversos y todas presentaron un alto grado de contracción del protoplasto, así como en Alt la morfología es ovalada y/o alargada y la mayoría presenta el protoplasto separado de la membrana celular.

En general se observó que los cambios morfológicos de las células de *R. gerberifolius* se incrementaron con el paso del tiempo.

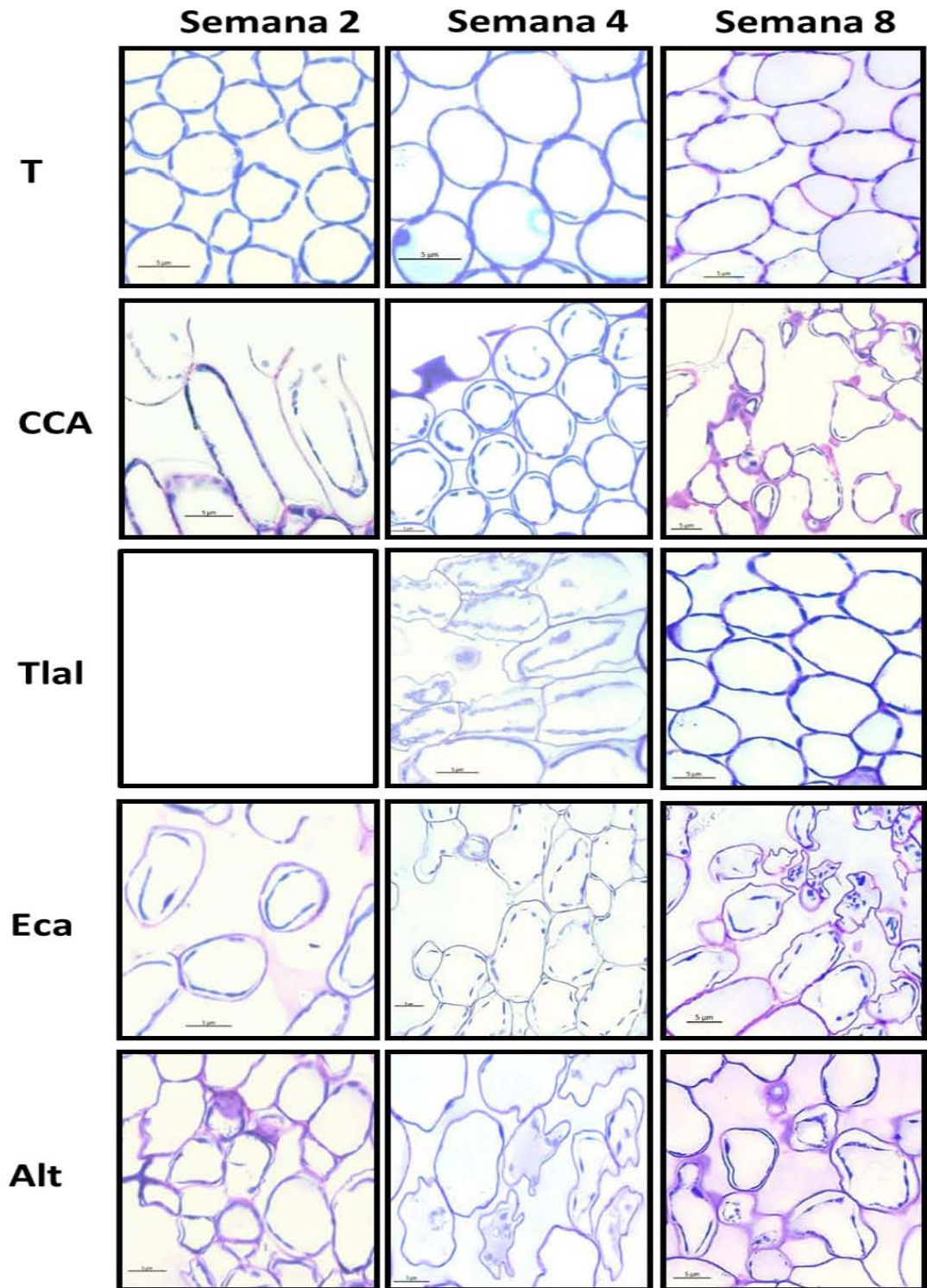


Figura 15. Cortes transversales de hojas de *R. gerberifolius* expuestas durante la temporada de lluvias.

En la figura 16 se observa la comparación de los T de cada una de las semanas de exposición con cada uno de los sitios de estudio para la especie *S. roseus*.

En la semana 2, las células del T son de forma redondeada y en los sitios CCA, Eca y Alt se alargaron ligeramente, asimismo el protoplasto en el T no presentó contracción y en Eca y Alt ya se empieza a separar de la pared en algunas células.

En la semana 4 las células del T son redondas y el protoplasto permaneció intacto. En el CCA ya se muestran células amorfas y con contracción protoplástica evidente, en Eca se presentó una morfología redondeada, con un alto grado de contracción del protoplasto y en Alt la morfología celular es ovalada sin cambios en el protoplasto.

En la semana 8, el T no sufrió cambios respecto a las semanas anteriores. Las muestras expuestas en el CCA presentaron células con forma irregular y con separación del protoplasto y en Eca y Alt la morfología es irregular y alargada y con una contracción protoplástica muy marcada.

Se obtuvieron mayores alteraciones tanto en la morfología celular como en la contracción del protoplasto conforme los tiempos de exposición fueron más prolongados, también se detectó que los sitios que indujeron mayores cambios fueron el CCA y Eca.

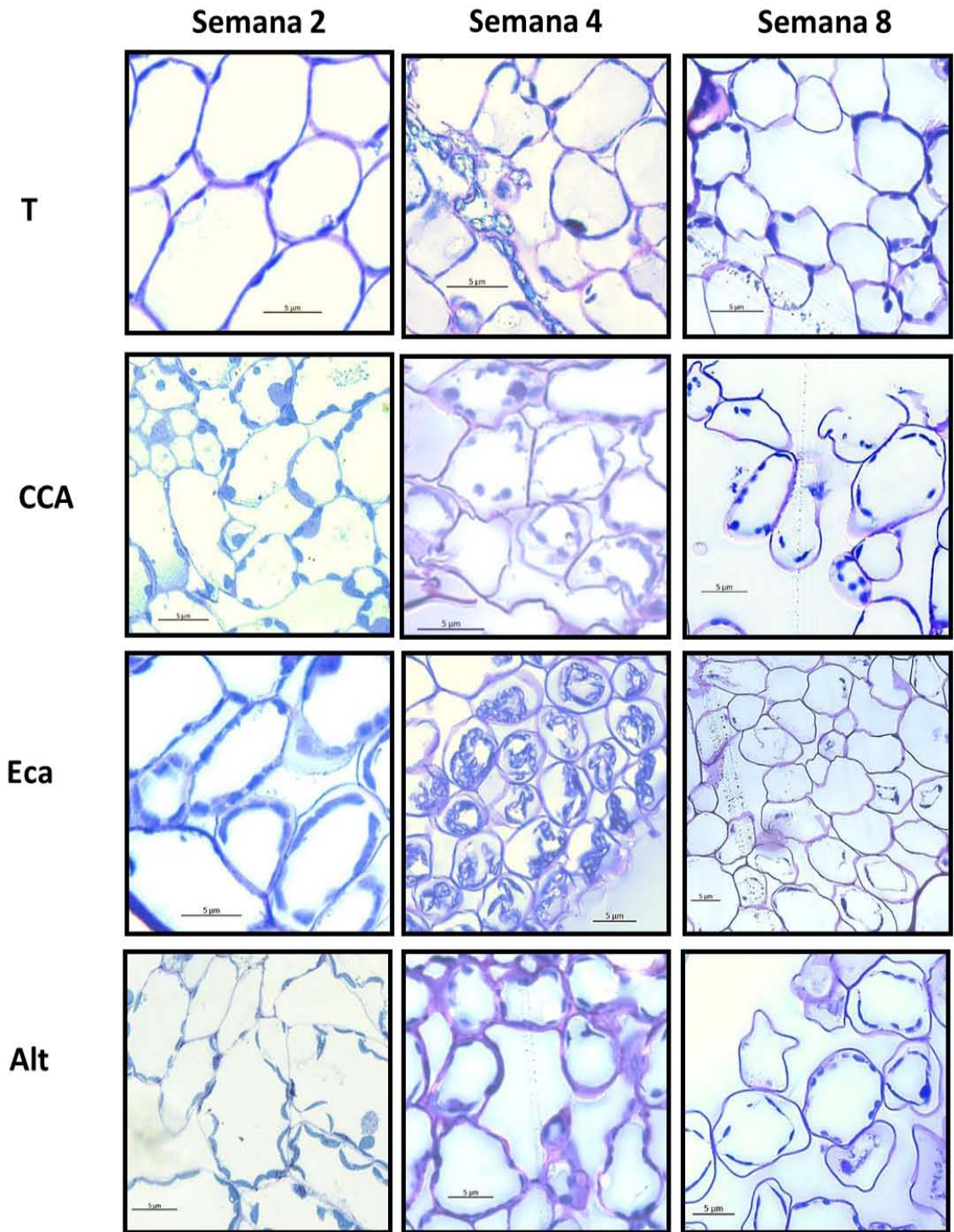


Figura 16. Cortes transversales de hojas de *S. roseus* expuesta durante la temporada de lluvias.

Detección de contaminantes en los sitios de estudio

Los valores promedio de la emisión de los contaminantes monitoreados por la RUOA en los cuatro sitios de estudio: CCA, Tlal, Eca y Alt (Figs. 17 y 18). Se comparó estadísticamente la diferencia que hubo entre las temporadas de secas y lluvias.

Se registraron once contaminantes del aire: CO, CO₂, CH₄, O₃, SO₂, NO, NO₂, NO_x, PM 2.5, PM 10 y PM CO.

La prueba estadística aplicada mostró diferencias significativas para el O₃ en la semana 12 de secas en el CCA, y para el NO, NO₂ y consecuentemente para los NO_x. Asimismo se puede mencionar que a pesar de que no se haya encontrado diferencias significativas con el testigo, algunos contaminantes se mantuvieron ligeramente elevados como es el caso del CO en la temporada de lluvias, el SO en secas, y las PM 2.5 y PM10 que fueron más abundantes en las semanas 2 y 4 de secas.

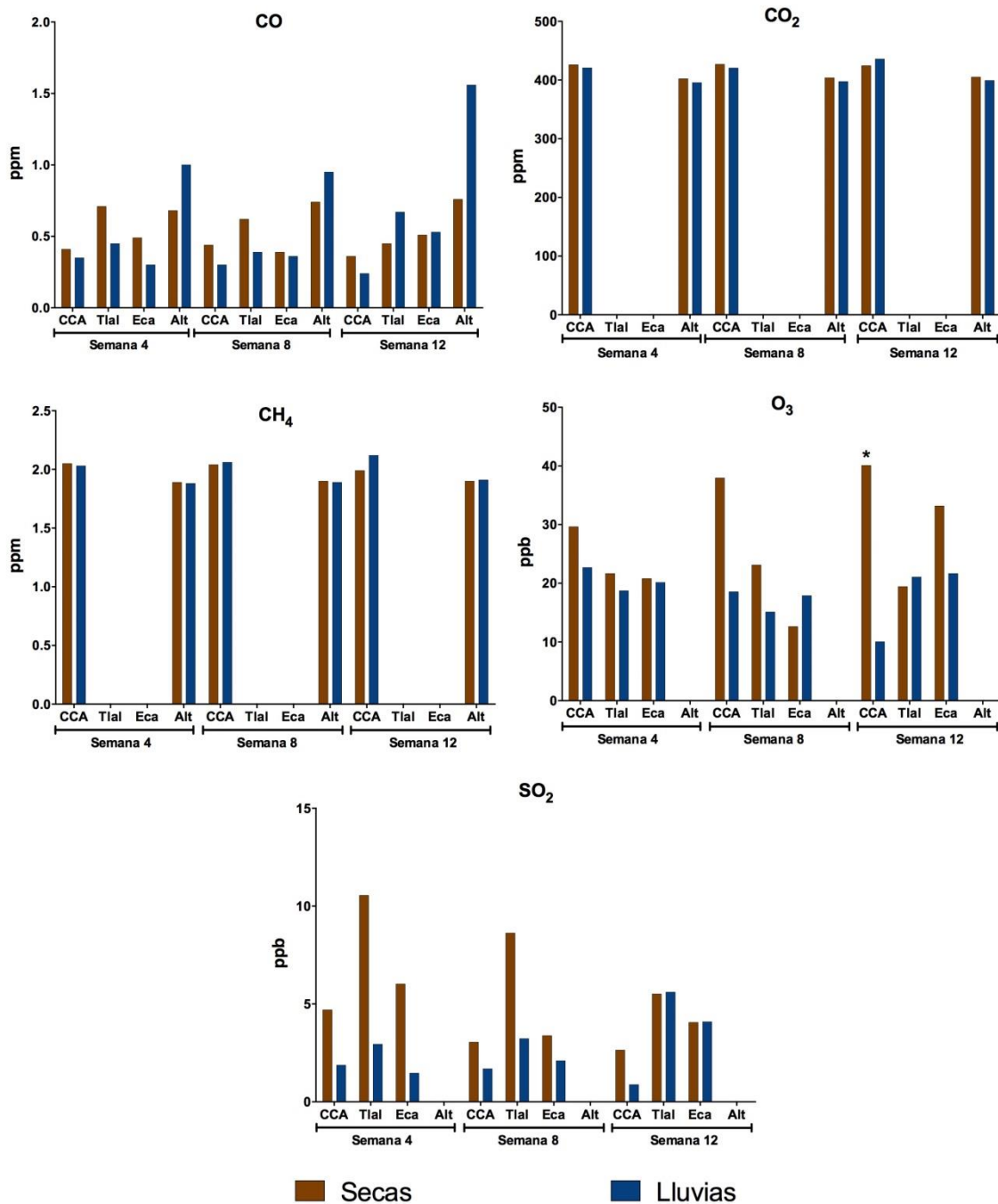


Figura 17. Promedio de contaminantes atmosféricos presentes en los distintos sitios y tiempos de exposición durante las temporadas de secas y lluvias 2018. Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medias entre temporadas ($p < 0.05$).

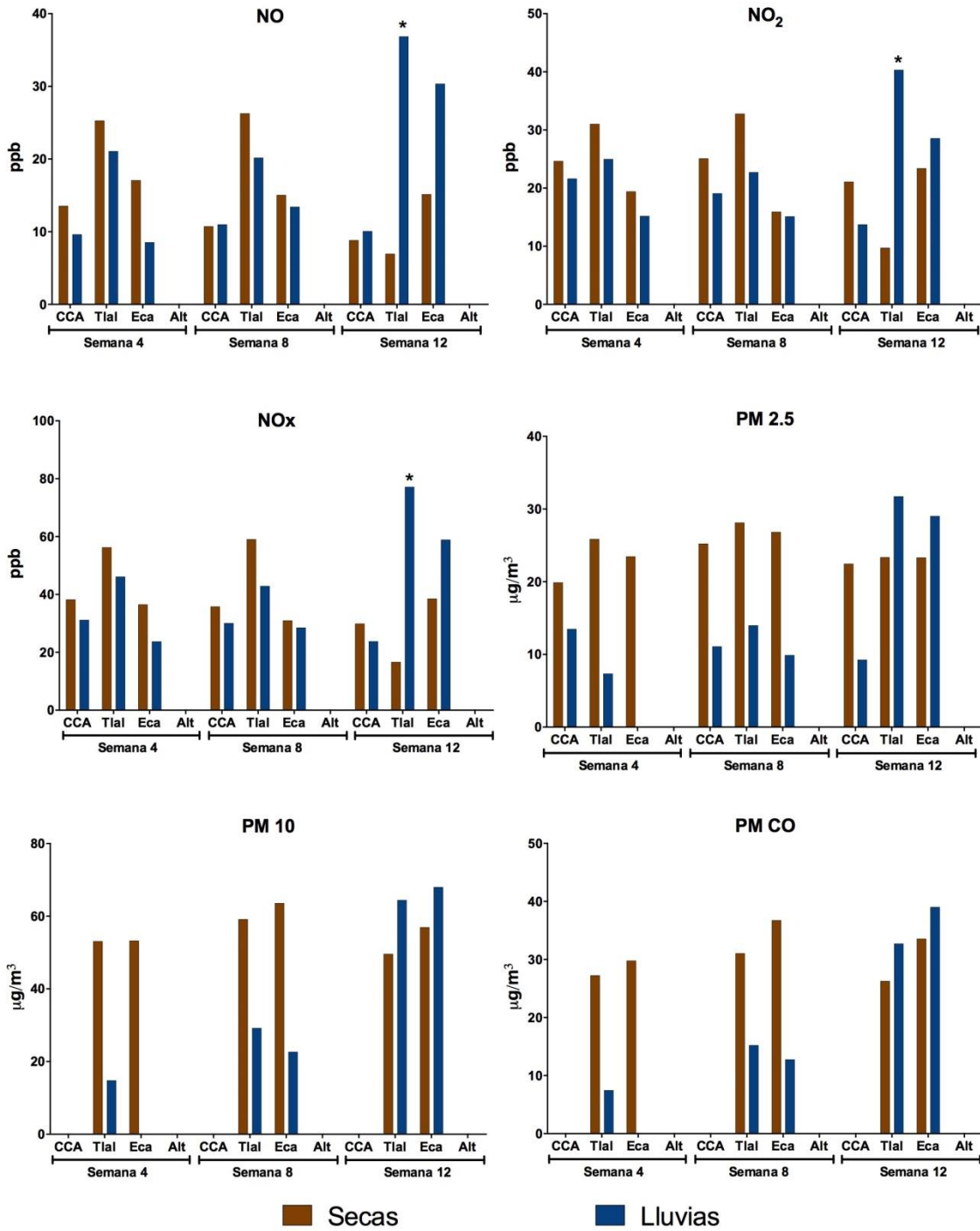


Figura 18. Promedio de contaminantes atmosféricos presentes en los distintos sitios y tiempos de exposición durante las temporadas de secas y lluvias 2018 a. Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medias entre temporadas ($p < 0.05$).

Análisis químico de la acumulación de metales pesados

Se realizó la cuantificación de los metales pesados (Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sb y Pb), acumulados en las hojas de ambas especies durante las semanas 4, 8 y 12 de exposición y en temporadas de secas y lluvias. Los valores se reportan en las figuras 19 a 22.

Al analizar las concentraciones de los metales pesados acumulados en la especie *R. gerberifolius* se observó que los valores de Al, Mn, V, Fe, y Co tuvieron diferencias significativas con relación al T, principalmente durante la temporada de lluvias en diversos sitios de exposición, de la misma manera que el Pb fue significativamente más elevado con relación al testigo en Tlal (Figs. 19 y 20).

Durante la temporada de secas el AL, V, Fe, Cr, Co, Ni y Cu fueron significativamente más altos que el T en la semana 12, mientras que el Zn lo fue en la semana 8 en el CCA (Figs. 19 y 20).

El Sb no mostró diferencias significativas con relación al T en ningún caso.

Con relación al tiempo de exposición se detectó que durante las primeras 4 semanas, la temporada de lluvias propició la acumulación de valores más altos en 7 metales (Al, V, Mn, Fe, Co, Ni y Cd) en comparación con secas. En la semana 8 fueron 10, siendo solamente el Zn y Pb más altos en secas y en la 12 se acumularon 5 (Al, V, Mn, Cd y Pb), el resto presentaron valores muy altos en Alt y el Zn siempre fue mayor en secas. Así mismo cabe destacar que el Al, V, Mn, F, Cd y Sb aumentaron de forma directamente proporcional en relación con el tiempo de exposición (Figs. 19 y 20).

R. gerberifolius

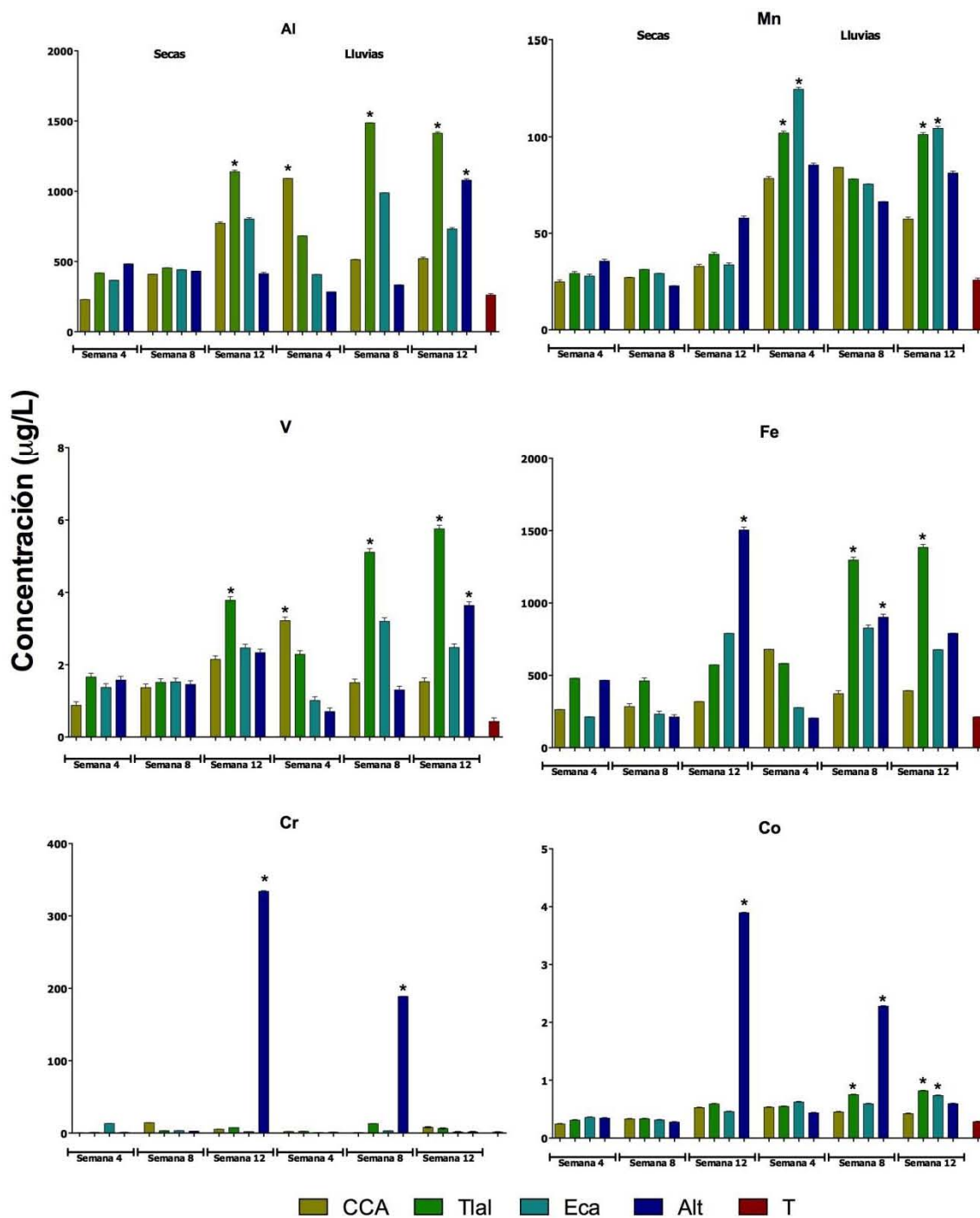


Figura 19. Promedio de la acumulación de metales pesados en las hojas de *R. gerberifolius* expuestas en las temporadas de secas y lluvias 2018. Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medias contra el testigo ($p < 0.05$).

R. gerberifolius

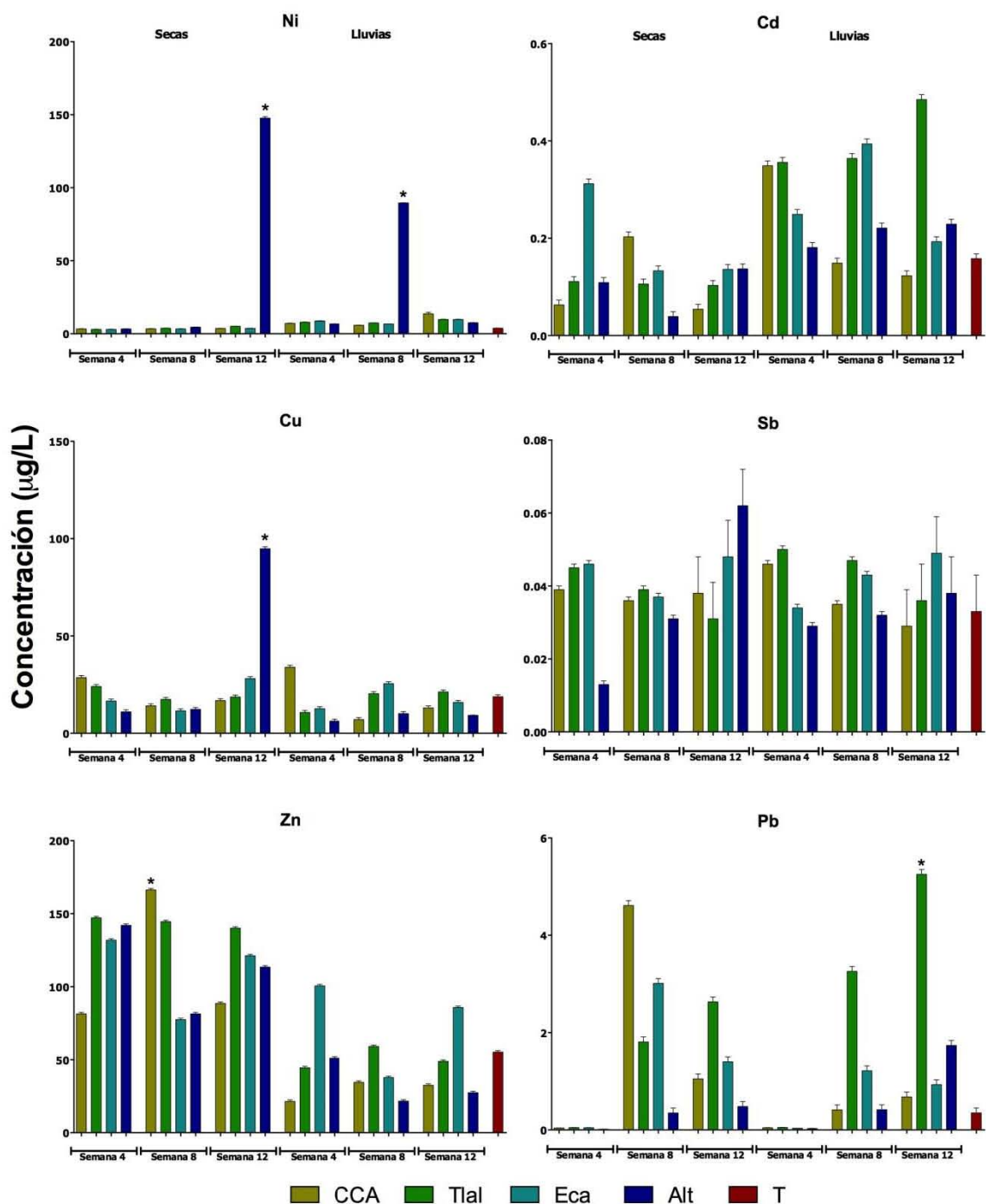


Figura 20. Promedio de la acumulación de metales pesados en las hojas de *R. gerberifolius* expuestas en las temporadas de secas y lluvias 2018. Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medias contra el testigo ($p < 0.05$).

En las figuras 21 y 22 se reportan los metales acumulados en *Senecio roseus*, los cuales indican que la acumulación de los metales mostró diferencias significativas con relación al T solo durante la temporada de secas en el caso del Mn, Cr, Cd, Sb y Pb.

Asimismo, aunque los valores no fueron significativos con relación al T, el Al estuvo alto en la semana 12 de secas y 8 de lluvias de Alt; El V y Fe estuvieron elevados en la semana 4 y 8 en Alt de lluvias y en la 12 en Tlal de secas; El Co mostró valores altos en secas en la semana 8 en CCA y 12 en Tlal, en lluvias en Alt semana 4 y 8; el Mn, Ni y Zn presentaron un comportamiento similar, siendo únicamente en CCA semana 8 de secas la mayor acumulación. El Cu se acumuló más en secas en las semanas 8 en Eca y 12 en Tlal y Eca.

S. roseus

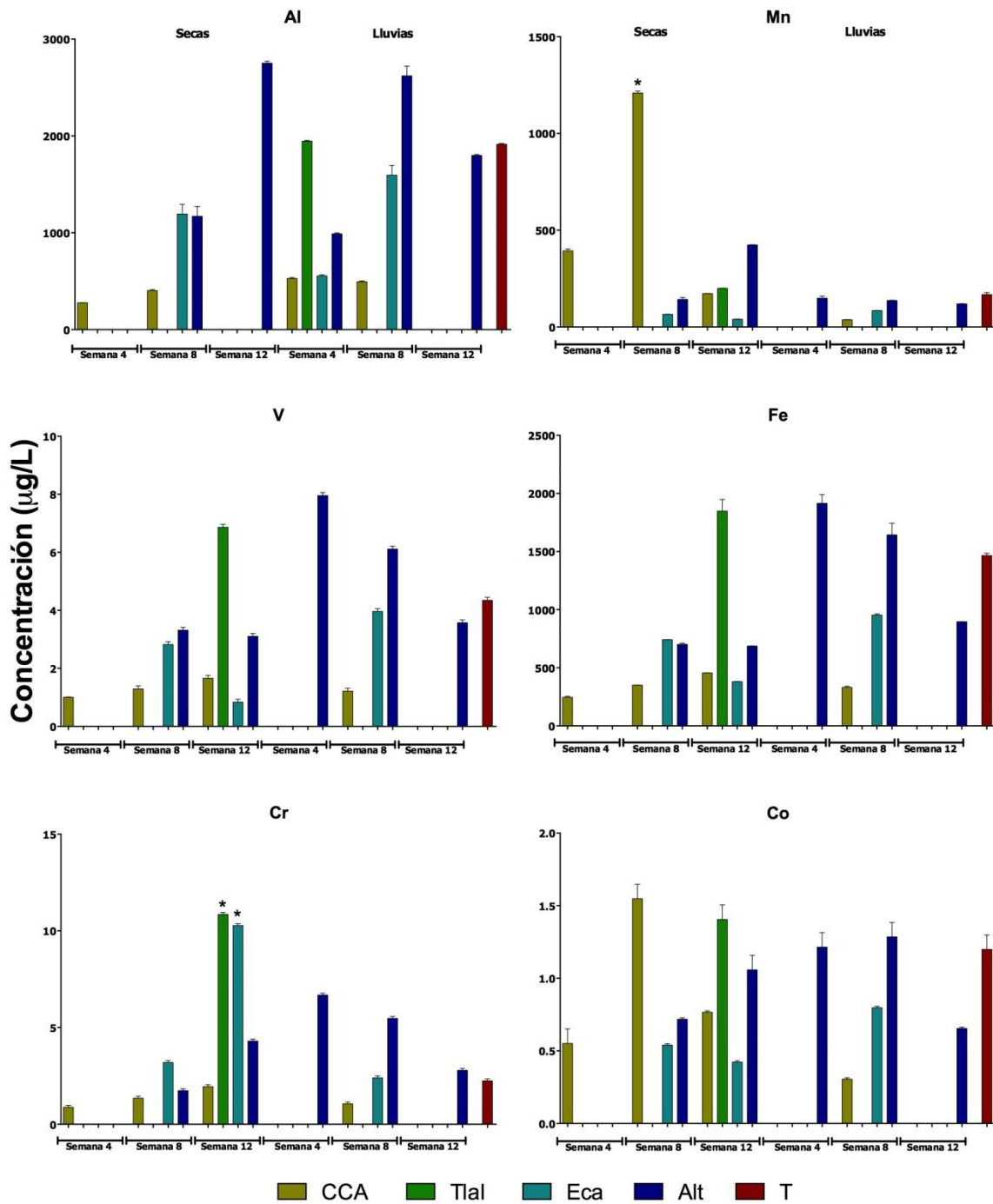


Figura 21. Promedio de la acumulación de metales pesados en las hojas de *S. roseus* expuestas en las temporadas de secas y lluvias 2018. Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medias contra el testigo ($p < 0.05$).

S. roseus

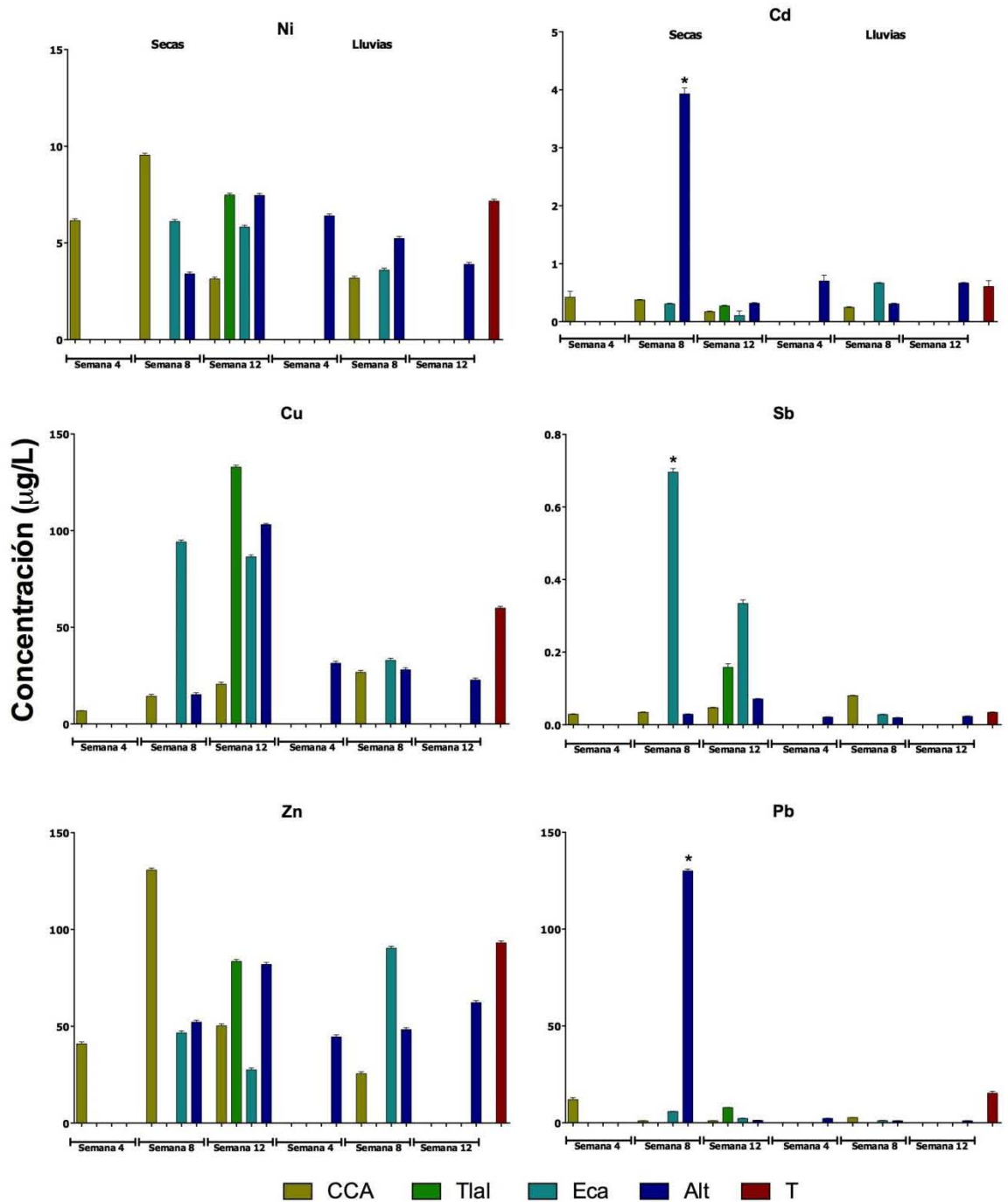


Figura 22. Promedio de la acumulación de metales pesados en las hojas de *S. roseus* expuestas en las temporadas de secas y lluvias 2018. Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medias contra el testigo ($p < 0.05$).

Ambas especies mostraron comportamientos distintos, ya que *R. gerberifolius* acumuló concentraciones menores en 7 de los 12 metales analizados en temporada de lluvias, en contraste con *S. roseus* que acumuló mayor diversidad de metales en las temporadas de secas a partir de la semana 8 de exposición.

Discusión

Actualmente la contaminación atmosférica es un problema de gran importancia. Diversos estudios han relacionado a los contaminantes con gran variedad de alteraciones de la salud (WHO, 2005; Janssen *et al.*, 2013; Loomis *et al.*, 2013; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo fue describir la respuesta de dos plantas silvestres frente a la exposición a contaminantes atmosféricos presentes en cuatro sitios distintos de la zona metropolitana de la Ciudad de México (CCA, Tlal, Eca y Alt), durante 2, 4, 8 y 12 semanas y en las temporadas de secas y de lluvias del 2018. Para ello se llevó a cabo un análisis de la expresión de genes asociados a distintos tipos de muerte celular (tipo-apoptosis, autofagia y necrosis) y estrés oxidante, además de observar los cambios morfológicos de las células de las hojas, relacionándolo con las concentraciones de gases contaminantes presentes en cada sitio de estudio y los metales pesados acumulados en la hojas de *R. gerberifolius* y *S. roseus*.

Los sistemas vegetales presentan características como ser sésiles, sensibles a agentes químicos por tiempos cortos de exposición, su mantenimiento es de bajo costo y además juegan un papel fundamental en los ecosistemas al ser la base de las cadenas tróficas (Valencia-Quintana *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2013). Debido a esto son considerados como buenos modelos para realizar estudios de una gran cantidad de vías o cambios que sufren las células o los organismos debido a la exposición a contaminantes ambientales (Ceretti *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2017).

El riesgo que implica la contaminación ambiental sobre la salud puede evaluarse de diversas formas, entre ellas, en este trabajo se eligió la muerte celular programada (MCP), la cual en plantas es un proceso de "suicidio" celular controlado que ayuda a eliminar células dañadas y juega un papel importante

como respuesta de defensa contra factores de tipo biótico (patógenos) y abiótico (calor, salinidad, deshidratación, radiación, metales pesados o agentes químicos) (Ahmad *et al.*, 2012). Éstos últimos generan estrés en las células que producen grandes niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS) y otras moléculas señal que activan la MCP (Fagundes *et al.*, 2015).

Las plantas como respuesta a diversos tipos de estrés de tipo biótico o abiótico producen EROS en mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas (Peralta-Pérez y Vole-Sepúlveda, 2012). Las cuales son formadas por la reducción incompleta del peróxido de hidrógeno, radicales superóxido o hidroxilo o por excitación del oxígeno molecular (Gechev y Hille, 2005; Petrov *et al.*, 2015).

Al incrementarse el nivel o la concentración de las EROS, las plantas pueden sufrir daños, por lo que han desarrollado estrategias de defensa para disminuirlos y evitar su toxicidad (Møller, 2001; Bermejo *et al.*, 2007). Algunos de los mecanismos que se han descrito son el control de la proliferación, muerte celular, adaptación al estrés, ataque a patógenos, limitar la apertura estomática o incluso la tolerancia y acumulación de los contaminantes (Navarro-Aviño *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Todo esto es regulado por redes de defensa antioxidante que protegen contra daños celulares, y pueden actuar de dos maneras: 1) disminuyendo la producción de EROS ó 2) eliminando las EROS producidas (Gil y Tuteja, 2010).

En el presente trabajo se realizó el análisis de la expresión génica mediante PCR de punto final, que simula la síntesis de material genético dentro de una célula y permite amplificar genes para observar la expresión de forma cualitativa. Así se puede conocer si alguna vía se activa en cada una de las condiciones evaluadas, buscando en esta investigación la activación de genes de vías de muerte celular y de estrés oxidante (Asuar, 2007; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Las metacaspasas, cistein proteasas identificadas en plantas, hongos y protistas, están íntimamente relacionadas en los procesos de MCP en respuesta a estrés oxidante por EROS, luz ultravioleta, herbicidas y senescencia (He *et al.*, 2008; Tsiatsiani *et al.*, 2011; Fagundes *et al.*, 2015). El gen de la metacaspasa M8, que juega un papel fundamental en la activación de la vía de muerte celular tipo apoptosis en los vegetales (He *et al.*, 2008; Fagundes *et al.*, 2015), se expresó ligeramente en *R. gerberifolius* durante la temporada de secas como consecuencia de su exposición en el CCA en la semana 4 y en la 8 en Tlal (Fig. 11), mientras que en *S. roseus* se observó claramente durante la temporada de lluvias en Tlal semana 2 y CCA semana 8 (Fig. 13). Esta expresión puede deberse a la activación de vías apoptóticas en las células, causado por la exposición a los contaminantes atmosféricos como O₃, SO₂, NO ó PM_{2.5} reportados en las figuras 17 y 18 en zonas de alto tránsito vehicular (CCA) o industriales (Tlal). Asimismo, la acumulación de metales pesados como el Sb, Cu o V en secas o Al en lluvias (Figs. 19 a 22) pueden ser causantes de este evento ya que existen estudios previos que han mostrado la presencia de MC3 y 9 después de exponer plantas a Cd, Cr, Ni, Sb y Co (Pulido y Parrish, 2003; Tran *et al.*, 2014; Cen, 2015; Petrov *et al.*, 2015).

Por otro lado la autofagia implica la creación de autofagosomas o vesículas de doble membrana, que se fusionan con el tonoplasto para su liberación hacia el lumen vacuolar para su hidrólisis (Liu *et al.*, 2005), requerida para el reciclamiento de nutrientes y para la eliminación de material tóxico que se genera por las EROS (Xiong *et al.*, 2005, 2007; Liu *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2011; Gunawardena y McCabe, 2015).

Entre los 36 genes relacionados a la autofagia descritos en *Arabidopsis*, uno de ellos es el gen BCN1-estudiado en este trabajo-, codifica a una proteína involucrada en la formación de las vesículas (Qin *et al.*, 2007; Avin-Wittenberg *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2014); se ha reportado su papel en la germinación y en

la diferenciación de elementos de vaso (Kwon *et al.*, 2010). El estrés iónico por compuestos químicos, lleva hacia el desequilibrio osmótico en las plantas, por lo que la formación de vesículas para capturar proteínas oxidadas y EROS sugiere la autofagia como respuesta al estrés abiótico, como se ha encontrado en *Oryza sativa* y al biótico en *Nicotiana tabacum* (Zhu, 2001; Contento *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011). La expresión del gen BCN1 en *R. gerberifolius* se observó en ambas temporadas durante la semanas 4, 8 y 12 de exposición en diferentes sitios (Fig. 11) y para *S. roseus* sólo hay evidencia durante la temporada de lluvias en las semanas 2 y 4 en Tlal; en Tlal y Eca se detectó en la semana 4 (Fig. 13), ésto sugiere un evento de autofagia como respuesta el estrés abiótico provocado por los contaminantes presentes en la atmósfera (CO₂, NO, NO₂, NOx y PM_{2.5}) (Figs. 17 y 18). Asimismo los metales pesados considerados como esenciales (Al y V) y los no esenciales (Mn y Fe) se reportaron con valores elevados en *R. gerberifolius* los cuáles al ser acumulados en grandes cantidades pueden generar estrés abiótico (Liu y Bassham, 2012; Rana *et al.*, 2012).

El tercer tipo de MCP se conoce como necrosis y el gen evaluado fue NEP, que no se expresó en ninguna de las temporadas, sitios y especies, por lo que se descartó este tipo de muerte celular (Figs. 11 y 13).

La superfamilia CYTP450 corresponde a enzimas presentes en gran variedad de organismos, entre ellos las plantas, se han relacionado con el crecimiento y desarrollo de vegetales y con la protección contra el estrés mediante vías de desintoxicación o biosíntesis (Li *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2015).

La mayoría de los contaminantes del aire o los metales pesados no son fáciles de degradar, varios de ellos pueden ser absorbidos, secuestrados y/o volatilizados por las plantas. Al evaluar el gen de CYTP450 en *R. gerberifolius* se mostró su expresión en las semanas 4, 8 y 12 durante la temporada de secas en el CCA, Eca y Alt y en la semana 4 en lluvias en el CCA, Tlal y Alt y 8

en Tlal (Fig. 11). Para *S. roseus* aparece en la temporada de lluvias en Tlal semana 2, Eca semana 4 y CCA semana 8 (Fig. 13). Estos resultados indican que las plantas podrían estar pasando por un evento de defensa contra el estrés provocado por los contaminantes a los que estuvieron expuestos en CCA (CO₂, SO₂, O₃) Tlal (NO, NO₂, NO_x), Eca (O₃) y Alt (CO) (Figs. 17 y 18) o la presencia de metales pesados en las hojas como Al, Mn, V, Fe, Cd, Cu, Sb y Zn (Figs. 19 y 20) lo que ha sido previamente descrito por varios autores (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Geisler *et al.*, 2013; Magome *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2014; Jun *et al.*, 2015; Gómez-Arroyo *et al.*, 2018a).

Algunos estudios relacionan el efecto de los contaminantes atmosféricos que aumentan o disminuyen la expresión de diversos miRNAs como el 398 asociado a estrés igual que el miR403 evaluado en este trabajo (Kantar *et al.*, 2010; Unver *et al.*, 2010; Gómez-Arroyo, 2018a). El miR403 presenta un comportamiento variable según el tipo de estrés al que se enfrenta y la estructura vegetal en la que se realiza el estudio (Khaksefidi *et al.*, 2015). Se ha reportado en hojas que en condiciones de salinidad, calor o deshidratación muestra una sobrerregulación, pero al exponerse a Cd o a estrés por agentes químicos sufre una desregulación (Shah *et al.* 2010; Iyer *et al.*, 2012). En las plantas silvestres evaluadas, se observó que *R. gerberifolius* experimentó la desregulación del miRNA únicamente durante la temporada de lluvias en la semana 2 en Tlal y Alt, la 4 en CCA y la 8 en Eca (Fig. 11), ésto indica que en todos los sitios de estudio existen elementos generadores de estrés para las plantas como la presencia de O₃, NO₂ o NO_x (Figs. 17 y 18) o la acumulación de metales pesados como Al, V, Fe, Cu o Cd en las hojas (Figs. 19 y 20). Durante la temporada de secas se presentó la desregulación del miR403 en *S. roseus* en Alt semana 4 y 8 y Eca semana 8; y en lluvias en la 2 en CCA, Eca y Alt, la 4 en Tlal y Alt, la 8 en Tlal y la 12 en Tlal y Alt (Fig. 13). Con este resultado se puede sugerir que las plantas están sufriendo de estrés al ser expuestas a CO, NO, NO₂, NO_x, PM_{2.5} y PM₁₀ (Figs. 17 y 18), así como a metales como el V, Cr,

o Fe (Fig. 21) los cuales muestran los valores más elevados en Alt y es el sitio que más desregulación indicó (Gielen *et al.*, 2012; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Gómez-Arroyo *et al.*, 2018a).

La evaluación de cambios morfológicos de las células durante la temporada de lluvias detectó una modificación de la morfología de las células foliares creciente con el tiempo de exposición. En ésta época existe una humedad relativa del ambiente mayor que en temporada de secas, por lo que las plantas dada su fisiología, presentan una mayor apertura estomática. Al incrementar la transpiración, la planta se vuelve más susceptible al ingreso de contaminantes del aire como el SO₂ o el O₃ o moléculas pequeñas como los metales pesados que pueden alterar procesos fisiológicos (McLaughlin y Taylor, 1981; Bermejo *et al.*, 2007; Loza-Gómez, 2016; Gómez-Arroyo *et al.*, 2018b; Berry *et al.*, 2019).

Una forma de evaluar el tipo de MCP en los vegetales consiste en analizar los cambios en la estructura celular. La AL-PCD muestra como características morfológicas un encogimiento del citoplasma y la contracción del protoplasto lejos de la pared celular (McCabe *et al.*, 1997; Reape *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009; van Doorn *et al.*, 2011; Gunawardena y McCabe, 2015). Para la autofagia se observa la formación masiva de autofagosomas en vacuolas líticas, y en la necrosis hay daño en la pared celular, fragmentación de la membrana y la vacuola (Ishida *et al.*, 2008).

Al realizar la comparación de los rasgos morfológicos en los cortes teñidos de *R. gerberifolius* se observó claramente la contracción del protoplasto durante los tres tiempos de exposición: semanas 2, 4 y 8, destacando que el mayor grado de separación con la pared celular se reportó en la semana 4 para Tlal y 8 para los sitios del CCA, Eca y Alt. Asimismo, se registró un cambio en la forma de las células que ocurre en CCA a partir de la semana 2 en la que se observa el alargamiento y en la 8 con la presentación de formas irregulares, en

Tlal se alargaron y en Eca y Alt desde la semana 4 fueron amorfas (Fig. 15). Para *S. roseus* destacó una contracción importante en la semana 4 en Eca la cual comenzó desde las primeras dos semanas de exposición de forma parcial y se mantuvo ésta morfología durante la semana 8, en la cual aparece en menor grado para las plantas expuestas en los sitios del CCA y Alt. Respecto a a forma celular éstas adquirieron formas irregulares evidentes en la semana 4 y permanecieron hasta la semana 8 en los tres sitios evaluados (Fig. 16). La morfología celular descrita se puede asociar con el aumento en la concentración de CO, O₃, NO y NO₂ reportados en las figuras 17 y 18 y con el alto número de metales pesados (Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cd y Pb) localizados en las hojas durante la semana 4 y 8 mostrados en las figuras 19 a 22. Esto coincide con estudios previos que han reportado alteraciones del protoplasto o cambios en la forma de las células al entrar en fase de muerte celular en distintas etapas (Solís *et al.*, 2014). Esto provocado por la exposición de las plantas a agentes químicos como plaguicidas o metales pesados como el Cr o Ni, que se comportan como iones esenciales y al atravesar la membrana celular generan alteraciones estructurales y funcionales. Los cambios estructurales reportados en este trabajo, son probablemente inducidos por los contaminantes del aire y metales pesados y concuerdan con los observados por Reape *et al.* (2008) en células animales, así como la contracción del protoplasto considerada como una característica distintiva de la AL-PCD (Reape y McCabe, 2008, 2010 y 2013; Mousavi-Kouhi *et al.*, 2016; Cortés-Eslava *et al.*, 2018).

Existen mecanismos de supervivencia o tolerancia a los cambios en el ambiente como respuesta para reajustar la homeostasis celular o reparar el daño generado por las EROS formadas en la célula ante la exposición a los contaminantes y metales pesados. Sin embargo al intentar balancear estos cambios en la óxido-reducción, el estrés oxidante puede afectar de forma directa eventos de señalización celular, actividad enzimática, expresión génica, peroxidación lipídica e incluso dirigir a eventos de muerte celular, siendo éstos

últimos los reportados en éste trabajo (Kumar y Sunkar, 2015; Loza-Gómez, 2016; Gómez-Arroyo *et al.*, 2018b).

La contaminación atmosférica es actualmente un grave problema a lo largo del planeta y es mayor en la ciudades grandes e industrializadas como la de México. Con base en los resultados de esta investigación se puede confirmar la importancia de los sistemas vegetales para estudios de biomonitoreo de contaminantes ambientales. No obstante, es importante seguir realizando estudios con la finalidad de ampliar la información y poder explicar los cambios anatómicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares en este tipo de organismos centinela, lo cual ayudará a entender los procesos generales que llevan a cabo las plantas como respuesta a la exposición a diversos tipos de contaminantes del aire y el riesgo que constituyen para la salud, lo que permitirá considerarlos para llevar a cabo acciones de biorremediación ambiental (Maruthi-Sridnar *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

Conclusiones

La expresión de genes relacionados con la MCP (M8, BCN1 y NEP) y con la generación de estrés (CYTP450 y el miR403) en *R. gerberifolius* mostró la activación de vías de tipo apoptosis durante la temporada de secas y de autofagia y estrés oxidante en ambas temporadas, secas y lluvias.

La exposición de *S. roseus* en la temporada de secas indujo la desregulación del miR403. En la temporada de lluvias se activaron genes indicativos de MCP tipo apoptosis, autofagia y estrés oxidante.

Los cambios morfológicos de las células evidenciaron la inducción de AL-PCD en ambas especies durante la temporada de lluvias, en proporción al tiempo de exposición.

Las plantas silvestres estudiadas fueron sensibles a los cambios ambientales relacionados con la exposición a contaminantes del aire (CO, CO₂, CH₄, NO, NO₂, NO_x, O₃, SO₂, PM_{2.5}, PM₁₀, PMCO) y a metales pesados (Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sb y Pb) a tiempos cortos de exposición, por lo que pueden plantearse como organismos centinela para biomonitoreo *in situ*.

Literatura citada

- Ahmad R., Zuily-Fodil Y., Passaquet C., Bethenod O., Roche R., Repellin A. (2012) Ozone and aging up-regulate type II metacaspase gene expression and global metacaspase activity in the leaves of field-grown maize (*Zea mays* L.) Plant Chem. 87: 789–795.
- Alfaro E., García C., Gueñas A. (2000). Métodos de detección de apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Rev Inst Nal Cancerol. 46: 275-280.
- Ameisen J.C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. Cell Death Differ. 9: 367-93.
- Arpagaus S., Rawlyer A.J., Braendle R.A. (2002). Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. J Biol Chem. 277:1780-1787.
- Asuar L.E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. Tomado de http://www.2inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicación.html?id_pub=530
- Aukerman M.J., Sakai H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. Plant Cell 15: 2730-2741.
- Avin-Wittenberg T., Honig A., Galili G. (2012). Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. Protoplasma 249:285–299.
- Balk J., Leaver C.J., McCabe P.F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. FEBS Lett. 463:151-154.
- Balk J., Leaver C.J. (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome C release. Plant Cell. 13: 1803-1818.
- Balk J., Chew S.K., Leaver C.J., McCabe P.F. (2003). The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. Plant J. 34: 573-583.
- Barrera-Figueroa B.E., Gao L., Diop N.N., Wu Z., Ehlers J.D., Roberts P.A., Close T.J., Zhu J.K., Liu R. (2011). Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. BMC Plant Biol. 11: 127.
- Bartel D. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116: 281-297.

- Beers E.P. (1997). Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ.* 4: 649-661.
- Benjamin C.W., Hiebsch R.R., Jones D.A. (1998). Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol.* 53: 446-50.
- Bermejo V., Alonso R., Elvira S., Rábago I., García M. (2007). El ozono troposférico y sus efectos en la vegetación. CIEMAT, Unidad de Contaminación Atmosférica. 75 p.
- Berry Z.C., Emery N.C., Gotsch S.G., Goldsmith G.R. (2019). Foliar water uptake: Processes, pathways, and integration into plant water budgets. *Plant Cell Environ.* 42: 410-423.
- Borrás O., Collazo C., Chacón O. (2006). Programmed cell death in plants resembles apoptosis in animals. *Biotechnol Apl.* 23: 1-10.
- Brown T. (2008). Genoma. España. Ed. Médica Panamericana. 760 p.
- Calderón G., Rzedowski J. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2da Ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán 20.
- Casano L.M., Zapata J.M., Martín M., Sabater B. (2000). Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport: plastoquinone as an electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J Biol Chem.* 275: 942-948.
- Castillo-Olamendi L., Bravo-García A., Moran J., Rocha-Sosa M., Porta H. (2007). AtMCP1b, a chloroplast-localized metacaspase, is induced in vascular tissue after wounding or pathogen infection. *Funct Plant Biol.* 34: 1061-1071.
- Cen S. (2015). Biological monitoring of air pollutants and its influence on human beings. *J Biomed Eng.* 9: 219-223.
- Ceretti E., Zani C., Zerbini I., Viola G., Moretti M., Villarini M., Dominici L., Monarca S., Feretti D. (2015). Monitoring of volatile and non-volatile urban air genotoxins using bacteria, human cells and plants. *Chemosphere* 120: 221-229.
- Chen X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* 579: 5923-5931.
- Coll N.S., Vercammen D., Smidler A., Clover C., Van Breusegem F., Dangl J.L., Epple P. (2010). *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science* 330: 1393-1397.

- Contento A.L., Kim S.J., Bassham D.C. (2004). Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol.* 135: 2330–2347.
- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Risueño M., Testillano P. (2018). The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. *Environ Pollut.* 240: 77-86.
- Curtis M.J., Wolpert T.J. (2002). The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J.* 29: 295-312.
- Danial N.N., Gramm C.F., Scorrano L. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952-956.
- DeMarini D. (2013). Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near road atmospheres: a review. *Mutagenesis.* 28: 485-505.
- Diamond M., McCabe P.F. (2007). The mitochondrion and plant programmed cell death. In: Logan, D.C. (Ed.), *Plant Mitochondria – Annual Plant Reviews*. Blackwell Publishing, pp. 308–334.
- Dugas D.V., Bartel B. (2004). MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 512-520.
- Emery J.F., Floyd S.K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N. P., Ozhaki A. Baum S.F., Bowman J.L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol.* 13: 1768-1774.
- Fagundes D., Bohm B., Cabreira C., Leipelt F., Dias N., Bondanese-Zanettini M.H., Cagliari A. (2015). Caspases in plants: metacaspase gene family in plant stress responses. *Func Integr Genomics.* 15: 639-649.
- Flores F., Martínez M.A., Arenas C., Covarrubias A., Reyes J.L. (2007). ¡Silencio mensajeros! Qué Son y Cómo Actúan Los MicroRNAs. *Rev Educ Bioquim.* 26: 135-141.
- Gechev T.S., Hille J. (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol.* 168: 17-20.
- Geisler K., Hughes R.K., Sainsbury F., Lomonosoff G.P, Rejzek M., Fairhurst S., Olsen C. E., Motawia M. S., Melton R. E., Hemmings A. M., Bak S., Osbourn A. (2013). Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants. *Proc Natl Acad Sci.* 110: 3360-3367.

- Giacomello M., Drago I., Pizzo P., Pozzan T. (2007). Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 14: 1267-74.
- Gichner T., Znidar I., Wagner E., Plewa M. (2009). The use of Higher Plants in the Comet Assay, in issues in Toxicology n° 5. *The Comet Assay in Toxicology*, eds A. Dhawan and D. Anderson (London: Royal Society of Chemistry), PP. 98-119.
- Gielen H., Remans T., Vangrosveld J., Cuypers A. (2012). MicroRNAs in Metal Stress: Specific Roles or Secondary Responses?. *Int J Mol Sci.* 13: 15826-15847.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48: 909-930.
- Gómez-Arroyo S., Barba-García A., Arenas-Huertero F., Cortés-Eslava J., Grutter de la Mora M., García-Martínez R. (2018a). Indicators of environmental contamination by heavy metals in leaves of *Taraxacum officinale* in two zones of the metropolitan area of Mexico City. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25: 4739-4749.
- Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Loza-Gómez P., Arenas-Huertero F., Grutter de la Mora M., Morton-Bermea O. (2018b). *In situ* Biomonitoring of air quality in rural and urban environments of Mexico Valley through genotoxicity evaluated in wild plants. *Atmos Pollut Res.* 9: 1-7.
- Grant W.F. (1994). The present status of higher bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res.* 310:175-185.
- Gunawardena A.N., McCabe P.F. (2015). *Plant programmed cell death.* Switzerland. Springer. pp 289.
- Gustafsson L.E., Cotgreave I. (1996). Ozone-induced toxicity in experimental animals and isolated cell system. *Scand J Work Environ Health.* 22: 27-41.
- Han S., Yu B., Wang Y., Liu Y. (2011). Role of plant autophagy in stress response. *Protein Cell.* 2: 784–791.
- He R., Drury G.E., Rotari V.I., Gordon A., Willer M., Farzaneh T., Woltering E.J., Gallois P. (2008). Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 283: 774–783.
- Health Effects Institute. (2010). *Traffic Related Air Pollution: A Critical Review of the Literature on Emissions, Exposure, and Health Effects, Special Report 17.* Health Effects Institute, Boston, MA, USA.

- Hoeberichts F.A., Ten Have A., Woltering E.J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea* infected leaves. *Planta*. 217: 517-522.
- Ishida H., Yoshimoto K., Izumi M., Reisen D., Yano Y., Makino A., Ohsumi Y., Hanson M.R., Mae T. (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol*. 148: 142–155.
- Iyer N., Jia X., Sunkar R., tang G., Mahalingam R. (2012). MicroRNAs responsive to ozone-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*. 7: 484-491.
- Jabs T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol*. 57: 231-245.
- Jain K.S., Khedkar V.M., Arya N., Rane P.V., Chaskar P.K., Coutinho E.C. (2014). Design, synthesis & evaluation of condensed 2H-4-arylamino-pyrimidines as novel antifungal agents. *Eur J Med Chem*. 77: 166–175.
- Janssen N.A., Fischer P., Marra M., Ameling C., Cassee F.R. (2013). Short-term effects of PM2.5, PM10 and PM2.5-10 on daily mortality in The Netherlands. *Sci Total Environ*. 463-464: 20-26.
- Jauregui, E. (1995). Algunas alteraciones de largo periodo del clima de la Ciudad de México debidas a la urbanización. Revisión y perspectivas. *Investigaciones Geográficas*. 31: 9-44.
- Jin D., Wang Y., Zhao Y., Chen M. (2013). MicroRNAs and their cross-talks in plant development. *J Genet Genomics*. 40: 161–170.
- Johnston R.J., Hobert O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426: 845-849.
- Jun X., Xin-yu W., Wang-zhen G. (2015). The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. *J Integr Agric*. 14: 1673-1686.
- Kantar M., Unver T., Budak H. (2010). Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Funct. Integr. Genomics*. 10: 493-507.
- Kantar M., Lucas S.J., Budak H. (2011). MiRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta*. 233:471-484.

- Khaksefidi R.E., Mirlohi S., Khalaji F., Fakhari Z., Shiran B., Fallahi H., Budak H., Ebrahimie E. (2015). Differential expression of seven conserved microRNAs in response to abiotic stress and their regulatory network in *Helianthus annuus*. *Front Plant Sci.* 6:1-14.
- Kovalchuk I., Kovalchuk O. (2008). Transgenic plants as sensors of environmental pollution genotoxicity. *Sensors.* 8: 1539-1558.
- Korner C., Du X., Vollmer M., Pajeroska-Mukhtar K. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Plant Immunity- A Crossroad of Life and Death. *Int J Mol Sci.* 16: 26582-26598.
- Kumar S., Sunkar R. (2015). Nutrient- and other stress-responsive microRNAs in plants: Role for thiol-based redox signaling. *Plant Signal Behav.* 10: 1-3.
- Kwon S.I., Cho H.J., Park O.K. (2010). Role of *Arabidopsis* RabG3b and autophagy in tracheary element differentiation. *Autophagy* 6: 1187–1189.
- Lam E., Zhang Y. (2012). Regulating the reapers: activating metacaspases for programmed cell death. *Trends Plant Sci.* 17: 487–494.
- Lennon S.V., Martin S.J., Cotter T.G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203-214.
- Li D.M., Wang Y., Han K.L. (2012). Recent density functional theory model calculations of drug metabolism by cytochrome P450. *Coord Chem Rev.* 256:1137–1150.
- Li T.Q., Yang X.E., Yang J.Y., He Z.L. (2006). Zn accumulation and subcellular distribution in the Zn hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Pedosphere.* 16: 616-623.
- Li Z.Y., Yang Y., Ming M., Liu B. (2011). Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 414: 5–8.
- Lim S.S., Vos T., Flaxman A.D., Danaei G. *et al.* (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *LANCET* 380: 2224-2260.
- Liu H., Weisman D., Ye Y., Cui B., Huang Y., Colón-Carmona A., Wang Z. (2009). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 176: 375-382.

- Liu Y., Schiff M., Czymmek K. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121: 567–577.
- Liu Y., Xiong Y., Bassham D.C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 5:954–963.
- Liu Y., Bassham D.C. (2012). Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol.* 63:215–237.
- Liu Y., Burgos J.S., Deng Y., Srivastava R., Howell S.H., Bassham D.C. (2012). Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1–18.
- Lockshin R.A., Zakeri Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2405-2419.
- Loomis D., Grosse Y., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Brenbahim-Tallaa L., Guha N., Baan R., Matocck H., Straif K. (2013). On behalf of the International Agency of Research Cancer monograph working group IARC, Lyon, France. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14: 1262-1263.
- Loza-Gómez, P. (2016). Biomonitorio *in situ* de la genotoxicidad y la expresión de micro-RNAs inducidos por la contaminación del aire en un ambiente rural y uno urbano usando dos especies vegetales silvestres. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Lv X., Pu X., Qin G., Zhu T., Lin H. (2014). The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Apoptosis* 19: 905-921.
- Magome H., Nomura T., Hanada A., Takeda-Kamiya N., Ohnishi T., Shinma Y., Katsumata T., Kawaide H., Kamiya Y., Yamaguchi S. (2013). CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc Natl Acad Sci.* 110: 1947–1952.
- Mammone T., Gan D., Collins D., Lockshin R.A., Marenus K., Maes D. (2000). Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. *Cell Biol Toxicol.* 16: 293–302.
- Maruthi Sridhar B.B., Diehl S.V., Han F.X., Monts D.L., Su Y. (2005). Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ Exp Bot.* 54:131-141.
- McCabe P.F., Levine E., Meijer P.J., Tapon N.A., Pennell R.I. (1997). A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant L.* 12: 267-280.

- McLaughlin S.B., Taylor G.E. (1981). Relative humidity: Important modifier of pollutant uptake by plants. *Science* 211: 167-169.
- Minina E., Bozhkov P., Hofius D. (2014). Autophagy as initiator and executor of cell death. *Trends Plant Sci.* Article in Press.
- Møller I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52: 561-591.
- Mousavi Kouhi S.M., Lahouti M., Ganjeali A., Entezari M.H. (2016). Anatomical and ultrastructural responses of *Brassica napus* after long-term exposure to excess zinc. *Turk J Biol.* 40: 652-660.
- Murphy E., Imahashi K., Steenbergen C. (2005). Bcl-2 regulation of mitochondrial energetics. *Trends Cardiovas Med.* 15: 283-290.
- Navarro Aviño J.P., Aguilar Alonso I., López-Moya J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 2007/2.
- Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 12: 125-134.
- NOM, 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SSA1-1993, "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al monóxido de carbono (CO). Valor permisible para la concentración de monóxido de carbono (CO) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación*, 23 de diciembre de 1994.
- NOM, 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-023-SSA1-1993. "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente respecto al bióxido de nitrógeno (NO₂). Valor normado para la concentración del bióxido de nitrógeno (NO₂) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación*, 23 de diciembre de 1994.
- NOM, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA1-2010. "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al dióxido de azufre (SO₂). Valor normado para la concentración de dióxido de azufre (SO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación*, 08 de septiembre del 2010.
- NOM, 2014. Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-2014, "Salud Ambiental. Valor límite permisible para la concentración de ozono (O₃) en el aire ambiente y criterios para su evaluación." *Diario Oficial de la Federación*, 19 de agosto del 2014.

- NOM, 2014. Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014. "Salud Ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación". Diario Oficial de la Federación, 20 de agosto del 2014.
- Nunes-Nesi A., Carrari F., Lytovchenko A., Smith A., Loureiro M.E., Ratcliffe G., Sweetlove L., Fernie A. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* 137: 611-622.
- Ojha M., Cattaneo A., Hugh S., Pawlowski J., Cox J.A. (2010) Structure, expression and function of *Allomyces arbuscula* CDP II (metacaspase) gene. *Gene.* 457: 25–34.
- Oshima R.J. (1974). A viable system of biological indicator monitoring air pollutants. *J Air Pollut Control Assoc.* 24: 576-578.
- Palatnik J.F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J.C., Weigel D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Panahi B., Mohammadi S.A., Ebrahimie E. (2013). Identification of miRNAs and their potential targets in halophyte plant *The Llungiella halophila*. *Biotechnol Acta.* 94: 285–290.
- Pelser P., Nordenstam B., Kadereit J., Watson L. (2007). And ITS Phylogenie of Tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. *Taxon.* 56: 1077-1104.
- Peralta-Pérez M.R., Volke-Sepúlveda T.L. (2012). La defensa antioxidante de las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Rev Mx Ing Quim.* 11: 75-88.
- Pereira B.B., Campos Junior E.O., Morelli S. (2013). *In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlandia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. *Ecotox Environ Saf.* 87: 17-22.
- Pérez Y., Galindo I., Arvelo F. (2007). La muerte celular programada en las plantas: ¿es semejante a la "apoptosis" en animales? *Interciencia* 32:812-819.
- Pérez-Pérez M.E., Couso I., Crespo J.L. (2012). Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy.* 8: 376-388.
- Pesaresi P., Masiero S., Eubel H., Braun H.P., Bhushan S., Glaser E., Salamini F., Leister D. (2006). Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* 18: 970-991.

- Petrov V, Hille J, Muller-Roeber, Gwechev T.S. (2015). ROS-mediate abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front Plant Sci.* 6: 1-16.
- Petrussa E., Casolo V., Peresson C., Braidot E., Vianello A., Macri F. (2004). The K⁺ ATP channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria. *Mitochondrion* 3: 297-307.
- Pruski J.F. (2012). Compositae of Central America- I. The tussilaginoide genus *Robinsonecio* (Senecionaceae), microcharacters, generic delimitation, and exclusion of senecioid *Senecio* cuchumatanaensis. *Phytoneuron* 38: 1-8
- Pulido M.D., Parrish A.R. (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.* 533: 227-241.
- Purayannur S., Kumar K., Chandra V., Kumar P. (2017). Phylogenomic analysis of MKKs and MAPKs from 16 legumes and detection of interacting pairs in chickpea divulge MAPK signaling modules. *Science* 7: 5026.
- Qin G., Ma Z., Zhang L., Xing S., Hou X., Deng J. (2007). *Arabidopsis* AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res.* 17: 249–263.
- Raaschou-Nielsen O., Andersen Z.J., *et al.* (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14: 813-822.
- Rajput M., Agrawal M. (2005). Biomonitoring air pollution in a seasonally dry tropical suburban area using wheat transplants. *Environ Monit Asses.* 101: 39-53.
- Rana R.M., Dong S., Ali Z., Huang J., Zhang H.S. (2012). Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stresses and hormones in rice (*Oryza sativa* L.). *Genet Mol Res.* 11: 3676–3687.
- Reape T.J., McCabe P.F. (2008). Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180: 13-26.
- Reape T.J., Molony E.M., McCabe P.F. (2008). Programmed cell death in plants: distinguish between different modes. *J Exp Bot.* 59:435-444.
- Reape T.J., McCabe P.F. (2010). Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* 15: 249-256.
- Reape T.J., McCabe P.F. (2013). Commentary: The cellular condensation of dying plant cells: Programmed retraction or necrotic collapse?. *Plant Sci.* 207: 135-139.

- Robert G. (2012). Estrés y muerte celular programada en leguminosas: efectos de la expresión de supresores de muerte celular. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Robert G., Melchiorre M., Racca R., Trippi V., Lascano H.R. (2009). Apoplastic superoxide level in wheat protoplast under photooxidative stress is regulated by chloroplast redox signals: Effects on the antioxidant system. *Plant Sci.* 177: 168-174.
- Rodrigues G.S., Ma T.H., Pimentel D., Weinstein L.H. (1997). *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 16: 325-359
- Rogers H.J. (2005). Cell death and organ development in plants. *Curr Top Dev Biol.* 71: 225-261.
- Ron D., Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 519-529.
- Ronemus M., Vaughn M.W., Martienssen R.A. (2006). MicroRNA- targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18: 1559–1574.
- Ruston, A.G. (1921). The plant as an index of smoke pollution. *Ann Appl Biol.* 7: 390-403.
- Samoli E., Aga E., Touloumi G., Nisiotis K., Forsberg B., Lefranc A., Pekkanen J., Wojtyniak B., Schindler C., Niciu E., Brunstein R., Dodic Fikfak M., Schwartz J., Katsouyanni K. (2006). Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Eur Respir J.* 27: 1129-1137.
- Sansón D., Zavaleta E. (2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Rev Mex Fitopatol.* 29: 154-164.
- Schwartzman R., Cidlowski A. (1993). Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.* 14: 133-51.
- Scott I., Logan D.C. (2007). Mitochondrial dynamics: the control of mitochondrial shape, size, number, motility, and cellular inheritance. In: Gray, J. (Ed.), *Programmed Cell Death in Plants*. Blackwell, Oxford, pp. 1-35.
- Scott I., Logan D.C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 177: 90-101.

- SEDEMA. (2012). Inventario de Emisiones de Contaminantes y de Efecto Invernadero. Primera Edición 2013. México, D.F. 175. Tomado de www.sedema.df.gob.mx/inventario_emisiones/
- Shah A.S., Langrish J.P., Nair H., McAllister D.A., Hunter A.L., Donaldson K., Newby D.E., Mills N.L. (2013). Global association of air pollution and hearth failure: a systematic review and meta-analysis. *LANCET*. 382: 1039-1048.
- Shah F.R., Ahmad N., Massod K.R., Peralta-Videa J.R., Ahmad F.D. (2010). Chapter 4: Heavy Metal Toxicity in Plants. *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer.
- Sheppard L., Levy D., Norris G., Larson T.V., Koenig J.Q. (1999). Effects of ambient air pollution on nonelderly asthma hospital admissions in Seattle, Washington, 1987-1994. *Epidemiology* 10: 23-30.
- Stahl R.G. Jr. (1997). Can mammalian and non-mammalian sentinel species data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants. *Hum Ecol Risk Assess*. 3: 329-335.
- Solís M.T., Chakrabarti N., Corredor E., Cortés-Eslava J., Rodríguez-Serrano M., Biggiogera M., Risueño M.C., Testillano P. (2014). Epigenetic changes accompany developmental programmed cell death in tapetum cells. *Plant Cell Physiol*. 55: 16-29.
- Sun, X., Xu, L., Wang, Y., Yu, R., Zhu, X., Luo, X., *et al.* (2015). Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics* 16: 197.
- Sunyer J., Ballester F., Tertre A.L., Atkinson R., Ayres J.G., Forastiere F., Forsberg B., Vonk J.M., Bisanti L., Tenías J.M., Medina S., Schwartz J., Katsouyanni K. (2003). The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital admissions for cardiovascular diseases in Europe (The APHEA- II Study). *Eur Heart J*. 24: 752-760.
- Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2: 70-78.
- Tsiatsiani L., Van Breusegem F., Gallois P., Zavalov A., Lam E., Bozhkov P. V. (2011). Metacaspases. *Cell Death Diff*. 18: 1279–1288.
- Tran V., Weier D., Radchuk R., *et al.* (2014). Caspase-Like Activities Accompany Programmed Cell Death Events in Developing Barley Grains. *PLoS ONE* 9: e109426.

- Unver T., Bakar M., Shearman R.C., Budak H. (2010). Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in responses to foliar glyphosate application. *Mol Genet Genomics*. 283: 397-413.
- Vacca R.A., Valenti D., Bobba A., Merafina R.S., Passarella S. (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiol*. 141: 208-219.
- Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Waliszewski S., Fernández S., Villalobos-Pietrini R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Rev Int Contam Ambient*. 29: 133-157.
- Van der Schallie W.H., Gardner H.S. Jr., Bantle J.A., De Rosa C.T., Finch R.A. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ Health Perspect*. 107: 309–315.
- Van der Wilden W., Herman E.M., Chrispeels J. (1980) Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc Natl Acad Sci*. 77: 428–432.
- van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.I., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishinura I., Jones A., Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L.A., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breuseger T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P.V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Diff*. 18: 1241-1246.
- Vanhee C., Zapotoczny G., Masquelier D., Ghislain M., Batoko H. (2011). The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell*. 23: 785-805.
- Ventura L., Giovannini A., Savio M., Doná M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D., Balestrazzi A. (2013). Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere* 92: 1-9.
- Wada S., Ishida H., Izumi M., Yoshimoto K., Ohsumi Y., Mae T., Makino A. (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol*. 149: 885–893.
- Wang R., Xu L., Zhu X., Zhai L., Wang Y., Yu R., *et al.* (2015). Transcriptome-wide characterization of novel and heat-stress-responsive microRNAs in radish (*Raphanus sativus L.*) using next-generation sequencing. *Plant Mol Biol Rep*. 33: 867-880.

- Wei X., Kyu S., Yu Y., Wang Z., Liu H., Pan D., Chen J. (2017). Phylloremediation of air pollutants: Exploiting the potential of plant leaves and leaf-associated microbes. *Front Plant Sci.* 8: 1-23.
- WHO. (2003). Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide, Report on WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15.
- WHO. (2005). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. Resumen de evaluación de riesgos. Actualización mundial.
- Wittenbach V.A., Lin W., Hebert R.R. (1982). Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.* 69: 98-102.
- Xiong Y., Contento A. L., Bassham D. C. (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 42: 535–546.
- Xiong Y., Contento A.L., Nguyen P.Q., Bassham D.C. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 291–299.
- Yaeno O., Matsuda K. (2004). Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* 40: 931-941.
- Yang X., Li L. (2012). Analyzing the microRNA Transcriptome in Plants Using Deep Sequencing Data. *Biology* 1: 297-310.
- Yao N., Eisfelder B.J., Marvin J., Greenberg J.T. (2004). The mitochondrion-an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40: 596-610.
- Yao N., Greenberg J.T. (2006). *Arabidopsis* accelerated cell death Modulates Programmed Cell Death. *Plant Cell* 18: 397-411.
- Zapata J.M., Guéra J., Carrasco E., Martín M., Sabater B. (2005). Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Differ.* 12: 1277-1284.
- Zhang B.H., Pan X.P., Cobb G.P., Anderson T.A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with a big impact. *Dev Biol.* 7: 203-214.
- Zhu J.K. (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 401-406.