



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Robinsoncio gerberifolius* Y *Senecio roseus* COMO BIOMONITORES DEL DAÑO
PROVOCADO POR LOS METALES PESADOS PROVENIENTES DE LA
CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA DEL VALLE DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIANA MARTÍNEZ PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

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

COMITÉ TUTOR:

**DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO, HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.
DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA,
UNAM.**

CD . MX., ENERO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

***Robinsonecio gerberifolius* Y *Senecio roseus* COMO BIOMONITORES DEL DAÑO
PROVOCADO POR LOS METALES PESADOS PROVENIENTES DE LA
CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA DEL VALLE DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIANA MARTÍNEZ PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

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

COMITÉ TUTOR:

**DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO, HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.
DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA,
UNAM.**

MÉXICO, CD. MX., 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE GEOLOGÍA
OFICIO CPCB/784/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

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 Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de septiembre de 2020** 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 **MARTÍNEZ PÉREZ MARIANA** con número de cuenta **306245840** con la tesis titulada "**Robinsonecio gerberifolius** Y **Senecio roseus** como biomonitores del daño provocado por los metales pesados provenientes de la contaminación atmosférica del valle de México", realizada bajo la dirección de la **DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
Suplente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Suplente: DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de noviembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



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 de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo recibido para continuar con mi formación académica.

Al Programa de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por aceptarme en el programa (CVU 855992), ya que sin el apoyo económico que me brindó no habría podido dar este importante paso.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM por el apoyo financiero para la realización de esta tesis, a través del proyecto IN112517.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera por haberme permitido trabajar en sus instalaciones, contribuir a sus investigaciones y por el otorgamiento de la Beca de Apoyo para Titulación y Obtención de Grado.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo, quien me dio la oportunidad de trabajar con ella, por todo lo que me enseñó y el apoyo que me brindó.

Al Dr. Francisco Arenas Huertero, quien siempre estuvo muy pendiente de mi trabajo, ya que con sus consejos y sugerencias me ayudó a mejorarlo, además que aprendí mucho de él.

A la Dra. Ma. del Carmen Leticia Calderón Ezquerro, por todos los consejos que me ayudaron a mejorar.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

En primer lugar a mi familia por apoyarme, una vez más, en todo lo que siempre necesité, en lo económico, en lo moral y en las decisiones que tomé. Sé que me seguirán apoyando.

A Dianita, que fuiste una de las grandes amistades que forjé durante este proceso, y que me apoyaste, me escuchaste, me ayudaste. Gracias por estar cuando lo necesité, tanto fuera como dentro del laboratorio.

A Luis, por ser tan buen esclavo jajaja broma. Tu ayuda fue invaluable, siempre apoyándonos mutuamente. Excelente amigo y excelente compañero.

A Omar, otro gran amigo, por todas las veces que me ayudaste y que me acompañaste.

A Mariana, ¡tocaya! Que siempre estabas dispuesta a ayudarme o a darme un consejo.

A una gran amiga desde siempre, Briseida que no dudó en apoyarme en cuanto yo lo necesité.

A Karuuuu (Carlos Figueroa), que siempre está dispuesto a ayudarme, aunque sea a distancia.

Una mención especial a Paola, de la que aprendí muchísimo y que gracias a ti pude avanzar más rápido. Siempre paciente y dispuesta a ayudarme.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por la asesoría técnica durante el desarrollo de la tesis y todo el tiempo que me dedicó para que aprendiera lo mejor posible.

A la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez por el apoyo técnico, por todos los consejos y todas las respuestas que me pudo brindar.

A los miembros del Jurado, la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, al Dr. Luis Felipe Jiménez García, al Dr. Juan José Rodríguez Mercado y al Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana, por revisar mi trabajo y brindarme sus correcciones, comentarios y sugerencias.

A la M. en C. Elizabeth Hernández Álvarez del Laboratorio de Geomagnetismo y Exploración Geofísica del Instituto de Geofísica por su apoyo técnico en la determinación de los metales pesados.

A Vicky, porque siempre me ayudó en todo lo que necesité.

A la M. en C. Montserrat Zaragoza Ojeda y a la QFB Marina Ramírez, por su invaluable ayuda.

Una mención especial a la Dra. Guadalupe Barajas, que a pesar de no conocerme, me apoyó para realizar el análisis estadístico para lograr la interpretación adecuada de los resultados.

Al Laboratorio de Investigación en Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, donde realicé algunos de los análisis necesarios.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Organismos biomonitores	8
Efectos de las especies reactivas de oxígeno	10
Sistema Superóxido Dismutasa-miR398	12
Carotenoides	15
Ensayo de reducción de bromuro 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico (MTT)	17
Electroforesis alcalina unicelular o ensayo cometa	18
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
General	22
Particulares	22
MATERIAL Y MÉTODO	23
Colectas y sitios de exposición	23
Ensayo cometa	23
Ensayo de reducción de MTT	24
Cuantificación de carotenoides	25
Expresión de miR398	25
A) Extracción de RNA	25
B) Cuantificación de RNA	26
C) Formación de los stocks de RNA	26
D) Síntesis de cDNA	26
Análisis químico de la acumulación de metales pesados	29
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	31
Ensayo cometa	31
Ensayo de MTT para la detección de EROs	32
Cuantificación de los niveles de carotenoides	33
Concentraciones de carotenoides tipo α	35
Concentraciones de carotenoides tipo β	36
Expresión del miR398	39
Metales pesados	40
Correlación entre las variables de estudio	42
DISCUSIÓN	46
Daño al DNA	46

Evaluación del estrés oxidante	47
Respuesta fisiológica: concentración de carotenoides	49
Regulación molecular del estrés oxidante: cuantificación del miR398	50
Análisis químico: concentración de metales pesados	51
Correlación entre las variables	54
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	59
APÉNDICE I: Especies utilizadas	66
APÉNDICE II: Estaciones de exposición	67
APÉNDICE III: Fotografías del ensayo cometa.	69

RESUMEN

En la Ciudad de México y el área metropolitana, uno de los principales problemas es la contaminación atmosférica y los efectos en la salud, consecuencia de la exposición a ésta, son ya un problema grave. Los metales pesados que suelen ser muy tóxicos y producen especies reactivas de oxígeno (EROs), forman parte importante de dicho tipo de contaminación.

Para evaluar de manera experimental si la contaminación atmosférica está afectando a determinada población, además de un análisis químico, se puede utilizar el biomonitoreo que permite la observación continua de cambios que pueden ser observables en organismos prueba. Las plantas han sido utilizadas por décadas para evaluar el riesgo al ecosistema de agentes químicos por lo que constituyen un modelo excelente para el estudio de los efectos de agentes tóxicos presentes en el ambiente.

La superóxido dismutasa (SOD) es considerada como la primera línea de defensa en contra de las EROs, y el miR398 que está asociado con la respuesta de varias condiciones de estrés oxidante, regula post-transcripcionalmente la presencia de la SOD, por lo que se considera a este miRNA como un buen marcador. La electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa es una prueba que ha sido utilizada como una herramienta útil para la detección de daño en el DNA.

Este trabajo se centró en evaluar el efecto del estrés oxidante provocado por los metales pesados presentes en la atmósfera contaminada del Valle de México a través de la respuesta de dos plantas silvestres: *Robinsonia gerberifolius* y *Senecio roseus*, expuestas en distintas fuentes de contaminación, durante las temporadas de lluvias y secas con el fin de identificarlas como biomonitores. Se consideraron cuatro sitios de exposición en la zona metropolitana de la Ciudad de México: el sitio rural ubicado en la estación de altura Alzomoni en el Parque Nacional Izta-Popo; y tres sitios urbanos: Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA), Ecatepec y Tlalnepantla.

Los resultados obtenidos se utilizaron para determinar la respuesta tanto a nivel genético como fisiológico de la contaminación ambiental en las dos especies de plantas. Se observaron diferencias significativas en todas las variables medidas, pero no en todas las condiciones evaluadas. El análisis de correlación de Spearman entre las variables y los datos obtenidos de los metales pesados evidenció diferencia estadística en una de las relaciones.

Ambas especies respondieron ante la contaminación atmosférica de diferentes sitios del Valle de México por lo que podrían ser utilizadas en análisis posteriores como biomonitores. Las dos especies presentaron mayor daño durante la temporada de lluvias y en los sitios CCA y Ecatepec y también tuvieron diferencias a lo largo del tiempo de exposición. Se pudo comprobar la presencia del miR398 en ambas especies, sin embargo, no se observó de manera clara el cambio de expresión asociado al estrés oxidante. Se cuantificaron EROs y carotenoides para determinar tanto el nivel de estrés de las plantas como su respuesta fisiológica. Si bien, se pudieron identificar ciertos puntos de estrés oxidante y cambio de concentración de carotenoides ante la contaminación, no fue posible asociarlos de manera directa con el daño al DNA.

ABSTRACT

In Mexico City and the metropolitan area, one of the main problems is air pollution and the effects of health, as a consequence of exposure to it, is already a serious problem. Heavy metals, which are usually very toxic and produce reactive oxygen species (ROS) are an important part of this type of pollution.

To evaluate experimentally whether air pollution is affecting a certain population, in addition to a chemical analysis, biomonitoring can be used which allows continuous observation of changes that may be observable in a test organism. Plants have been used for decades to assess the risk to the ecosystem of chemical agents, which is why they constitute an excellent model for studying the effects of toxic agents present in the environment.

Superoxide dismutase (SOD) is considered as the first line of defense against ROS, and miR398, that is associated with the response of various oxidative stress conditions, regulate post-transcriptionally the SOD's presence, so this miRNA is considered as a good marker. The single-cell gel electrophoresis or comet assay is a test that has been used as a useful tool for the detection of damage in DNA.

This work focused in evaluate the effect of oxidative stress caused for heavy metals present in the polluted atmosphere from the Valley of Mexico through the response of two wild plants: *Robinsonecio gerberifolius* and *Senecio roseus*, exposed in different sources of pollution, during the rainy and dry seasons in order to identify them as biomonitors. Four sites of the Mexico City metropolitan area were considered: the rural site in the Altzomoni altitud station in the Izta-Popo National Park; and three urban sites: Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA), Ecatepec and Tlalnepantla.

The results obtained were used to determine the response both at the genetic level and at the physiological level of the environmental pollution in the two species of plants. Significant differences were observed in all measured variables but not in all the conditions considered. Spearman's correlation analysis between variables and the data of heavy metals evidenced that only one of the relationships was significant.

Both species responded to air pollution of different sites of the Valley of Mexico so they could be used in subsequent analysis as biomonitors. The two species showed greater damage during the rainy season and at the CCA and Ecatepec sites and they also had differences throughout the exposure time. The presence of the miR398 in both species could be verified, however, a change in expression associated with oxidative stress was not clearly observed. Both ROS and carotenoids were quantified to determine both the stress level of the plants and their physiological response to it. Although it was possible to identify certain points of oxidative stress and change of concentration of carotenoids in the face of contamination, it was not possible to directly associate DNA damage.

INTRODUCCIÓN

En la Ciudad de México y el área metropolitana, uno de los principales problemas actuales es la contaminación ambiental, y posiblemente el más grave es la atmosférica. Pues tanto el desarrollo acelerado de la industria con sus residuos como la combustión incompleta de hidrocarburos, debido a los más de 4 millones de vehículos que circulan diariamente (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015), y el uso de agroquímicos, constituyen un importante riesgo para los organismos que se encuentran en contacto con estos componentes (Ansoar *et al.*, 2015). Esta ciudad tiene un área de aproximadamente 7854 km², se encuentra rodeada de crestas montañosas en una cuenca elevada a más de 2240 m sobre el nivel del mar, este tipo de relieve junto con las inversiones de temperatura del aire atrapan las emisiones de contaminantes cerca de la superficie (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015).

Los efectos sobre la salud, consecuencia de la exposición a estos contaminantes atmosféricos, que están por encima de los estándares actuales de calidad del aire (Organización Mundial de la Salud, 2016), son un tema muy importante para los más de 24 millones de personas que viven en la Ciudad de México (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015). Otro factor que influye en el impacto de la contaminación es la distribución del área urbana, pues mientras que en el sur como en el oeste (donde se tiene acceso a cubierta vegetal, agua y mejores redes de carreteras) se ubica la población con mayor estatus socioeconómico, hacia el norte se encuentra la región industrial y en el este hay asentamientos de población con un nivel socioeconómico más bajo, cuyos servicios son limitados. De acuerdo a esta distribución, las emisiones más significativas provienen justo de la parte oriental del área metropolitana que incluye a varios municipios del Estado de México y son influenciadas por la actividad vehicular tanto en caminos pavimentados como no pavimentados así como las industrias asentadas (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015; Olvera *et al.*, 2019).

La contaminación atmosférica se define como “la presencia en el aire de materia o formas de energía que impliquen riesgo, daño o molestia grave para las personas y bienes de cualquier naturaleza” (Martínez y Díaz de Mera, 2004), y que además “puede originarse de fuentes naturales o antropogénicas” (Pepper *et al.*, 2006). Este tipo de contaminantes se pueden encontrar en localidades urbanas y provienen de dos tipos de fuente de combustión: móviles

(tránsito de vehículos) y fijas: (industrias, usos residenciales, procesos de eliminación de residuos). Ambas fuentes producen generalmente sustancias inorgánicas como el óxido de nitrógeno (NO_x), dióxido de azufre (SO₂), ozono (O₃), monóxido de carbono (CO), etc. (Zuluaga *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2018), aunque el 10% de estos componentes son de origen geológico (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015). Las partículas de las que está hecha son una mezcla compleja de sólidos y líquidos; su constitución y tamaño varía según a la fuente de emisión y a las condiciones atmosféricas. Mientras más pequeñas mayor es su potencial para impactar en la salud (Fajersztajn *et al.*, 2017), o dependiendo de las condiciones ambientales, estos contaminantes pueden ser transportados a largas distancias desde la fuente de emisión (Pepper *et al.*, 2006). También, llegan a estar presentes en un porcentaje importante los metales pesados como el plomo, el cadmio o el mercurio (Morton-Bermea, 2006). Además de otros factores como la luz ultravioleta, cuyas longitudes de onda de alta energía pueden ser selectivamente absorbidas por el ozono y el oxígeno, pero al llegar a la superficie de la Tierra son deletéreos para la vida y también contribuyen a la producción de “smog” fotoquímico (Pepper *et al.*, 2006).

Este tipo de contaminación puede impactar sobre personas, animales y plantas (Martínez y Díaz de Mera, 2004), por lo que es posible que repercutan de manera inmediata en la salud de la población pues se estima que es causante del 1.4% de las muertes en el mundo (Ballester, 2005) y se les relaciona con más del 60% de las enfermedades provocadas por infecciones de las vías respiratorias (Zuluaga *et al.*, 2009). Incluso la presencia de partículas más finas está relacionada con la morbilidad y mortalidad, consecuencia de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Fajersztajn *et al.*, 2017; Newell *et al.*, 2018), además de ser consideradas como factores de riesgo para el desarrollo de fisiopatologías entre las que se encuentran la neuroinflamación y la neurodegeneración (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015).

Entre los numerosos efectos fisiológicos que tienen este tipo de agentes se encuentran desde la irritación hasta la muerte de células y tejidos (Zuluaga *et al.*, 2009). También se les ha asociado con el estrés oxidante sistémico y respuestas inflamatorias activas tanto en modelos animales como en seres humanos expuestos a ambientes contaminados (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015).

Numerosos estudios proveen evidencia que sustenta la hipótesis que los mutágenos presentes en la atmósfera son los causantes de cambios perjudiciales en el DNA relacionados con el desarrollo de cáncer (Zuluaga *et al.*, 2009). Por lo anterior se le considera como un problema grave de salud pública ya que toda la población está expuesta a los niveles de contaminación y temperatura que resultan constantes aunado a que la movilidad geográfica es mínima (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015).

La contaminación atmosférica no sólo afecta de manera directa al ser humano, sino que también se considera como un riesgo ecológico, puesto que la vegetación puede absorber varios de estos contaminantes a través de estomas o por su disposición en la superficie foliar. Cuando las concentraciones son demasiado elevadas pueden llegar a causar lesiones en las hojas y su exposición crónica a bajas concentraciones puede provocar que las plantas sean susceptibles a enfermedades e insectos depredadores (Pepper *et al.*, 2006).

Los metales pesados son contaminantes ambientales que se consideran dentro de los más deletéreos, debido a su toxicidad y persistencia. El que un metal pesado no se pueda degradar significa que es difícil eliminar sus átomos, lo que conduce a que se acumule tanto en el ambiente como en los organismos que entren en contacto con ellos (Pepper *et al.*, 2006). En concentraciones por encima de su umbral pueden llegar a ser altamente peligrosos (Kumar, 2016).

De acuerdo con Moreno-Sánchez y Devars (1999), los metales pesados son aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5 g/mL o posee un número atómico mayor a 20. Suelen ser muy tóxicos para la mayoría de los organismos (siendo los no esenciales los más peligrosos) y aunque hay algunos como el zinc o el hierro que son esenciales para el correcto funcionamiento fisiológico (Naja y Volesky, 2009) en exceso llegan a ser perjudiciales (Pepper *et al.*, 2006).

En general, los organismos necesitan una red de homeostasis de metales altamente controlada para sobrellevar este tipo de estrés (Clemens, 2006). En la contaminación atmosférica, entre los metales pesados más comunes se encuentran el cadmio, el plomo y el mercurio, que además son considerados de los más tóxicos (Naja y Volesky, 2009).

Al no poder degradarse de manera metabólica, los metales tienden a acumularse en los tejidos, causando serios problemas de salud o incluso la muerte (Naja y Volesky, 2009). Debido a su naturaleza, desplazan y reemplazan iones metálicos esenciales en varias enzimas, además de que pueden llegar a oxidar a grupos tiol en las proteínas, provocando un mal plegamiento o deficiente funcionamiento (Clemens, 2006). A nivel genético pueden llegar a unirse al DNA (Freedman, 1995), alterando su estructura y función por lo que se les denomina agentes genotóxicos (Zuluaga *et al.*, 2009), éstos han sido reportados en distintos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Villarini *et al.*, 2009), generalmente se monitorean por la inducción de mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas (Ashby, 1982). Parte de los efectos que pueden generar estos agentes son rupturas de cadenas de DNA, modificaciones de bases nitrogenadas y enlaces cruzados que pueden resultar en mutaciones génicas (Ansoar *et al.*, 2015). Se ha visto que una elevada cantidad de metales en el ambiente, en ocasiones está correlacionada con el incremento de su concentración en los tejidos de las plantas, como el diente de león (Keane *et al.*, 2001).

Organismos biomonitores

Pero ¿cómo determinar de manera experimental que la contaminación atmosférica de cierto lugar está afectando a la población? Además de un análisis químico convencional de los elementos presentes en la atmósfera, se pueden utilizar cierta clase de organismos para estudiar los efectos que tienen en un sistema vivo (Villarini *et al.*, 2009). Se realizan pruebas en laboratorio con distintas especies, ya sea animales o vegetales, cuyos datos son utilizados para estimar el riesgo al cual la población humana está expuesta (Grant y Zura, 1982).

Los monitores biológicos se han definido como organismos que dan información de manera cuantitativa sobre algún aspecto de su ambiente; por ejemplo, el grado de contaminación (Keane *et al.*, 2001). Estos bioindicadores ambientales son adecuados para la observación a largo plazo de los ecosistemas y se pueden aplicar en diferentes matrices ambientales: suelo, aire, agua, etc. (Morton-Bermea, 2006). El poder vigilar los contaminantes ambientales genotóxicos tiene dos propósitos principalmente:

- a) Estudiar el riesgo que podrían representar para los organismos expuestos.

b) Evaluar dicho riesgo de exposición para los seres humanos con ayuda del uso de diferentes modelos biológicos (Ansoar *et al.*, 2015).

Los biomarcadores pueden ser de naturaleza morfológica (muestran una reducción en el crecimiento de una población, decoloración y cambios en la abundancia o comportamiento), química o físico-bioquímica (evidencian reducción de la actividad enzimática o la inhibición de ciertas funciones fisiológicas) (Morton-Bermea, 2006). Asimismo, los sistemas de biomonitorio se pueden dividir en dos categorías:

- a) Pruebas ecológicas (basadas en comunidades biológicas comparando las áreas afectadas con un área testigo),
- b) Pruebas de toxicidad (se utilizan para conocer el daño general de cierto ecosistema) (Morton-Bermea, 2006).

A pesar de que cualquier organismo se puede utilizar para evaluar la toxicidad de sustancias (Pepper *et al.*, 2006), se cree que un buen monitor biológico debe ser aquella especie que presenta gran cantidad de individuos sobre determinada área geográfica, que tenga alta tolerancia a los agentes tóxicos y tienda a acumular contaminantes hasta el nivel en el que reflejen su presencia en el ambiente, por ello su composición química aporta una aproximación de la magnitud del daño en dicho ambiente (Keane *et al.*, 2001). El biomonitorio tiene varias ventajas, es simple, barato y evidencia el posible impacto local en determinado ambiente. Permite la observación continua del área a través de cambios que pueden ser observables y medibles, además de distinguirlos de los efectos del estrés natural y dar una visión sobre el efecto que se tendría sobre los seres vivos (Kumar 2016). También se considera que buenos modelos para llevar a cabo el biomonitorio de contaminantes atmosféricos son las especies nativas del lugar a estudiar (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018a).

Existen dos tipos de biomonitores, las especies sensibles y las especies acumuladoras. Las primeras indican la presencia de algún contaminante a través de la aparición de lesiones o malformaciones, mientras que las especies acumuladoras, almacenan los contaminantes en su estructura. Otra categoría adicional, son aquellas que proliferan y llegan a ser abundantes en áreas contaminadas (Kumar, 2016). Asimismo, las especies sensibles pueden ser utilizadas como

bioindicadores mientras que las más tolerantes es posible usarlas como una forma de almacén de los contaminantes (Kumar, 2016).

En particular, muchas especies de plantas actúan como bioacumuladores de todo tipo de contaminantes, incluyendo los atmosféricos tanto dentro como sobre sus tejidos. En el caso de plantas vasculares éstos pueden asimilarse a través de la absorción foliar o de las raíces (Grant y Zura, 1982). Han sido utilizadas por décadas para evaluar el riesgo ecológico de agentes químicos derivados de la agricultura y la industria, así como de residuos sólidos y contaminación radioactiva (Kovalchuk y Kovalchuk, 2008), razón por la cual constituyen un modelo excelente para el estudio de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente.

En el caso de biomonitoreo *in situ* se ha optado por utilizar plantas superiores porque llega a ser un método útil y sencillo para analizar el efecto de la contaminación ambiental en lugares específicos (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018a).

Efectos de las especies reactivas de oxígeno

El estrés abiótico está asociado con la producción de las EROs, las cuales incluyen principalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Gallego *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2013; Sytar *et al.*, 2013) ya que son formas mucho más reactivas del oxígeno que pueden estar constituidas por transmisión de energía o por reacciones de transferencia de electrones (Mittler *et al.*, 2004). Estas especies tienen un papel dual en el metabolismo de las plantas, pueden ser tanto subproductos tóxicos como reguladores clave de procesos como el crecimiento, el desarrollo y la defensa (Mittler *et al.*, 2004). Por lo tanto, cuando hay una perturbación en el balance redox celular en favor de estos pro-oxidantes (Apel y Hirt, 2004; Ciurli *et al.*, 2014), se desencadena el llamado estrés oxidante y puede provocar daño en macromoléculas celulares, como degradación de proteínas, generación de puentes cruzados en el DNA, peroxidación de lípidos (Gallego *et al.*, 2005; Genisel *et al.*, 2015), e incluso algunos, como el H_2O_2 , pueden activar la muerte celular programada (Apel y Hirt, 2004). Otro efecto causado por las EROs en las plantas incluye el daño al aparato fotosintético, alterando la clorofila o su producción (Kumar, 2016).

La formación de las EROs está altamente regulada por vías de secuestro en la célula vegetal en las cuales involucra a distintos antioxidantes, una alteración en este sistema también es conocido como estrés oxidante (Pérez y Pérez de Alejo, 2000), que es el principal síntoma de toxicidad que presentan las plantas y por lo tanto han desarrollado sus propios mecanismos de defensa, como los antioxidantes (Choudhury *et al.*, 2013; Sytar *et al.*, 2013). Un antioxidante se define como: cualquier sustancia que en condiciones normales posee afinidad mayor para interaccionar con un radical libre que cualquier otra molécula (Pérez y Pérez de Alejo, 2000).

Las plantas pueden generar EROs a través de la fotosíntesis y respiración en compartimentos como los cloroplastos o las mitocondrias, donde hay un enorme flujo de electrones (Mittler *et al.*, 2004), pero también por la activación de oxidasas y peroxidasas, las cuales se producen en respuesta a los cambios ambientales (Apel y Hirt, 2004). En particular, la toxicidad provocada por los metales pesados en las plantas es caracterizada por aumentar la producción de EROs (Pérez y Pérez de Alejo, 2000; Choudhury *et al.*, 2013) dentro de compartimientos subcelulares o por la disminución de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Kumar, 2016). Aunque el incremento en la concentración de EROs en las plantas se desencadena tanto por estrés biótico como abiótico, generalmente se les atribuye diferentes mecanismos (Apel y Hirt, 2004).

Como ya se mencionó, las EROs juegan papeles cruciales en los procesos fisiológicos normales debido a que son moléculas señalizadoras (Apel y Hirt 2004; Gallego *et al.*, 2012). Esta señalización, dependerá del nivel de EROs que se produzca en la célula y será percibido por diferentes proteínas, enzimas o receptores (Mittler *et al.*, 2004). En cuanto su concentración aumenta, este cambio repercute en la expresión génica lo cual ocurre a través de la oxidación de componentes de las vías de señalización provocando activación o inactivación de factores de transcripción sensibles al ambiente redox intracelular (Mittler *et al.*, 2004; Gallego *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2013). Lo anterior provoca una activación de las vías de defensa contra las EROs (Mittler *et al.*, 2004). Esto se ha descrito en *Arabidopsis*, donde una molécula como H₂O₂ puede llegar a afectar una red de hasta 152 genes (Choudhury *et al.*, 2013), los cuales responden de una manera altamente específica dependiendo del tipo de estrés que esté afectando (Mittler *et al.*, 2004).

Para sobrellevar el daño oxidante provocado por las EROs, las plantas han desarrollado complejos sistemas antioxidantes. Cuando se aumenta la actividad de las enzimas encargadas de estos sistemas, se provee a la planta de protección y desarrollará tolerancia al estrés ambiental (Genisel *et al.*, 2015). Estas defensas antioxidantes incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasa (POD) y antioxidantes no enzimáticos como glutatión, ascorbato, grupos tiol y pigmentos como las antocianinas y los carotenoides, por mencionar algunos (Gallego *et al.*, 2012; Ciurli *et al.*, 2014). Este sistema de desintoxicación de la célula se pondrá en marcha dependiendo del nivel de concentración de metales que haya en la misma (Gallego *et al.*, 2012). Por ejemplo, las plantas tienen múltiples genes que codifican para las SODs cuyas isoformas son dirigidas de manera específica hacia los cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, entre otros organelos (Apel y Hirt, 2004).

Debe prevalecer un balance entre las SODs y las diferentes enzimas eliminadoras de H_2O_2 el cual es fundamental para determinar un nivel estacionario de $O_2\cdot^-$ y H_2O_2 . Este balance, junto con el secuestro de iones de metal previenen la formación del $\cdot OH$ a través de las reacciones de Haber-Weiss o la de la vía de Fenton, esta última dependiente del metal (como el Fe^{2+}) (Mittler *et al.*, 2004).

Sistema Superóxido Dismutasa-miR398

Las SODs son consideradas como la línea inicial de defensa en contra de las EROs, pues son las primeras en intervenir cuando se forman para minimizar sus efectos o eliminarlas. Son un grupo importante de metaloenzimas encargadas de catalizar la reducción de los radicales libres generados a partir de la transformación del $O_2\cdot^-$ en H_2O_2 y así ayudar a mantener las EROs a un nivel basal (Genisel *et al.*, 2015). Posteriormente, el H_2O_2 es desintoxicado tanto por las catalasas como por las glutatión (Vázquez, 2005). Un aumento en la actividad de la SOD puede ser atribuido al aumento en la concentración del radical superóxido (Genisel *et al.*, 2015).

Debido a lo anterior, las SODs son un importante indicador de estrés por lo que son utilizadas frecuentemente como biomarcador. De acuerdo con varios estudios, la actividad de las SODs ha aumentado en un 22% de las investigaciones de laboratorio en contraste con un 73% de las que

se llevaron a cabo en campo. Entonces, debido a esta elevada variabilidad entre los dos tipos de estudio, se necesita una validación muy precisa (Vázquez, 2005).

Por otra parte, los microRNAs (miRNAs) corresponden a una gran familia de RNAs pequeños no codificantes (ncRNA) de aproximadamente 18-24 nucleótidos de longitud que son críticos en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes y son los ncRNAs más estudiados (Bartel, 2004). Este tipo de regulación se da a nivel del pre-mensajero de RNA y uno de los mecanismos más conocidos es el del silenciamiento del RNA (Floris *et al.*, 2009). El proceso que presentan en general es el siguiente: los miRNAs derivan de los genes MIR, a partir de los cuales se forman los miRNAs primarios que constituyen una estructura secundaria la cual es cortada por las enzimas DiCer-Like 1 (DCL1) y forma un precursor tipo tallo-asa. Posteriormente, es transportado hacia el citoplasma y se une a una proteína Argonauta (AGO), con la cual conformará el complejo efector del silenciamiento genético (Naya *et al.*, 2014; Dinkova y Juárez, 2016). Los miRNAs reprimen la expresión del mRNA blanco llevando a cabo una escisión en éste o inhibiendo su traducción después del reconocimiento de sus bases complementarias (Mallory *et al.*, 2008; Naya *et al.*, 2014). Tanto en plantas como en animales esta represión se da por complementariedad de bases con sus mRNA objetivo (Mallory *et al.*, 2008).

En mamíferos los miRNAs regulan la expresión de más del 60% de los genes que codifican para proteínas a través del apareamiento de bases con el extremo 3'; UTR del mRNA (Johnston y Hobert, 2003; Huang *et al.*, 2008). En plantas están involucrados tanto en procesos de desarrollo como en respuesta a estrés, principalmente abiótico (Floris *et al.*, 2009), donde la secuencia de los miRNAs es altamente complementaria con la de su mRNA blanco (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018b). Esta interacción generalmente conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas ya sea por degradación o por la represión traduccional de los RNA mensajeros. Estos miRNAs participan en la regulación de muchos procesos, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis y desarrollo (Johnston y Hobert, 2003; Huang *et al.*, 2008). En el desarrollo, el papel de los miRNAs se evidencia en *A. thaliana* cuando se observan alteraciones fenotípicas en mutantes de la vía de biogénesis de los miRNAs (Dinkova y Juárez, 2016). En plantas los miRNAs tienen el mismo procesamiento, con algunas variaciones (Bartel, 2004).

Diversas investigaciones demuestran que la regulación post-transcripcional de la expresión de genes desempeña un papel importante ante la respuesta a estrés abiótico en plantas, y los miRNAs, cuya función en este tipo de respuesta es esencial, se evidencian como reguladores centrales de respuesta a numerosos estresores abióticos (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Sunkar *et al.*, 2006). Se ha observado que varios miRNAs que participan en etapas del desarrollo de la planta, también están reportados con expresión modificada por diversos tipos de estrés, y debido al impacto que pueden llegar a tener ante situaciones de estrés se ha establecido que forman parte de la respuesta inmune de la planta, además se les podría considerar como biomarcadores tanto a los propios miRNAs como a componentes de su ruta de biogénesis (Mallory *et al.*, 2008; Dinkova y Juárez, 2016).

Se proponen dos tipos de mecanismos por los cuales los miRNAs participan en la respuesta a condiciones estresantes (Floris *et al.*, 2009):

- a) Se reprimen los reguladores negativos de tolerancia al estrés, debido a la expresión de miRNAs.
- b) Acumulación de reguladores positivos de tolerancia al estrés, por la supresión de miRNAs.

El miR398 es un miRNA que está regulado por el estrés oxidante y que a su vez regula a las SODs pues se ha observado que tienen un patrón de expresión inverso. Este sistema es de los más estudiados y está presente en *Arabidopsis thaliana*. En condiciones normales se expresan continuamente tanto el miR398 como a los genes de las SODs, pero el primero suprime transcripcionalmente a los segundos. En condiciones de estrés oxidante, se suprime la expresión del miR398 y en consecuencia se da un aumento de las SODs las cuales, como ya se mencionó, ayudan a eliminar al O^{2-} y al H_2O_2 para que se pueda regular el estrés oxidante en la célula (Sunkar *et al.*, 2006).

Carotenoides

Los carotenoides son un conjunto de pigmentos, pertenecientes a los isoprenoides y cuentan con más de 750 miembros en plantas, algas, hongos y bacterias (Racchi *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015). Tienen una estructura general de esqueletos de polienos con 40 carbonos con dobles enlaces conjugados y anillos terminales (Yuan *et al.*, 2015). Ocupan el segundo lugar como los pigmentos más abundantes en la Tierra (Nisar *et al.*, 2015) y son responsables de algunas coloraciones vegetales como el rojo, amarillo y naranja, aunque también pueden ser incoloros (Nisar *et al.*, 2015). Estos pigmentos son componentes esenciales del sistema fotosintético, donde sirven como pigmentos accesorio y aumentan la absorción de luz (Ramel *et al.*, 2012), además de que actúan como antioxidantes, por lo que son importantes componentes de la defensa en contra del estrés oxidante en las células (Hannoufa y Hossain, 2012, Felemban *et al.*, 2019). Algunos de los ejemplos más comunes son el β -caroteno, licopeno y la luteína, entre otros (Nisar *et al.*, 2015). Por otra parte, también fungen como precursores del ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas, dos importantes fitohormonas cuyas funciones son clave para la regulación de procesos del desarrollo y respuesta al estrés en la planta (Yuan *et al.*, 2015).

Los carotenoides se dividen en dos clases de acuerdo a su composición: carotenos, que contienen sólo carbono e hidrógeno y las xantofilas que son formas oxigenadas de los carotenos. La síntesis de estos pigmentos se da a partir del fitoeno y sigue una serie de reacciones hasta llegar al licopeno del cual se derivan el α -caroteno y el β -caroteno, los cuales son considerados dentro de un grupo altamente activo que desactiva al oxígeno molecular singlete (Racchi, 2013). De todos los carotenoides que existen, la mayoría muestra actividad antioxidante y la mejor documentada es aquella donde sofoca al oxígeno singlete molecular y atrapa a los radicales peróxido (Racchi, 2013).

En estudios que se han realizado *in vitro* de soluciones de carotenoides a las que se les agrega generadores de $^1\text{O}_2$ se mostró que estos pigmentos pueden ser directamente oxidados por $^1\text{O}_2$ lo que produce una gran variedad de derivados oxidados (Ramel *et al.*, 2012). El β -caroteno-5,8-endoperoxido es uno de estos compuestos y se ha detectado en plantas que crecieron en un ambiente con poca luz, lo cual sugiere una oxidación crónica, por otra parte el

estrés por exceso de luz induce una rápida acumulación de este mismo compuesto lo cual está correlacionado con el grado de fotoinhibición del PSII y la pérdida del β -caroteno (Ramel *et al.*, 2012).

La cantidad y tipo de carotenoides varían en respuesta tanto a estrés biótico como abiótico, así como durante procesos de desarrollo (Hannoufa y Hossain, 2012). En este aspecto, los carotenoides y sus productos resultado de la degradación oxidante y enzimática son llamados apocarotenoides, y son esenciales para diversos procesos biológicos en las plantas, como la formación de los fotosistemas, pero también se ha propuesto que participan como moléculas de señalización (Nisar *et al.*, 2015).

Inevitablemente en la fotosíntesis se generan subproductos que son altamente reactivos, lo que causa daño oxidante y en consecuencia disminuye la eficiencia de la fotosíntesis (Nisar *et al.*, 2015). Por lo que es importante que la proporción de clorofilas/carotenoides se conserve constante para que el sistema fotosintético se mantenga estable (Hannoufa y Hossain, 2012). La estructura atómica rica en electrones de los carotenoides los hacen susceptibles a la oxidación lo cual rompe su esqueleto (Racchi, 2013; Felemban *et al.*, 2019) y son las carotenoides dioxigenasas las encargadas de romper esos enlaces y convertir a los carotenoides en apocarotenoides, regulando su acumulación (Nisar *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2015). Sin embargo, los apocarotenoides también surgen por la presencia de EROs y en ambos casos cumplen con funciones biológicas importantes, puesto que algunos son precursores del ABA y las estrigolactonas (Felemban *et al.*, 2019). Otro tipo de apocarotenoides son señalizadores moleculares de la respuesta celular a estrés oxidante o incluso en el proceso de crecimiento de la planta (Felemban *et al.*, 2019). ABA se conoce que regula la apertura de los estomas para la respiración y la fotosíntesis, aunado a lo anterior se induce la expresión de genes relacionados con la defensa en contra de patógenos. Lo mismo ocurre también cuando hay ligera deshidratación en la planta (Felemban *et al.*, 2019).

Varios son los estudios que se han hecho para evaluar el efecto de los metales pesados en los pigmentos de las plantas. Wang *et al.* (2019), analizaron la variación en las concentraciones de las clorofilas y los carotenoides en hojas de *Pinnus massoniana* L. el cual está presente en un

ambiente de estrés por depósitos de Pb y Zn. Demostraron que los metales pesados afectan las concentraciones de pigmentos en función de la concentración del metal presente.

Vladimirovna *et al.* (2019) evaluaron las concentraciones de metales pesados tanto en el suelo como en muestras de *Larix sibirica* en diversas zonas urbanas, provenientes de industrias como la de construcción, y estas las correlacionaron con los niveles de diversas biomoléculas, entre las cuales se encuentran las clorofilas a y b y carotenoides. Encontraron que la concentración de los pigmentos variaba en cada zona y que aumentaba en aquellas donde había más metales pesados, además que la proporción que existe entre la cantidad de estos pigmentos cambiaba.

Ensayo de reducción de bromuro 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)

El ensayo de reducción de MTT es una prueba que se ha utilizado por muchos años para evaluar la viabilidad celular. Se trata de sales de tetrazolio que son reducidas a formazanos insolubles en agua por los sistemas de citocromos presentes en las mitocondrias, y el color que resulta, puede ser medido con métodos de espectroscopia básica (Prabst *et al.*, 2017) lo cual se utiliza como una medida directa de la viabilidad de un cultivo (Baltrop y Owen, 1991). Es decir, cuando la actividad metabólica se mantiene en un cultivo, se puede determinar su densidad celular en función a la concentración de color resultante.

La reacción de reducción se lleva a cabo porque las sales de MTT poseen grupos laterales lipofílicos y su carga neta es positiva por lo que es capaz de atravesar las membranas celulares y es reducido en células vivas, ya sea por la mitocondria o por enzimas del plasma celular utilizando NADH, NADPH, succinato o piruvato como donador de electrones (Prabst *et al.*, 2017). Los productos resultantes del ensayo de MTT forman un cristal sólido que eventualmente destruye a la célula, por lo que en este punto la reacción se detiene (Prabst *et al.*, 2017).

También existen reacciones no enzimáticas con moléculas reductoras como el ácido ascórbico, la glutatión y la coenzima A, las cuales pueden reducir las sales de MTT (Prabst *et al.*, 2017).

Como ya se mencionó, esta prueba se utiliza, de manera generalizada, para evaluar la toxicidad y la viabilidad celular. Sin embargo, ya ha sido utilizado para otros objetivos. En el grupo de Genotoxicología Ambiental, se ha utilizado dicha metodología para evaluar la concentración de radicales libres en plantas de *Taraxacum officinale* expuestas a la contaminación del Valle de México (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018b).

Electroforesis alcalina unicelular o ensayo cometa

Es una prueba desarrollada hace aproximadamente 30 años y que desde entonces ha sido empleada como una herramienta útil para la detección de rompimientos de hebra sencilla, sitios alcali-lábiles (sitios apúricos y apirimídicos) en el DNA (Valverde y Rojas, 2009) y eventos incompletos de reparación (Collins, 2014). Detecta el daño producido por diversos agentes sobre el DNA de las células de manera individual, donde las células en las cuales ha sido dañado su DNA, al ser sometidos a una electroforesis en un pH alto (≥ 13) (Collins, 2014), los fragmentos migran del núcleo originando la forma de un cometa al dirigirse al ánodo (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). De tal manera, que el desplazamiento de DNA del núcleo, es usado como un indicador de daño (Östling y Johanson 1984). Así cada célula afectada aparecerá como un cometa cuando se observa al microscopio de fluorescencia, con una cabeza y una cola; las células no alteradas aparecen con su núcleo intacto y no presentan cola (Möller, 2006). Esta técnica además de ser sensible, sencilla, rápida, económica es aplicable para cualquier tipo de célula, ya que se considera buen indicador para detectar daño al DNA (Ansoar *et al.*, 2015).

Esta prueba se ha vuelto muy popular para medir el daño al DNA causado por distintos factores, como el estrés oxidante causado por las EROs, radiación ionizante, fitocompuestos, nanopartículas, matrices complejas de contaminantes, por mencionar algunos (Santos *et al.*, 2015). Se pueden llevar a cabo pruebas tanto de genotoxicidad como de biomonitorio además de ser aplicable en varios tipos celulares desde cultivos de células de mamíferos hasta en tejidos vegetales (Collins, 2014). Esto se debe principalmente a que arroja resultados similares al de otras pruebas para evaluar la genotoxicidad, entre las que se encuentran la de micronúcleos o el intercambio de cromátidas hermanas (Valverde y Rojas, 2009).

Los datos pueden ser obtenidos de forma manual o con análisis basados en imágenes del daño al DNA y se pueden utilizar distintos parámetros de medición, como son el porcentaje de migración del DNA en la cauda a través del momento o la longitud de la cauda misma. La medición del momento de la cauda es una de las que se consideran que dan la mejor información para realizar la evaluación de daño, sobre todo al utilizar un analizador de imagen para obtener los datos (Valverde y Rojas, 2009).

Algunas de sus aplicaciones se dirigen específicamente a monitorear poblaciones humanas cuya salud está en riesgo, pues representa una herramienta útil para adquirir conocimiento sobre niveles reales de exposición a xenobióticos y para identificar tendencias en riesgo de exposición de las poblaciones humanas (Valverde y Rojas, 2009). Sin embargo, a pesar de que se puede evaluar el daño genotóxico con el ensayo cometa, se necesitan otros estudios para identificar los mecanismos moleculares que están relacionados con este efecto (Valverde y Rojas, 2009).

Existen muchas investigaciones que han utilizado el ensayo cometa para evaluar el daño genotóxico provocado por distintos tipos de agentes en plantas. En la revisión de Santos *et al.* (2015) se describen evaluaciones realizadas con radiación, metales pesados, nanocompuestos, contaminantes orgánicos, matrices de contaminación y fitocompuestos. En la mayoría emplean diversos modelos de plantas, entre los que destacan *Arabidopsis thaliana* y *Vicia faba*. Aunque muchos de estos estudios usan un solo compuesto con cierta dosis establecida, hay algunos que experimentaron en diversos sitios caracterizados por estar contaminados ya sea por desechos de minas, fábricas o contaminación atmosférica y utilizan diferentes especies como monitores para evaluar este daño.

El ensayo cometa es muy utilizado en pruebas de biomonitoreo con plantas. En Perugia, Italia, un grupo de investigadores expuso plantas de *Tradescantia* y *Nicotiana tabacum* en tres sitios con distinto grado de contaminación, para evaluar la genotoxicidad de ésta en el polen y las hojas por medio de este ensayo y la prueba de micronúcleos. Correlacionaron la presencia de ciertos contaminantes con una elevada frecuencia de micronúcleos y cometas en las muestras (Villarini *et al.*, 2009).

En el área metropolitana de la Ciudad de México se realizó un estudio de biomonitorio con dos plantas silvestres, el diente de león, *Taraxacum officinale* y la margarita de los volcanes, *Robinsonecio gerberifolius*. En este se evaluó el daño a nivel genético en las dos plantas provocado por la contaminación atmosférica utilizando el ensayo cometa. Las plantas fueron expuestas por 6 semanas en dos sitios con diferente nivel de contaminación en distintas condiciones meteorológicas y cada dos semanas se colectó material para realizar el ensayo con las hojas. Se demostró que el daño aumentó en las hojas conforme se incrementó el tiempo de exposición y se correlacionó con la presencia de diversos metales pesados monitoreados durante ese lapso (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018a).

Con relación a lo anterior, la contaminación atmosférica es un tema de salud pública asociado a diversas enfermedades, por lo que es sustancial reconocer los agentes que pueden causar daño potencial a nivel genético en el ser humano. Sin embargo, hacer el estudio directamente con personas puede no ser viable, debido a la falta de tiempo y de recursos para llevarlos a cabo. Por lo tanto, en este trabajo se utilizaron otras especies que pueden ser empleadas como modelo para ayudar a estimar el daño de los posibles agentes genotóxicos.

Se reconoce que prácticamente todas las áreas metropolitanas son afectadas por la contaminación atmosférica, especialmente aquellas situadas en valles rodeados por montañas, como es el caso de la Ciudad de México (Pepper *et al.*, 2006). En el presente estudio se utilizaron dos especies de plantas silvestres: *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus*, que fueron expuestas durante las temporadas de lluvias y de secas en 4 sitios de la zona metropolitana del Valle de México (ZMVM), y se emplearon diversas metodologías para correlacionar el daño genético con la presencia de contaminantes atmosféricos.

Robinsonecio gerberifolius [(Sch. Bip. ex Hemsl.) Barkley y Janovec] es una especie de planta herbácea, perenne, de 15-25 cm de alto densamente lanosa en la base, la raíz es gruesa, las hojas basales están dispuestas en roseta, los peciolos son alados y densamente sedoso-tomentosos, las hojas son glabras a tomentulosas en el haz hasta densamente sedosas-tomentosas en el envés, la inflorescencia es de color amarillo. Es una especie que se puede encontrar en la región de

Texcoco y Amecameca (Sierra Nevada), a una altura de 3800-4000 msnm, en ambientes de praderas alpinas (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

Senecio roseus (Sch. Bip.) es una planta herbácea perenne, de 10 hasta 50 cm de alto, presenta un color púrpura-rojizo, con la raíz fibrosa, hojas basales en roseta con peciolo de 2-6 cm de largo. Hojas con los márgenes dentados, glabras o tomentulosas principalmente en el haz, el envés lanoso-tomentoso. Inflorescencia de color púrpura o morada, a veces de color crema. Se le puede encontrar de Texcoco a Amecameca (Sierra Nevada), en el Nevado de Colima, Nevado de Toluca, La Malinche, Pico de Orizaba, Cofre de Perote y montañas de Oaxaca, a una altura de 3000-4000 msnm en bosques de *Pinus hartwegii* con pastizal y en las praderas alpinas y subalpinas (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

HIPÓTESIS

Los metales pesados presentes en la atmósfera causan efecto tóxico, al exponer plantas silvestres en diversas zonas del Valle de México con fuentes de contaminación diferentes y en distintas temporadas meteorológicas, estas presentarán daño genético y respuesta fisiológica diferencial, así como modificación en la expresión del gen del miR398 que está relacionado con el estrés oxidante en las células.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto del estrés oxidante provocado por los metales pesados presentes en la atmósfera contaminada del Valle de México a través de la respuesta de dos plantas silvestres: *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus*.

Particulares

Analizar el daño genotóxico en plantas de *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus* expuestas a contaminación atmosférica en diferentes zonas del Valle de México.

En las mismas plantas, analizar el cambio en la expresión del gen miR398 que está relacionado con la respuesta al estrés oxidante.

Determinar la respuesta fisiológica al estrés, utilizando los pigmentos vegetales como marcadores en las plantas expuestas.

Cuantificar la cantidad de EROs producidas por las plantas ante la exposición a la contaminación atmosférica.

Identificar los metales pesados acumulados en las plantas expuestas.

MATERIAL Y MÉTODO

Colectas y sitios de exposición

Se utilizaron dos especies de plantas silvestres, *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus* (Apéndice I), que habitan en el Área Metropolitana del Valle de México. Seis individuos de cada especie fueron expuestos a 4 distintos sitios del área metropolitana del Valle de México: la estación de altura Altzomoni, que se considera como sitio rural; Ecatepec, Tlalnepantla (sitios industriales y urbanos) y en el Centro de Ciencias de la Atmósfera (sitio urbano); a dichos individuos se les mantuvo en estructuras protectoras las cuales les permitían tener agua constante y las cubría del exceso de rayos solares. Además de mantener a otras plantas en condiciones de laboratorio sin contacto con contaminantes ambientales (testigo) (Apéndice II).

Se hicieron mediciones en las semanas 0, 2 y 8. En cada una de las colectas se tomaron dos individuos y en cada caso se utilizaron las hojas para hacer los análisis. Las exposiciones se realizaron tanto en la temporada de lluvias de los años 2017 y 2018 (agosto-noviembre) como en temporada de secas de los años 2018 y 2019 (enero-abril).

Ensayo cometa

Para el caso del ensayo cometa se utilizaron una o dos hojas de cada uno de los individuos. Se lavaron con agua destilada y se mantuvieron en PBS a 4 °C hasta el momento del aislamiento de núcleos.

Para el aislamiento de núcleos, en cajas de Petri inclinadas colocadas en hielo se realizaron cortes horizontales en las hojas de la parte de la nervadura central. Los trozos de hoja se dejaron en 350 µL de PBS durante aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, se mezclaron 50 µL de este precipitado de núcleos con 50 µL de agarosa de punto de fusión bajo al 1%. A continuación, 80 µL de la mezcla de núcleos y agarosa se colocaron en portaobjetos a los que se les colocó previamente una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1%. Al solidificarse esta segunda

capa la cual contiene los núcleos, se agregó una tercera capa de agarosa de punto de fusión bajo al 0.5%.

Una vez que se solidifica la tercera capa de agarosa, se colocaron de manera horizontal en una solución de lisis a un pH de 10 (NaCl, EDTA, Tris, NaOH, DMSO, Tritón X-100) y a 4 °C durante una hora para romper la envoltura nuclear y eliminar proteínas.

Después de la lisis se acomodaron en una cámara de electroforesis horizontal con una solución amortiguadora (NaOH, EDTA 200 mM y agua desionizada) a un pH \geq 13, durante 15 minutos para que se desenrollara el material genético y después se procedió al inicio de un programa de corrimiento electroforético durante 20 minutos a 25 V y 300 mA.

Cuando terminó la electroforesis se procedió a hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con una solución de Tris a un pH de 7.5, para eliminar restos de la solución amortiguadora. Finalmente, las preparaciones se fijaron con etanol al 100% durante 15 minutos. Para su análisis, las preparaciones fueron teñidas con bromuro de etidio y observadas con el objetivo de 20X en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Carl Zeiss) con filtro de excitación de 515.560 nm y filtro de barrera de 590 nm.

Se examinaron los núcleos de cada laminilla con el analizador de imágenes Comet Assay IV (Perceptive Instruments) y se utilizó el parámetro de momento de la cauda (longitud de la cauda \times intensidad) para determinar el daño en el DNA de cada célula.

Ensayo de reducción de MTT

Se lavaron las hojas de los individuos de cada sitio de exposición. Posteriormente, se tomó 1 cm² de hoja de cada uno y se maceró con 300 μ L de solución salina PBS. Luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Después se les agregaron 20 μ L de solución de MTT (5 mg/ μ L de MTT en solución salina de PBS) a 100 μ L del sobrenadante y se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C en una placa de 96 pozos. Para cada prueba se incluye un blanco que contiene una solución salina y otra de reactivo

de MTT sin muestra. Luego el medio se elimina cuidadosamente y son añadidos 50 μL del disolvente de MTT a cada pozo para disolver los cristales de formazán que se originaron durante la incubación. Se cuantificó la intensidad de color a través de la absorbancia (590 nm-690 nm).

Cuantificación de carotenoides

Se utilizaron trozos de hoja de 0.5 cm^2 y se procedió a la extracción de carotenoides con 3 mL de acetona pura durante 24 horas a temperatura ambiente. Se determinó utilizar dicho procedimiento de acuerdo con la curva de carotenoides obtenida. Se llevó a cabo la lectura por triplicado a una longitud de onda de 450 nm para carotenoides tipo α y a 508 nm para carotenoides tipo β . Se realizó el promedio de las tres lecturas y se obtuvo la concentración de pigmentos con la siguiente fórmula:

$$[\text{carotenoides}]\mu\text{g.mL}^{-1} = \text{D.O.}/\text{peso en mg}$$

Expresión de miR398

A) Extracción de RNA

Las hojas utilizadas fueron lavadas con agua destilada y congeladas hasta el procedimiento. Para la extracción primero se cortó un trozo de hoja de cada sitio de exposición de aproximadamente 1 cm^2 , se maceró en un microvial con 500 μL de Trizol y se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación se agregaron 100 μL de cloroformo y se dejaron durante 5 minutos. Posteriormente, los microviales fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un microvial nuevo y luego se le agregaron 250 μL de isopropanol. Se dejó que el RNA se precipitara durante toda la noche a -20 °C.

Una vez transcurridas las 24 horas, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos. Después se decantó el isopropanol, se agregaron 200 μL de etanol al 70% al botón de RNA y se volvió a centrifugar a 5,000 rpm durante 5 minutos. El etanol se decantó y el RNA se dejó secar al aire

libre de 5-10 minutos. Finalmente, se resuspendió en 50 μL de agua destilada libre de RNasas y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B) Cuantificación de RNA

Se obtuvo la concentración y pureza de RNA de cada una de las muestras en un espectrofotómetro de UV para microvolúmenes Nanodrop-1000 (NanoDrop Lite Printer, Thermo Scientific). Se realizaron dos mediciones, de 2 μL por muestra a una longitud de onda de 260 nm y se determinó el promedio de la concentración de RNA presente. A partir de las cantidades obtenidas, se prepararon *stocks* para posteriormente realizar la síntesis de cDNA.

C) Formación de los stocks de RNA

Se formaron *stocks* por triplicado a un volumen final de 10 μL cada uno y con una concentración de 200 ng.

D) Síntesis de cDNA

Para cada muestra se realizó una mezcla de los siguientes reactivos con una concentración final de 20 ng/ μL :

Tabla 1. Mezcla de reactivos para la síntesis de cDNA.

Reactivo (Concentración)	Volumen por muestra (μL)
Amortiguador 5x	0.75
DNTPs (10nM)	0.18
Oligo Reverse miR398 (10 μM)	1
Enzima RT	0.5
Agua libre de RNasas	3.07
RNA (ng/ μL)	2
Total	7.5

Se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador:

Fase 1: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 minutos

Fase 2: 70 °C 15 minutos

Fase 3: 22 °C 2 minutos

Posteriormente, se almacenaron a una temperatura de -20 °C hasta su empleo.

E) PCR tiempo real (qPCR)

Primero las muestras fueron tratadas con DNasas con el “kit” de Thermo Scientific.

Para cada muestra se realizó una mezcla de los siguientes reactivos con un volumen final de 10 μ L.

Tabla 2. Mezcla de reactivos para el tratamiento de DNasas.

Reactivo (Concentración)	Volumen por muestra (μL)
Amortiguador 10x	1
DNasa	1

La mezcla anterior se dejó incubar a 37 °C por 30 minutos. Para desactivar a las DNasas se les agregó 1 μ L de EDTA a 25 mM y se dejó una vez más en incubación 10 minutos a 65 °C. Finalmente se centrifugaron.

Posteriormente, se uniformizó la concentración de cada una de las muestras de RNA a 200 mg. Para realizar la reacción de qPCR se utilizaron los siguientes reactivos para cada una de las muestras:

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la qPCR con el gen miR398.

Reactivo (Concentración)	Volumen por muestra (μL)
ddH ₂ O	9
TB Green Advantage Premix (2X)	12.5
ROX Dye (50X)	0.5
F Primer de miR398 (10 mM)	0.5
mRQ 3'Primer (10 mM)	0.5
cDNA	2
Total	25

De manera paralela se preparó una reacción para correr el gen constitutivo U6 con las muestras experimentales, el cual funcionó como testigo interno para todo el procedimiento. Los reactivos que se utilizaron para realizar la amplificación del U6 fueron:

Tabla 4. Mezcla de reactivos para la qPCR con el gen U6.

Reactivo (Concentración)	Volumen por muestra (µL)
ddH ₂ O	9
TB Green Advantage Premix (2X)	12.5
ROX Dye (50X)	0.5
U6 F primer (10mM)	0.5
U6 R primer (10mM)	0.5
cDNA	2
Total	25

Para ambas reacciones se colocaron duplicados en el termociclador. Se acomodaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Etapa de desnaturalización: a 95 °C 10 segundos.

Ciclo de amplificación qPCR:

- 1) 95 °C 5 segundos,
- 2) 60 °C 20 segundos. Repetición durante 40 ciclos.

Curva de disociación:

- 1) 95 °C 60 segundos,
- 2) 55 °C 30 segundos,
- 3) 95 °C 30 segundos.

Los productos finales son almacenados a -20 °C.

Las secuencias de los iniciadores se diseñaron con base al miR398 de *Arabidopsis thaliana* y fueron las siguientes (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018b):

miR398-F: GGCGTGTGTTCTGAGGTCA

miR398-RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATAC
GACAAGGGG

Se utilizó el iniciador “reverse” contenido en el “kit”, del cual no viene descrita la secuencia.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el *software* Agilent Aria 1.7, el cual muestra el valor del ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés) que indica el ciclo en que cada muestra comenzó a amplificar. Después, el valor Ct de cada muestra fue estandarizada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, mediante el cual se hizo una comparación entre los valores obtenidos de la reacción del gen U6 y los valores de las muestras experimentales y así determinar el valor promedio de cada muestra. Estos valores calculados fueron los utilizados para realizar el análisis estadístico.

Análisis químico de la acumulación de metales pesados

Para este análisis las hojas se lavaron con agua destilada, se colocaron en toallas de papel y se mantuvieron en un horno a una temperatura de entre 50-60 °C durante 7 días para deshidratarlas por completo. Posteriormente, se procedió a macerar las muestras con un mortero. Se tomaron 0.2 g, se les agregaron 5 mL de HNO₃ ultrapuro y se les dejó en predigestión toda la noche dentro de una campana de extracción y posteriormente para la digestión se utilizó un digestor UltraWAVE marca Milestone. Al terminar este proceso, las muestras se enfriaron y se aforaron a 50 mL con ácido nítrico al 2%, se filtraron, etiquetaron y almacenaron hasta su análisis. Para la detección se usó el método de Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés), modelo iCAP Qc de la marca Thermo Scientific, en el Laboratorio ICP-MS del Instituto de Geofísica de la UNAM.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks con el software Statistica versión 13.5.0.17 y la homogeneidad de varianzas con la prueba de F. Debido a que los datos no cumplían con las características de normalidad y homogeneidad de varianza se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la finalidad de conocer si existen diferencias significativas entre las muestras. Por ello, se utilizaron las gráficas de cajas y bigotes para mostrar los resultados y se indica a la mediana como medida de tendencia central. Las diferencias se probaron para cada una de las variables y además se realizaron combinaciones entre éstas para conocer si las

interacciones tienen algún efecto en las variables cuantificadas. Las interacciones que se tomaron en cuenta fueron: Especie/Semana/Lugar en la cual se incluyen los datos de las dos temporadas, y Temporada/Semana/Lugar en la cual se incluyen los datos de las dos especies.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman para conocer si alguna de las variables estaba influyendo en la respuesta de otra. De igual manera, también se incluyeron en el análisis los valores de cuantificación de los metales pesados.

RESULTADOS

Ensayo cometa

Se tomó en cuenta como medida del daño, el valor de “momento de la cauda”, el cual se basa en los valores de longitud e intensidad de la misma para determinar el daño en cada célula. De manera general, se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) en todas las condiciones estudiadas.

Lo primero que se observó fueron diferencias entre las dos especies (Fig. 1, Tabla 8), que en el caso de *Robinsonecio* se pueden notar valores más altos de daño al DNA que en *Senecio*. El tiempo de exposición también influyó en la cantidad de daño que se presentó en las plantas, puesto que se observa que en ambas especies hay daño ligeramente mayor a las 2 semanas de exposición en comparación a las 8 semanas, excepto en *Robinsonecio* en Ecatepec y Tlalnepantla (Fig. 1).

También se pueden evidenciar las diferencias entre los sitios de exposición y los testigos, en donde en estos últimos la mayoría de los valores se ubicaron por debajo de 10. De manera general, se observa que los sitios donde se presentó mayor daño fueron CCA y Ecatepec, seguidos de Altzomoni. En Tlalnepantla se obtuvieron los valores más bajos de daño (Fig. 1).

También se observaron diferencias significativas, al comparar los resultados obtenidos de las dos temporadas (Tabla 8, Fig. 2). En ambas, la mayoría de sus valores no difirieron mucho entre sí, pero se advierte que en la temporada de lluvias, a las 2 semanas de exposición hubo mayor daño que en la época de secas. Por otra parte, en lluvias el daño disminuyó a las 8 semanas, pero en secas aumentó (Fig. 2).

Es de notar que los datos tanto en los testigos como en los individuos expuestos en la estación Tlalnepantla, se observó menor daño al DNA, excepto en secas a las 8 semanas, donde el mayor daño se notó en esta estación. Mientras que, para los otros casos, CCA fue donde se advirtió mayor daño (Fig. 2).

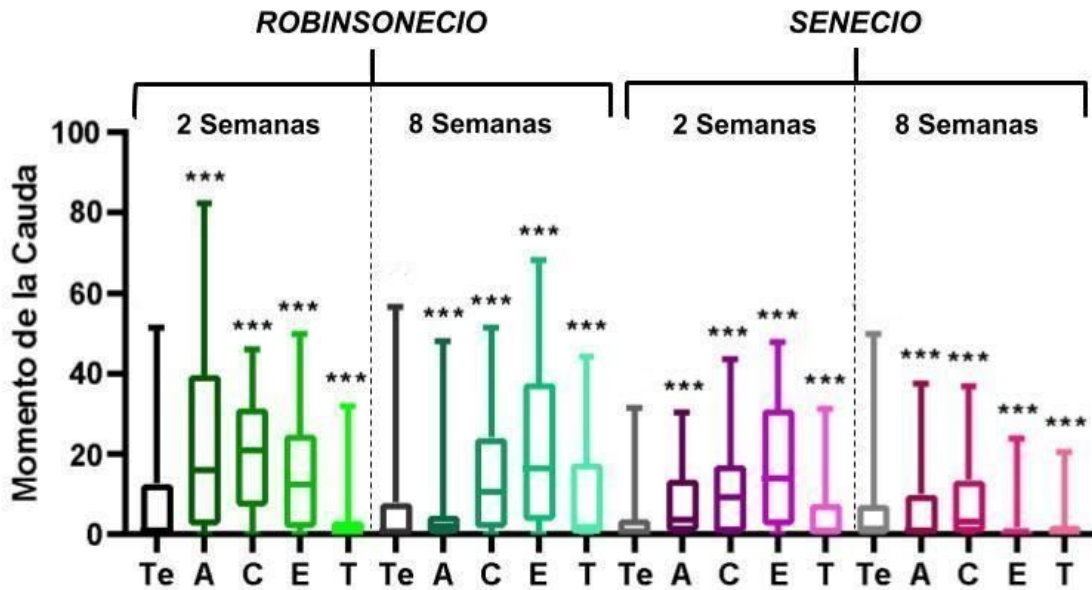


Figura 1. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del ensayo cometa en la relación Especie-Semana-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

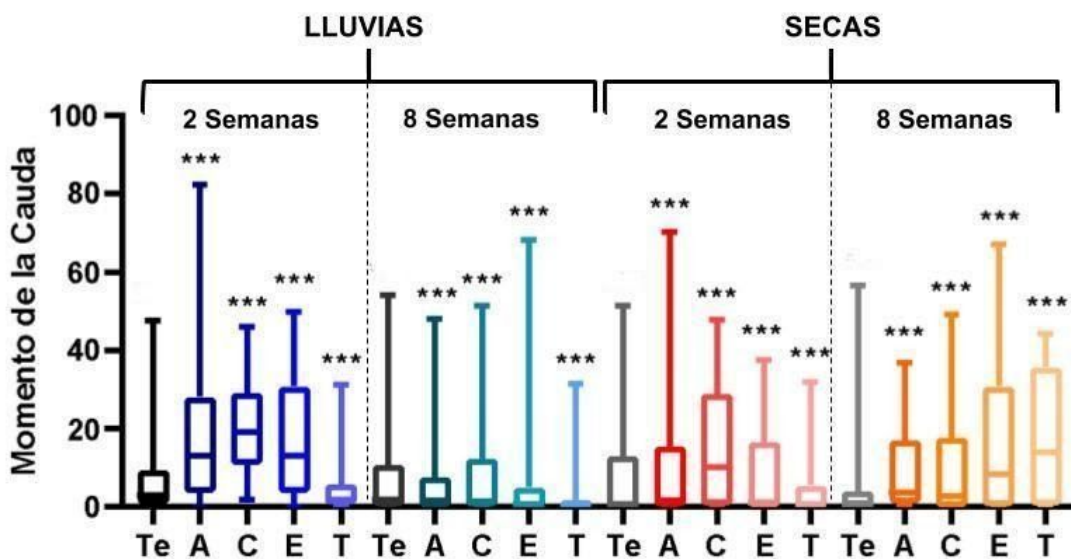


Figura 2. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del ensayo cometa en la relación Temporada-Semana-Lugar, Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

Ensayo de MTT para la detección de EROs

Para la reacción de MTT se utilizó como medida unitaria los valores obtenidos en los individuos testigo (100%) y a partir de estos datos se realizó una conversión de las muestras expuestas, en

proporción a los valores de los mismos. En este caso sólo algunas de las variables fueron significativas ($p < 0.0001$).

Se encontraron diferencias significativas en los valores de MTT entre especies, notando que en *Senecio* se produjo mayor cantidad de reducción de MTT que en *Robinsonecio*, y en cada estación de monitoreo (Fig. 3, Tabla 8). En la figura 3 se puede observar que los valores de MTT obtenidos de individuos que estuvieron en sitios de exposición mostraron mayor cantidad de reacción.

En *Robinsonecio* se ve que la cantidad de MTT aumentó ligeramente de la semana 2 a la semana 8 en cada estación excepto en Ecatepec, donde los valores se mantuvieron al mínimo pues no mostraron cambios con respecto al testigo (Fig. 3).

En *Senecio*, se evidencia que hay una disminución de la reacción de la semana 2 a la 8 en las estaciones de Alzomoni y CCA, por el contrario en Ecatepec y Tlalnepantla estos valores aumentan ligeramente en el mismo lapso (Fig. 3).

Entre temporadas para cada lugar no se observaron diferencias significativas en los valores de reducción de MTT para todos los casos, aunque se observa que la mayor cantidad de reacción se presenta en época de secas (Tabla 8). En lluvias la cantidad de reacción es mayor a las 2 semanas de exposición y luego disminuye ligeramente a las 8 semanas en todas las estaciones excepto en Ecatepec que ocurrió al contrario (Fig. 4). Por otra parte, en secas se observa que tanto para Alzomoni como para Tlalnepantla el valor de la reacción aumentó de la semana 2 a la 8, mientras que para las estaciones de CCA y Ecatepec estos valores se mantuvieron similares entre cada semana (Fig. 4).

Cuantificación de los niveles de carotenoides

Parte de la respuesta fisiológica que se estimó, fue cuantificar las concentraciones de los carotenoides tanto tipo α como tipo β . Para evaluarlos se utilizó la relación entre el peso de la

muestra, con el valor de la longitud de onda cuantificada para obtener la concentración de cada pigmento.

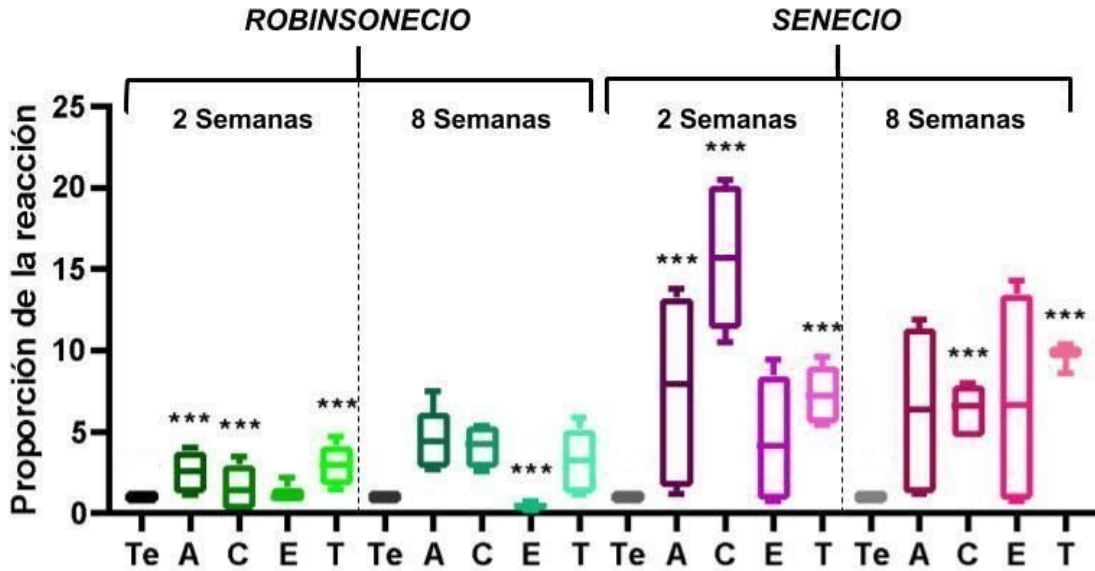


Figura 3. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del ensayo de detección de MTT la relación Especie-Estación-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

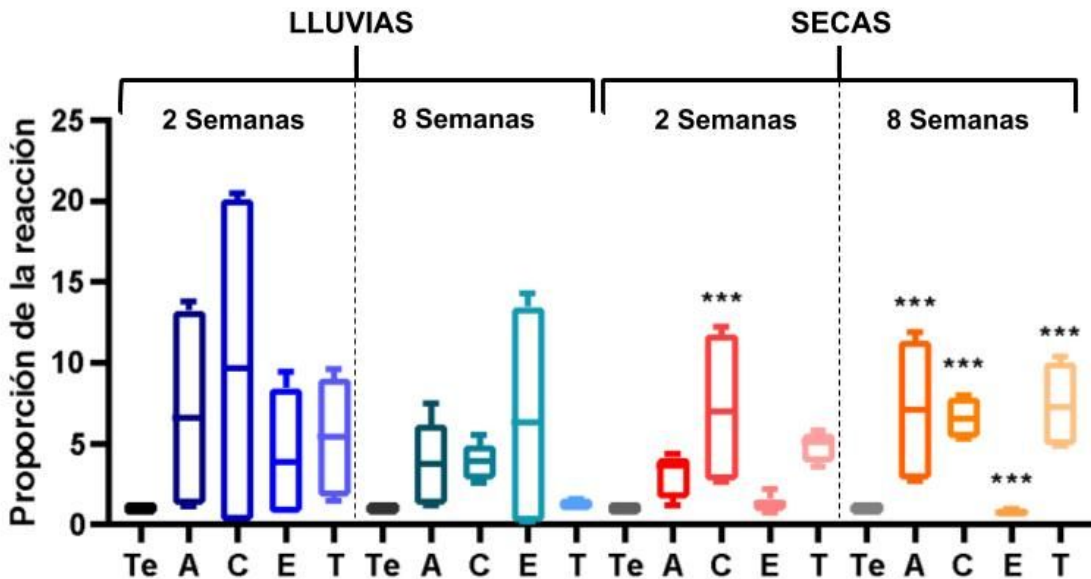


Figura 4. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del ensayo de detección de MTT en la relación Temporada-Semana-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

En ambos tipos se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.0001$), pero no en todos los grupos.

Concentraciones de carotenoides tipo

Las diferencias en las concentraciones obtenidas de los carotenoides tipo α , no fueron significativamente distintas entre las dos especies, aunque en los individuos del género *Senecio*, hubo una ligera concentración mayor de este pigmento (Tabla 8).

En *Robinsonecio*, en lluvias a las 2 semanas de exposición se ve, que prácticamente la cantidad de pigmento es igual entre el testigo y los sitios contaminados, excepto en CCA, cuyo valor fue muy elevado y estadísticamente significativo (Fig. 5). A las 8 semanas, la cantidad de pigmento aumentó en todos los sitios, excepto CCA; tanto con respecto al testigo como a los valores de la semana 2, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos.

Por otra parte, en *Senecio* se notó que en la semana 2 en Ecatepec y Tlalnepantla hay una disminución de carotenoides tipo α con respecto a su testigo, mientras que en Alzomoni este valor se mantuvo similar y en CCA aumentó (Fig. 5). En la semana 8 en Alzomoni y Tlalnepantla la cantidad de este pigmento disminuyó respecto a su testigo y a los datos de la semana 2. En CCA, el valor aumentó en comparación al testigo pero permaneció similar con respecto al de la semana 2. En cuanto a Ecatepec, a las 8 semanas de exposición se observó que mantuvo un valor similar al del testigo pero se elevó con relación al valor de la semana 2 (Fig. 5).

Por otra parte, al realizar la comparación de concentraciones de carotenoides tipo α entre temporadas se observaron diferencias significativas entre las mismas y la mayor concentración de este pigmento se presentó en secas (Tabla 8). Para cada lugar, también se observaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en algunos de los sitios (Fig. 6).

Durante la época de lluvias en la semana 2 se observa, que la cantidad de este pigmento, con respecto al testigo, aumentó en Alzomoni, permaneció similar en CCA y Tlalnepantla y disminuyó en Ecatepec cuyo valor fue el único significativo (Fig. 6). A las 8 semanas de exposición se notó que en Alzomoni descendió con respecto al valor de las 2 semanas, pero fue

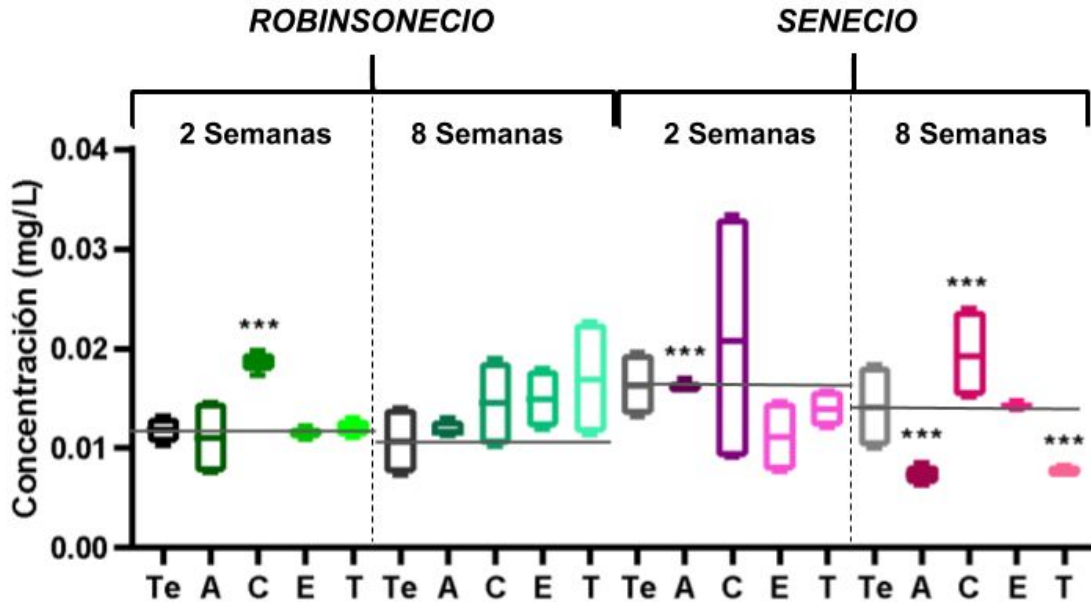


Figura 5. Diagrama de caja y bigotes que muestra la concentración de los carotenoides tipo α en la relación Especie-Semana-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

similar al testigo, aunque tuvo mayor variación en sus valores. En CCA, Ecatepec y Tlalnepantla el pigmento aumentó su concentración con respecto al testigo, pero cabe destacar que CCA y Tlalnepantla se mantuvieron similares con respecto a los valores de la semana 2, excepto en Ecatepec que sí aumentó a la semana 8.

Por otra parte, en la temporada de secas no se observaron diferencias entre la semana 2 y la semana 8. En ambos casos Altzomoni se mostró la concentración más baja y CCA la más elevada (Fig. 6).

Concentraciones de carotenoides tipo

Las concentraciones de los carotenoides tipo β fueron diferentes significativamente ($p < 0.001$) entre ambas especies, donde los individuos del género *Senecio* mostraron los valores más altos (Tabla 8) y entre los sitios de exposición, se encontraron algunos con diferencias significativas ($p < 0.001$) (Fig. 7). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre las semanas 2 y 8 (Tabla 8), más que de manera puntual en algunos lugares (Fig. 7).

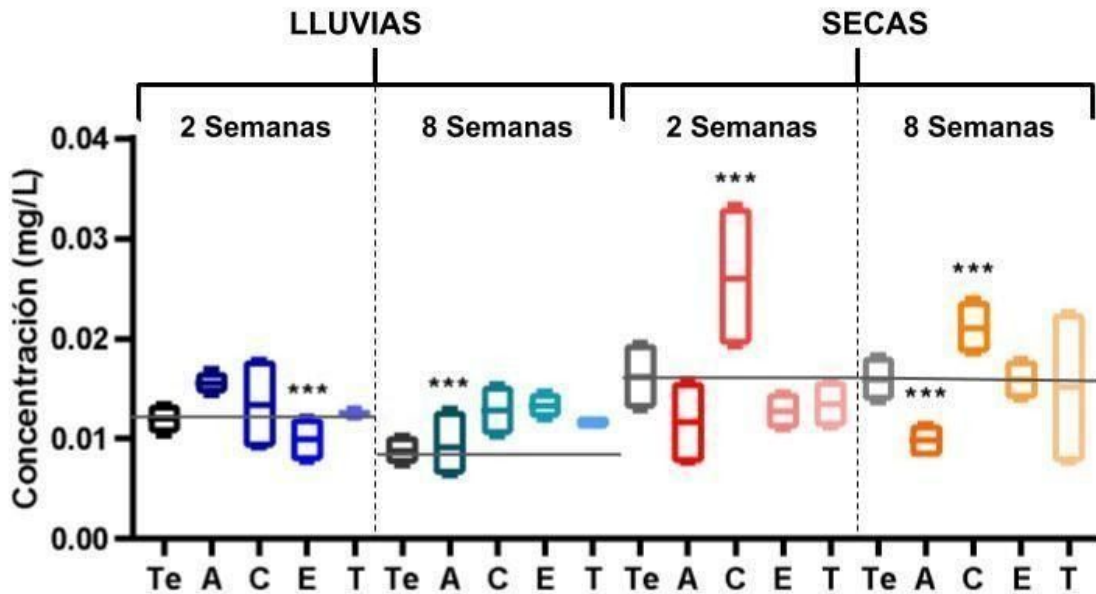


Figura 6. Diagrama de caja y bigotes que muestra la concentración de los carotenoides tipo α en la relación Temporada-Semana-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

En *Robinsonecio* en la semana 2, se observó que la cantidad de pigmento aumentó en comparación al valor del testigo y excepto en Tlalnepantla donde disminuyó; por el contrario, se detecta, que en la semana 8 el pigmento incrementó en todos los sitios con respecto al testigo y es en Tlalnepantla donde se encontró el valor más elevado, sin embargo, como se observa en la figura 7 sólo en Tlalnepantla los datos fueron significativos. Por otra parte, en *Senecio*, en ambas semanas se observó disminución del pigmento en todos los sitios con respecto a los Testigos, aunque sólo en Ecatepec en la semana 8 fue significativo. Pero en la semana 8, la concentración de carotenoides tipo β aumentó ligeramente con respecto a la semana 2, excepto en Tlalnepantla donde disminuyó.

Por otra parte, las diferencias de concentraciones entre temporadas para cada sitio, no fueron en todos los casos significativas ($p < 0.05$). De manera general se observó que la cantidad de pigmento tendió a disminuir con respecto a los testigos (Fig. 8). En lluvias a las 2 semanas de exposición, tanto Altzomoni como CCA permanecieron con concentraciones muy similares a la del testigo, mientras que en Ecatepec y Tlalnepantla disminuyó. A las 8 semanas, en Altzomoni y Tlalnepantla se mantuvo la concentración, pero en CCA decreció, mientras que en Ecatepec aumentó. En esta temporada, únicamente en Ecatepec a las 2 semanas los datos fueron

significativos. Durante la temporada de secas, en la semana 2 se observó que se redujo la concentración de carotenoides β en todos los sitios de exposición con respecto al testigo. Pero en la semana 8, en Altzomoni y Ecatepec descendió, en CCA permaneció igual y en Tlalnepantla se elevó y fue esta última la única significativa.

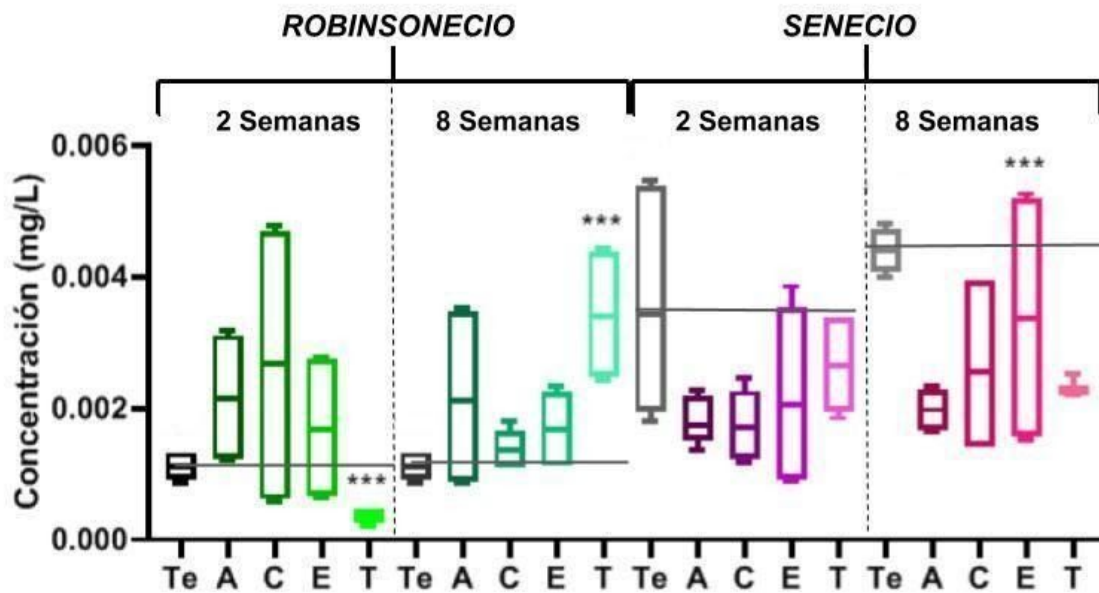


Figura 7. Diagrama de caja y bigotes que muestra la concentración de los carotenoides tipo β en la relación Especie-Semana-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

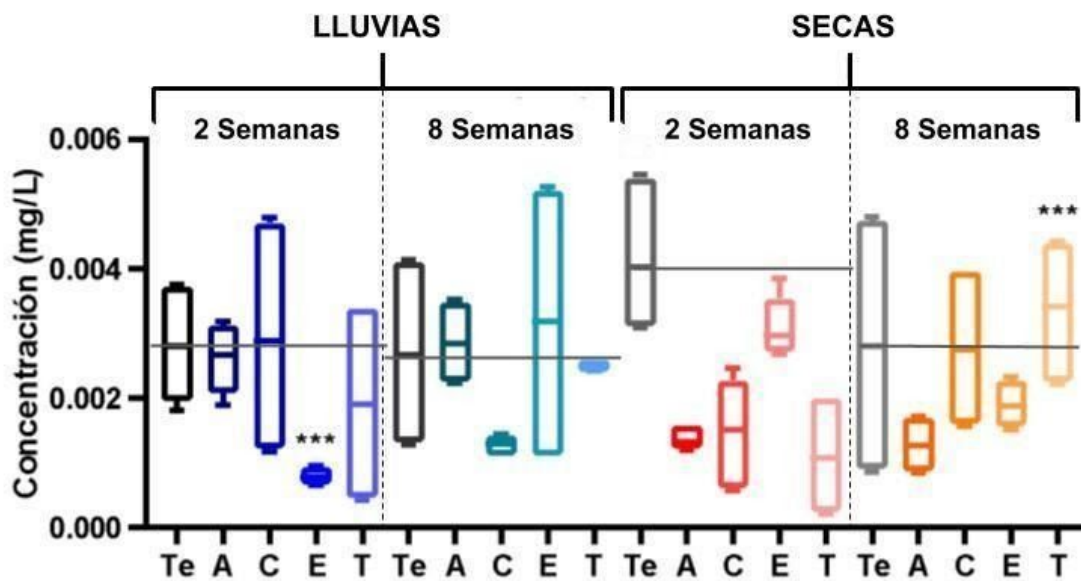


Figura 8. Diagrama de caja y bigotes que muestra la concentración de los carotenoides tipo β en la relación Temporada-Semana-Lugar. Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla. Significancia: *** $p < 0.0001$.

Expresión del miR398

Se cuantificó la expresión del miR398 para determinar tanto su presencia, así como su respuesta ante el efecto del estrés, en ambas especies. Se observaron diferencias significativas en la expresión, entre especies (Tabla 8). En *Senecio*, se presentaron los valores más altos de expresión (Fig. 9, Tabla 8). En *Robinsonecio*, los individuos expuestos en las estaciones de CCA y Ecatepec, aumentó la expresión del miR398 con respecto al testigo, mientras que los niveles de expresión en las estaciones de Altzomoni y Tlalnepantla disminuyó. En *Senecio*, la mayor expresión se observó en los individuos expuestos en la estación de Tlalnepantla y en las estaciones de CCA y Ecatepec, también aumentó su expresión, mientras en las plantas expuestas, en la estación de Altzomoni descendió.

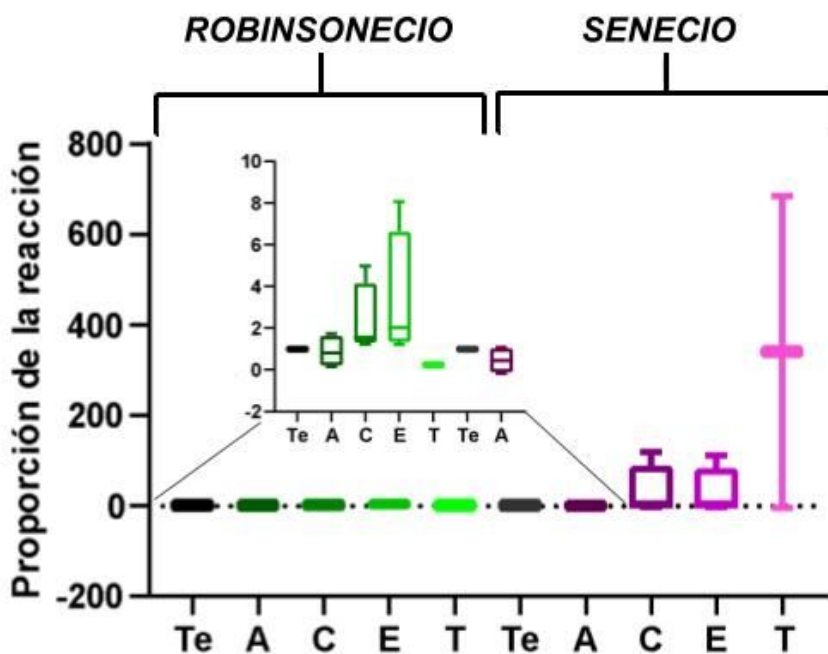


Figura 9. Diagrama de caja y bigotes que muestra la expresión del miR398 en la relación Especie-Lugar, Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla.

Por el contrario, entre las temporadas no se encontraron diferencias significativas (Tabla 8). Para cada sitio de exposición por temporada, tampoco hubo diferencias, pero se observó un aumento importante de la expresión y éste se dio durante la época de secas. En la estación Ecatepec durante la época de lluvias, la expresión del miR398 aumentó casi el triple con respecto a los niveles de expresión observados en el testigo. En las estaciones Altzomoni y CCA, disminuyó ligeramente. No se obtuvieron datos de las plantas que fueron expuestas en las estaciones de

Tlalnepantla en la época de Lluvias. Para la época de Secas, la expresión disminuyó casi la mitad en los individuos expuestos en las estaciones de Altzomoni. Las concentraciones observadas en las plantas crecidas en las estaciones de CCA, Ecatepec y Tlalnepantla, aumentaron abruptamente (Fig. 10).

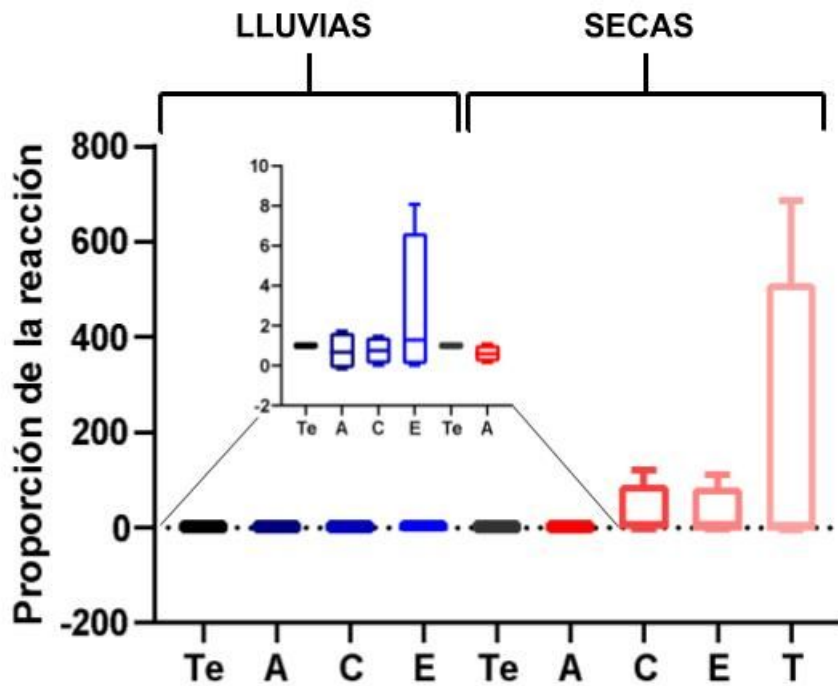


Figura 10. Diagrama de caja y bigotes que muestra la expresión del miR398 en la relación Temporada-Lugar, Te: Testigo, A: Altzomoni, C: CCA, E: Ecatepec, T: Tlalnepantla.

Metales pesados

Se realizó la cuantificación de los metales pesados atmosféricos, presentes en las hojas de las plantas expuestas en la semana cero (antes de la exposición) y en la semana 8 de exposición. Se ordenaron los metales pesados en función de su importancia biológica. Tóxicos: Aluminio, Vanadio, Cadmio y Plomo; esenciales: Hierro y Zinc; micronutrientes: Manganeso; y elementos traza: Cobalto, Níquel y Cromo.

En *Robinsoncio*, de manera general, todos los metales pesados aumentaron su concentración en los sitios de exposición con respecto al testigo (Tabla 5). Se observa que los elementos tóxicos incrementaron su concentración durante la época de lluvias, salvo algunas excepciones como Pb en CCA y Ecatepec cuyas concentraciones fueron mayores en secas. Por otra parte, también se observó que los sitios con la cantidad más elevada de metales tóxicos fueron Tlalnepantla y Ecatepec en lluvias.

En cuanto a los metales esenciales, también se observó un aumento en los sitios contaminados. En el caso del Fe las concentraciones más elevadas se dieron durante las lluvias en Alzomoni, Ecatepec y Tlalnepantla. Al contrario, el Zn tuvo un mayor aumento durante secas en CCA y Tlalnepantla. Es de notar, que en este caso las concentraciones observadas durante las lluvias fueron de hecho, menores al testigo para la mayoría de los casos.

El único micronutriente que se registró fue Mn, que de manera general se observó una tendencia a aumentar en los sitios de exposición, sin embargo, en algunos casos esta elevación es muy ligera. También se observa que las mayores concentraciones se dieron en lluvias mientras que los valores obtenidos de la temporada de secas fueron similares al testigo.

Los elementos traza también aumentaron en las plantas expuestas. En general las mayores concentraciones se dieron en la época de lluvias, excepto el Cr en CCA y Ecatepec, pues en estos casos las cantidades más elevadas fueron las de la temporada de secas. Por otra parte, se observó que en los tres casos (Ni, Co y Cr) las mayores concentraciones se presentaron en Alzomoni.

En el caso de *Senecio*, se observó que los metales pesados tuvieron una tendencia a disminuir en los sitios de exposición con relación al testigo (Tabla 6).

De los elementos tóxicos, sólo se observaron elevaciones en las concentraciones de algunos de ellos: Al y V en Alzomoni, y Cd ligeramente en Ecatepec lluvias. También se notó que cada elemento tuvo variaciones distintas en diferentes condiciones ambientales y del lugar donde se mantuvo expuesta a la planta.

En cuanto a los elementos esenciales, se observó que el Fe también disminuyó su concentración en los sitios contaminados excepto en Alzomoni lluvias, mientras que en CCA las concentraciones de ambas temporadas fueron similares entre sí, pero en Ecatepec aumentó en secas. En cuanto al Zn, también decreció excepto en CCA secas.

De los micronutrientes, se observó que el Mn, al igual que en el caso del Zn, descendió excepto en CCA secas.

Tabla 5. Concentración de los metales absorbidos en plantas de *Robinsecio* expuestas durante ocho semanas en diferentes puntos de la zona metropolitana del Valle de México (unidades de concentración en mg Kg⁻¹).

Metales	Testigo	Altzomoni		CCA		Ecatepec		Tlalnepantla	
		Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
Aluminio	261.317	333.68	431.39	514.304	409.35	988.78	442.14	1487.35	454.85
Vanadio	0.43	1.303	1.456	1.503	1.367	3.199	1.525	5.111	1.513
Cadmio	0.158	0.221	0.039	0.149	0.203	0.394	0.133	0.364	0.106
Plomo	0.35	0.415	0.349	0.413	4.612	1.216	3.011	3.259	1.81
Hierro	212.883	902.46	209.34	373.91	284.31	827.98	232.67	1297.38	462.25
Zinc	55.214	21.652	81.323	34.464	166.31	37.79	77.442	59.119	144.56
Manganeso	25.814	66.421	22.777	84.162	27.148	75.518	29.197	78.123	31.254
Níquel	3.762	89.588	4.491	5.826	3.361	6.653	3.311	7.342	3.749
Cobalto	0.282	2.28	0.276	0.451	0.33	0.592	0.314	0.75	0.334
Cromo	1.497	188.95	2.665	0.791	14.138	3.005	3.399	13.125	3.368

Los elementos traza de manera similar tienden a disminuir excepto en algunos casos: Ni en CCA secas, Co en Altzomoni lluvias y CCA secas, y Cr en Altzomoni lluvias. En estos elementos se observó que las mayores concentraciones se dieron durante secas en CCA y Ecatepec.

Correlación entre las variables de estudio

Por último, se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman entre las variables fisiológicas y las concentraciones de metales pesados. En este caso, no se encontraron correlaciones significativas ($p < 0.05$) con ninguna de las variables biológicas ni con los metales pesados cuantificados, a excepción de la que se mostró entre las concentraciones de los carotenoides tipo α y las concentraciones de Zinc (Tabla 7).

Tabla 6. Concentración de los metales absorbidos en plantas de *Senecio* expuestas durante ocho semanas en diferentes puntos de la zona metropolitana del Valle de México (unidades de concentración en mg Kg⁻¹).

Metales	Testigo	Altzomoni		CCA		Ecatepec		Tlalnepantla	
		Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
Aluminio	1913.584	2620.88	-	494.585	403.128	1595.702	1194.387	-	-
Vanadio	4.347	6.114	-	1.213	1.294	3.961	2.822	-	-
Cadmio	0.606	0.308	-	0.248	0.374	0.666	0.308	-	-
Plomo	15.343	1.158	-	2.7	1.065	1.195	5.845	-	-
Hierro	1465.416	1643.319	-	331.171	349.487	953.226	741.704	-	-
Zinc	93.135	48.339	-	25.517	130.717	90.353	46.644	-	-
Manganeso	167.662	137.024	-	37.256	1208.958	84.689	65.366	-	-
Níquel	7.164	5.232	-	3.181	9.542	3.601	6.11	-	-
Cobalto	1.199	1.285	-	0.305	1.548	0.797	0.54	-	-
Cromo	2.245	5.474	-	1.053	1.349	2.397	3.191	-	-

Sin embargo, es de destacar que algunos valores fueron más elevados como son la correlación entre cometa-miR398, la de cometa-Zinc y la de carotenoides tipo α -Plomo. Por otra parte, se observó que hubo muchas correlaciones aparentemente negativas entre las variables biológicas y las concentraciones de los metales, aunque estos datos no llegaron a ser significativos.

Tabla 7. Valores del análisis de correlación de Spearman entre las variables biológicas y las concentraciones de metales pesados cuantificados. Significancia *p<0.05.

	Cometa	MTT	Carotenoides α	Carotenoides β	Expresión miR398
Cometa	1	-0.176836	0.215686	-0.085655	0.441116
MTT	-0.176836	1	-0.021717	0.259566	0.067288
Carotenoides α	0.215686	-0.021717	1	0.360165	0.075413
Carotenoides β	-0.085655	0.259566	0.360165	1	-0.238636
Expresión miR398	0.441116	0.067288	0.075413	-0.238636	1
Aluminio	-0.116857	-0.318135	-0.054809	-0.218201	-0.348861
Vanadio	0.054809	-0.372021	-0.052741	-0.12513	-0.289855
Cadmio	-0.098293	-0.145153	0.162442	0.020693	-0.036251
Plomo	0.141676	-0.372021	0.404344	-0.180972	0.02795
Hierro	-0.01758	-0.164767	-0.019648	0.050672	-0.239131
Zinc	0.396071	0.011399	0.482938*	0.110652	-0.036232
Manganeso	0.10031	-0.063212	0.102379	0.038263	-0.066253
Níquel	0.249225	-0.220725	-0.003102	-0.063082	0.150104
Cobalto	0.185109	-0.007254	0.135471	0.154085	0.026915
Cromo	0.362979	-0.195855	0.145812	-0.009307	-0.05383

Tabla 8. Resumen de cada una de las variables con su nivel de significancia, cada valor corresponde a la mediana de cada prueba en cada una de las variables.

	Grupo	Cometa	MTT	Carotenoides α	Carotenoides β	QPCR
Especie	<i>Robinsoncio</i>	4.3346***	1.4212***	0.0123	0.0015**	1.2381*
	<i>Senecio</i>	1.6352***	5.5484***	0.0144	0.0022**	0.5996*
Semana	Semana 2	4.7277***	2.1630	0.0132	0.002	1
	Semana 8	1.7814***	2.8925	0.0127	0.0022	1.007
Temporada	Lluvias	3.2458***	1.5914	0.0122***	0.0022	1
	Secas	2.0335***	3.0348	0.0151***	0.0021	1
	Testigo	0.3134***	1***	0.0132	0.0034	1
Lugar	Altzomoni	3.3069***	3.6652***	0.0116**	0.0018	0.6004
	CCA	10.2605***	5.3391***	0.0182**	0.0015	1.3619
	Ecatepec	6.9208***	0.8709***	0.0130	0.0019	1.466
	Tlalnepantla	0.8856***	4.9043***	0.0131	0.0023	0.2531

Significancia *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001.

Nota: en el caso particular de los datos de la expresión de miR398 no se tomaron en cuenta en el análisis los datos de semana dos, sino de semana cero, por lo que los datos que se colocan en estos casos son de ese tiempo.

DISCUSIÓN

Se utilizaron dos especies de plantas silvestres como biomonitores del estrés causado por la contaminación atmosférica del Valle de México. Se estudió su respuesta ante diferentes tipos de contaminación con diversos marcadores y de manera general se observó que tanto *Robinsonecio* como *Senecio* respondieron de manera particular a los sitios contaminados.

Daño al DNA

El ensayo cometa mostró el daño al DNA que tuvo cada especie en los diferentes sitios de exposición, es decir, la susceptibilidad que presentó cada una a la contaminación de las diferentes estaciones. En este caso, ambas plantas presentaron una mayor susceptibilidad a la contaminación de los sitios de exposición que el testigo, lo cual se vio reflejado en valores de momentos de la cauda más grandes. *Robinsonecio* mostró más sensibilidad ante el estrés, ya que presentó niveles de daño más elevados que *Senecio*. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta las diferencias de cada especie para determinar de manera más específica en qué grado le afectaron las condiciones estresantes, puesto que se ha descrito que células de distintos organismos e incluso de diversos órganos del mismo individuo pueden variar en la longitud de la cauda y por lo tanto en la susceptibilidad que pueda tener a un factor estresante (Collins *et al.*, 2008).

Las condiciones ambientales a las que se expusieron las plantas influyeron en la cantidad de daño que presentaron. Durante la temporada de lluvias, ambas especies tuvieron mayor daño (Fig. 1) que en la época de secas, aunque la diferencia no fue muy evidente. En trabajos anteriores desarrollados por el grupo de Genotoxicología Ambiental, se han obtenido resultados similares con *Robinsonecio* (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018a), donde se observó que en época de lluvias se incrementó el daño en comparación a la época de secas.

El tiempo de exposición en el que estuvieron las plantas fue otro factor que contribuyó en el daño observado. Sin embargo, en este caso se evidenció que también la época influyó, puesto que en lluvias hubo mayor daño a las 2 semanas y, en secas el daño fue ligeramente mayor a la

semana 8 (Fig. 2). Esto indica que el tiempo de exposición puede influir de manera distinta dependiendo de las condiciones ambientales consideradas. Yang y Tam (2013) en su estudio sobre la tolerancia al plomo en dos especies de manglar observaron que en dos tiempos distintos de exposición al metal las plantas respondieron diferente a cada uno. Y aunque, en el caso mencionado, ellos describen estas diferencias causadas por la distinta tolerancia de cada especie en diversas variables, es de destacar que el tiempo de exposición sí puede ser una variable que influya en el nivel de estrés que se presente en un organismo.

Los sitios de exposición donde se registró el mayor daño, tanto para *Robinsonecio* como para *Senecio* en ambas temporadas, fueron: Ecatepec, que se caracteriza por la gran actividad industrial e intenso tráfico vehicular y, la estación CCA, donde predomina la contaminación por la importante circulación de automóviles. Por lo que se puede proponer que los contaminantes presentes en las plantas que fueron expuestas en las estaciones, tanto en CCA como en Ecatepec, estuvieron en concentraciones más tóxicas para estas especies, y como se mencionó anteriormente, ese daño aumentó en la temporada de lluvias.

En el trabajo de Gómez-Arroyo *et al.* (2018a) también se observó que los contaminantes presentes en la estación de CCA generaron mayor daño que lo observado en las plantas expuestas en la estación Altzomoni, por lo que se corrobora la toxicidad en esa estación de monitoreo. Es de destacar que el lugar donde se notó menos daño fue Tlalnepantla, cuyos valores en las dos especies fueron similares a sus respectivos testigos e incluso menores, lo cual sugiere que las condiciones que prevalecieron durante las exposiciones en la zona no fueron tóxicas para estas plantas.

Evaluación del estrés oxidante

Con el ensayo de detección de MTT se determinó, de forma indirecta, el nivel de estrés oxidante que tuvieron las plantas, ya que se sabe que cualquier tipo de condición adversa, en última instancia, genera este estrés (Apel y Hirt, 2004) y en particular la toxicidad provocada por el exceso de metales pesados también la induce (Pérez y Pérez de Alejo, 2000; Choudhury *et al.*,

2013). En ambas especies, las diferencias en los niveles de MTT reducidas, entre las plantas testigo y las que fueron expuestas en los sitios contaminados fueron significativas.

De manera general, en *Senecio* se produjo mayor reducción de MTT, que en *Robinsonecio*. Esto indica que *Senecio* presentó mayor sensibilidad a las condiciones estresantes de los sitios de exposición que le provocó mayor estrés oxidante. Por otra parte, el sitio de exposición influyó de forma importante en la inducción de estrés oxidante, pues el que se cuantificó en los lugares contaminados fue mayor, en comparación al de las plantas testigo. Esto sugiere que tanto las características particulares de cada planta como el sitio donde fueron expuestas, influyeron en la cantidad de estrés oxidante que presentó cada una. En el caso de *Robinsonecio*, los valores más altos de estrés oxidante se observaron en todos los sitios excepto en Ecatepec, mientras que *Senecio*, además de tener valores más elevados en general en todos los sitios, un punto importante fue CCA (Fig. 3). Estos datos también contrastan con lo obtenido en los datos del ensayo cometa, puesto que en *Robinsonecio* se observó mayor daño al DNA siendo que presentó menor cantidad de estrés oxidante y viceversa con *Senecio* (Fig. 1).

En este trabajo la mayoría de los metales tóxicos que se evaluaron producen el O^{2-} como estresor (Juknys *et al.*, 2012), y que puede determinarse a través del ensayo de MTT. Como ya se mencionó, la presencia de estrés oxidante produce diversos efectos inespecíficos que afectan a cualquier sistema biológico y a nivel celular recaen sobre las biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA (Sharma *et al.*, 2012). Lo cual explica el daño observado al DNA denominado como “momento de la cauda” de los cometas en ambas plantas expuestas a las diferentes atmósferas. Además esta respuesta fue distinta en cada especie. Por lo que se evidenció que las condiciones de cada sitio fueron determinantes en la magnitud de respuesta de inducción de EROs que presentó cada una. Asimismo, se observa que en Alzomoni, CCA y Tlalnepantla la cantidad de estrés oxidante producida en estos sitios es similar entre sí en *Robinsonecio*, sólo con pequeñas variaciones observables; en comparación a Ecatepec donde los valores fueron mínimos (Fig. 3). Mientras que en *Senecio*, las concentraciones fueron más elevadas para todos los sitios en comparación a *Robinsonecio* (Fig. 3), en este caso se observa que en Alzomoni y en Ecatepec las concentraciones se mantuvieron constantes de la semana 2 a la 8, mientras que en CCA disminuyó y en Tlalnepantla aumentó ligeramente, lo que indicó que probablemente las condiciones en estos sitios fueron más variables.

Respuesta fisiológica: concentración de carotenoides

De manera general, los carotenoides aumentan como una respuesta antioxidante: por un lado, para mitigar el estrés oxidante que se produce durante la fotosíntesis, y por el otro, aquel resultante por el estrés abiótico de distintas fuentes, incluidos los metales pesados (Fryzova *et al.*, 2017). Este aumento de la concentración de carotenoides evita el daño del estrés oxidante en las células (Apel y Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004), por lo que, el hecho de que se haya observado este incremento en las hojas de las plantas expuestas en los distintos sitios contaminados, en contraste con las plantas testigo, confirmaría el efecto estresante de la contaminación atmosférica de los sitios de exposición, los metales pesados incrementados presentes en los individuos. Por otra parte, se puede notar en la figura 5 que las concentraciones de ambas especies son similares entre sí, en la mayoría de los sitios e incluso de una semana a otra. Puntualmente, se observa en CCA, la mayor concentración de carotenoides, tanto para *Robinsonecio* como para *Senecio*; lo que evidencia que en este sitio la contaminación está afectando la fisiología de las plantas.

Además, los productos oxidados de los carotenoides que se originan al mitigar el efecto del estrés oxidante pueden funcionar como señalizadores en las plantas y estos se derivan principalmente del β -caroteno, como por ejemplo el endoperóxido (Havaux, 2013). Este hecho tiene implicación biológica, ya que las diferencias en las concentraciones de los carotenoides tipo β fueron significativamente diferentes entre especies, y las plantas de *Senecio* fueron las que presentaron mayor concentración de éste. De forma específica, se observa que en *Robinsonecio* en condiciones normales el valor obtenido de carotenoides tipo α fue de 0.0119 mg/L y en *Senecio* fue de 0.0157 mg/L, mientras que los valores correspondientes para carotenoides tipo β en *Robinsonecio* fueron de 0.0011 mg/L y en *Senecio* fueron de 0.0044 mg/L (Figs. 5 y 7). La diferencia más marcada entre una especie y otra es en los carotenoides tipo β , aunque en ambos tipos la mayor concentración se da en *Senecio*. No obstante, el resultado pudo deberse al metabolismo particular de cada planta, ya que se ha descrito, por ejemplo, que la síntesis de éstos se da en los cloroplastos y que la cantidad de estos organelos varía entre especies (Nisar *et al.*, 2015). Si bien, no se descarta que pudiera tratarse de una estrategia que posiblemente tengan las plantas de *Senecio*, para disminuir el estrés oxidante en general. En *Robinsonecio* la

concentración aumentó en los sitios de exposición y aunque sólo los datos de Tlalnepantla fueron significativos (Fig. 7), se observa que este patrón puede ser un indicio de cómo responden los carotenoides tipo β en esta especie ante la contaminación, siendo CCA y Tlalnepantla los lugares que más les afectaron.

En el trabajo de Wang *et al.* (2019), hacen una observación interesante. Ellos determinaron en *Pinus massoniana* que bajas concentraciones de Pb, Cu y Zn tienden a aumentar la síntesis de pigmentos como los carotenoides, pero a altas concentraciones de estos metales pesados los pigmentos tienden a disminuir. En el presente trabajo, como ya se mencionó, los carotenoides aumentaron en los sitios contaminados, lo cual sugeriría, de acuerdo con lo citado por estos autores, que la cantidad de metales pesados que presentaron las plantas no fue suficientemente elevada para afectar esta característica, pero también hay que tomar en cuenta que son dos grupos distintos de plantas, y que cada uno podría estar reaccionando de diferente forma ante este tipo de estrés.

Regulación molecular del estrés oxidante: cuantificación del miR398

En cuanto al análisis de expresión del miR398, tanto en *Robinsonecio* como en *Senecio*, se verificaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre las especies. *Senecio* presentó una expresión aumentada de miR398, en contraste con los niveles encontrados en *Robinsonecio*. La vía de regulación miR398-SOD se ha descrito no sólo en *A. thaliana* sino en otras especies como *Taraxacum officinalis* (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018b). De manera similar, Naya *et al.* (2014) analizaron la expresión de los diferentes loci del miR398 en plantas de frijol, bajo condiciones de estrés biótico o abiótico, y observaron que se suprimió la expresión del miR398 en condiciones de exposición prolongada a Cu^{2+} , lo que conlleva a la acumulación de mensajeros de SOD1 y por consiguiente la supresión de EROs. Qiu *et al.* (2016) reportaron resultados similares en plantas de trigo, al evaluar la citotoxicidad por Cd^{+2} , aunque también observaron diferencias en la expresión para cada tipo de órgano y el tiempo transcurrido de exposición. En el presente estudio se evidenció que la expresión aumentó, por lo que

aparentemente el sistema de SOD-miR398 no pareció haber sido activado en ninguna de las especies aquí evaluadas.

Monavar *et al.* (2011), estudiaron la presencia y expresión de diferentes miRNAs en algunas especies de la familia Asteraceae y encontraron que el miR398 se expresó en bajos niveles en condiciones normales. Por otra parte, Li *et al.* (2011) realizaron un estudio similar con la *Cartamus tinctorius* que pertenece a esta familia, también observaron niveles bajos de expresión de miR398 en la semilla de la planta. Si bien, en estos dos trabajos los análisis se realizaron en condiciones normales, pueden ser un buen punto de comparación, ya que se observó que las plantas de *Robinsonecio* podrían compartir esta característica. Sin embargo, aún se tienen que hacer mayores estudios para conocer cuál es el significado de este aumento de expresión del miR398 en *Robinsonecio* y *Senecio*, pues como ambos autores concluyen, estos patrones pueden variar dependiendo del tipo de tejido y de la variedad del miR398.

Respecto al miR398, se observaron cambios en la expresión en diferentes condiciones pero no se encontró otro dato importante, por lo que no es posible confirmar si este responde al efecto de la contaminación de los sitios de exposición. Además, este es el primer estudio que analizó la expresión del miR398 en estas especies, por lo que faltaría profundizar los análisis para observar de mejor manera la forma en que se comporta este miRNA.

Análisis químico: concentración de metales pesados

En otros estudios se han podido hacer análisis entre las concentraciones de metales contenidos en el ambiente y las almacenadas por las plantas. Por ejemplo, Keane *et al.* (2001), relacionaron las concentraciones de metales pesados de diversos sitios contaminados en Estados Unidos, con los presentes en los tejidos del diente de león, y observaron correlaciones positivas para algunos de los elementos estudiados. Concluyeron que la contaminación de un sitio se puede ver reflejada en estas plantas. Si bien, el análisis químico de los contaminantes a los que se expusieron las plantas es importante para comprobar de manera completa junto con el resto de los análisis, de qué forma la contaminación afecta las plantas, en este trabajo fue complicado llevarlo a cabo, debido a que los datos atmosféricos recabados por la Red Universitaria de Observatorios

Atmosféricos (RUOA) de la UNAM y la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) a los que se pudo tener acceso fueron insuficientes.

Las concentraciones en cada especie y en cada lugar variaron, pero fue posible observar que en algunos casos el comportamiento de éstos fue muy similar. Por ejemplo, en plantas de *Robinsonecio* y para el caso de Al^{3+} , V^{3+} y Fe^{2+} , aumentaron sus concentraciones en proporciones similares a los descritos en los mismos sitios. Similar a lo que se observó con Cr^{3+} , Co^{2+} y Ni^{+1} , cuyo aumento abrupto se identificó en el mismo sitio (Tabla 5). Esto podría deberse a que el incremento en la concentración de un metal pesado, puede influir en la concentración de otro, como lo describieron Bashir *et al.* (2016), quienes analizaron el efecto del exceso y de la deficiencia de Fe^{2+} en varios tejidos de plantas de arroz. Ellos encontraron que cuando hay un exceso de Fe^{2+} en el ambiente donde crecieron las plantas, también hubo mayor acumulación de Mn^{+2} , mientras que en deficiencia de Fe^{2+} aumentó la concentración de Zn^{2+} y Cu^{2+} . En las plantas de *Senecio*, no se pudieron obtener todas las muestras de los sitios, debido a que algunos de los ejemplares murieron antes de poder ser analizados. No obstante, se observó cierto patrón de concentración entre los metales analizados (Tabla 6).

Asimismo, es importante distinguir el tipo de metal pesado que puede afectar, pues hay aquellos que son tóxicos y aquellos que tienen importancia fisiológica en los organismos. En ambas especies los metales con mayores concentraciones son Al^{3+} , Mn^{+2} , Fe^{2+} , y Zn^{2+} , donde los dos últimos son elementos esenciales, mientras que el Mn^{+2} es considerado como un micronutriente, lo cual explicaría el que sus concentraciones tienden a ser elevadas, sin que lleguen a ser tóxicas. De acuerdo a las concentraciones de metales pesados que pueden ser toleradas por las plantas y que son mencionadas por Mahler (2004) se observa que los valores obtenidos de Mn^{+2} y Fe^{2+} no superan el límite de toxicidad (Tabla 9). Puntualmente, en el Zn^{2+} se observa una diferencia de concentración tóxica en función del autor que se esté consultando, sin embargo, también hay que tomar en cuenta la especie de planta de donde se está obteniendo este valor. Como ya se mencionó anteriormente, el Zn^{2+} es un elemento que es muy utilizado por las plantas, por lo que el hecho de que esté elevado muy probablemente se deba a esto último. Los elementos tóxicos Cd^{2+} y Pb^{2+} , tampoco resultaron elevados en comparación a las referencias (Tabla 9), pero el V^{3+} sí tuvo concentraciones más elevadas tanto para *Robinsonecio* como para *Senecio*, en

comparación a los valores base de Caires *et al.* (2014). Por lo que tentativamente el V³⁺ pudo contribuir a la respuesta estresante que mostraron las plantas, aunque no se encontró una correlación significativa con este metal y sin olvidar que los datos obtenidos en éstas son muy nuevos y que son especies silvestres, por lo que habría que realizar más análisis para comparar y comprobar los resultados. El Ni presentó un valor mayor al límite de la toxicidad según Díez (2009) en Alzomoni durante la temporada de lluvias en *Robinsoncio*, en donde los datos de cometa y de MTT correspondientes para estas variables fueron de los más elevados dentro de la misma semana (Figs. 1-4). Lo anterior podría indicar que el níquel contribuyó al daño observado en las plantas, sin embargo, el análisis de correlación no arrojó ningún dato significativo para estas variables (Tabla 7).

Tabla 9. Valores reportados de concentración máxima de metales pesados en las plantas.

Metales	Concentración máxima tolerada (mg Kg⁻¹)	Referencia
Aluminio	-	-
Vanadio	0.013-0.017	Caires <i>et al.</i> , 2014
Cadmio	5	Díez, 2009
Plomo	30	Díez, 2009
Hierro	1000	Mahler, 2004
Zinc	100 300	Mahler, 2004 Díez, 2009
Manganeso	200	Mahler, 2004
Níquel	10-50	Díez, 2009
Cobalto	-	-
Cromo	-	-

De manera general, en este estudio la mayoría de los metales aumentaron su concentración en la época de lluvias en ambas especies. De acuerdo con Shahid *et al.* (2017), las condiciones meteorológicas en las que se encuentran las plantas pueden influir en la penetración de los

metales pesados, pues condiciones como la alta humedad relativa pueden influir en el metabolismo para movilizar a los metales y demás partículas que penetran y aumentan su tasa de absorción.

Al comparar las concentraciones de los metales pesados en las hojas de las plantas, con las contenidas en sus respectivos testigos, se observó que *Robinsonecio*, absorbió más metales pesados que *Senecio*. Las plantas de *Senecio* contienen una concentración basal más elevada de éstos. Lo cual fue posible explicar debido a la gran cantidad de tricomas que poseen las plantas de *Robinsonecio*, y que muy probablemente ayudaron al depósito de metales pesados y posterior absorción por la planta. Esto ha sido mostrado por Beckett *et al.* (2000), quienes estudiaron la absorción y depósito de partículas en diferentes especies de árboles, y concluyeron que *Sorbus intermedia*, una especie con hojas gruesas y de abundantes tricomas, fue la que presentó mayores valores de absorción de partículas. Por otra parte, se sabe que las EROs son señalizadores celulares importantes y dentro de sus funciones se encuentra el cierre de estomas, ya que se ha demostrado que el H₂O₂ induce este evento provocando que la planta ya no absorba más contaminantes (Apel y Hirt, 2004). Las plantas de *Senecio* tal vez tuvieron esa estrategia de cerrar sus estomas para evitar una mayor absorción de metales. Aunque, se ha reportado que otra especie de este mismo género, *Senecio coronatus*, se comporta más como una planta fitorremediadora que como una indicadora o como un organismo biomonitor (Mesjasz-Przybylowicz *et al.*, 2007), por lo que se explicaría de cierta manera el que *Senecio roseus* también respondiera más como una acumuladora de los metales pesados. Otro indicio de que *Senecio* puede funcionar como una especie fitorremediadora, es el hecho de que tuvo mayor concentración de carotenoides en los sitios de exposición, en comparación a sus testigos y a *Robinsonecio*, lo cual se considera como una respuesta favorable de los pigmentos que permiten que una planta tenga esta característica (Wang *et al.*, 2019).

Correlación entre las variables

No se encontraron correlaciones significativas entre los valores de los parámetros biológicos medidos y la concentración de metales pesados en los individuos experimentales, a excepción de un caso.

En este trabajo se estudiaron las respuestas de dos especies diferentes, y se observaron distintas respuestas ante un mismo estímulo mixto-complejo estresor donde una de ellas, mostró resultados que indican que tuvo mayor tolerancia ante el estrés que la otra especie: el ensayo cometa reveló que *Robinsonecio* presentó mayor daño genético mientras que éste fue considerablemente menor en *Senecio*. En este punto, a *Senecio* se le puede considerar como una especie más resistente ante la contaminación y/o como se mencionó anteriormente, al ser especie fitoacumuladora, tiene mecanismos de adaptación. Yang y Tam (2013) y Dolker *et al.* (2019) realizaron estudios semejantes, donde utilizaron también dos especies para evaluar sus respuestas, en ambos casos observaron que una de las dos fue más tolerante y concluyeron que fue por el aumento de diversos antioxidantes como las enzimas SOD y POD, entre otros.

En el presente trabajo se tomaron en cuenta dos sistemas antioxidantes que pudieron actuar en la respuesta ante el estrés por contaminación. Si bien, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas, se observó que en el caso de *Senecio* la concentración de carotenoides tipo β fue mayor, lo que posiblemente influyó en que hubiera menor daño al DNA aunque su concentración de MTT fuera mayor, sumado a su característica tolerante que ha desarrollado al ser fitoacumuladora de metales pesados. Sin embargo, no sería raro que también se activaran otros mecanismos encargados de desintoxicar las EROs; sin embargo, no se cuantificaron todas éstas, puesto que cada especie posee sistemas antioxidantes diferentes para contrarrestar el efecto oxidante (Genisel *et al.*, 2015).

En *Senecio*, los datos obtenidos de la exposición en Altzomoni son los que no concuerdan con la hipótesis de que en un sitio rural hay menos contaminación y por lo tanto menor daño (Tabla 6). Los datos de ambas especies podrían indicar que la presencia de otros contaminantes están provocando dichas respuestas, dado que los metales pesados no son los únicos componentes de la contaminación atmosférica. Además, existen estudios en los que se evalúa la toxicidad de los metales pesados cuando se les mezcla con otros compuestos (Shahid *et al.*, 2014, 2015) y que puede ser mayor o menor en función del metal y de su especie química, inclusive la combinación de dos metales puede llegar a modificar la toxicidad que cada uno (Kováčik *et al.*, 2012). Todas estas variables pudieron influir en los resultados del daño al DNA, lo que explicaría por qué en

CCA y Ecatepec hubo mayor efecto que en Tlalnepantla a pesar de que en este último sitio las concentraciones de metales pesados en general fueron mayores.

Se sabe que los radicales libres están asociados con la inducción del daño a diversas moléculas incluyendo al DNA, debido a que pueden añadir dobles enlaces en las bases o reaccionar con los átomos de carbono de los azúcares, produciendo lesiones en las hebras, que pueden originar mutaciones o rompimientos (Evans *et al.*, 2004). Pero los resultados de los ensayos cometa y MTT mostraron lo contrario. Puesto que tanto la especie con más daño, *Robinsonecio*, y los sitios donde se produjo mayor daño, CCA y Ecatepec, presentaron niveles bajos de estrés oxidante, y viceversa con *Senecio* y Tlalnepantla. En estos casos, se requiere profundizar los estudios para entender mejor tanto los sistemas antioxidantes de *Senecio*, los cuales son clave para que esta especie tuviera menor daño, como las características de la contaminación de Tlalnepantla que en conjunto no fue tan tóxica para estas especies.

Específicamente, se registró que en ambas especies, el metal presente en altas concentraciones en la estación CCA, durante la época de secas fue el Zn^{2+} (Tablas 5 y 6), y de acuerdo al análisis se encontró una correlación directa entre el aumento de este metal, y de las concentraciones de los carotenoides tipo α , por lo que se sugiere que las plantas posiblemente respondieron ante la presencia del Zn^{2+} , ya que fue el sitio donde se observó mayor daño en el DNA. Y el aumento de este pigmento es una respuesta para mitigar el estrés por este metal. También se sabe que los carotenoides son señalizadores en mecanismos que regulan respuestas adaptativas en la célula (Nisar *et al.*, 2015). Por lo que el cambio de sus concentraciones en cada sitio posiblemente representó una estrategia de las plantas para aclimatarse ante esas condiciones de estrés.

De acuerdo con Kumar (2016), existen dos categorías principales para definir a las plantas que pueden ser utilizadas como biomonitores: las sensibles, que indican la presencia de contaminantes por la inducción de lesiones, y las acumuladoras, que concentran a los contaminantes en sus cuerpos. En este caso, las plantas de *Robinsonecio* se mostraron más como especie sensible, debido a que el daño genético observado fue considerable, en comparación a la cantidad de metales pesados que tuvo. Por otra parte, como ya se mencionó, las plantas de *Senecio* podrían considerarse más como especie acumuladora. Sin embargo, aún falta hacer más

pruebas con ambas especies para conocer exactamente de qué manera podrían ser utilizadas en estudios toxicológicos.

CONCLUSIONES

Tanto *Robinsonecio gerberifolius* como *Senecio roseus*, respondieron ante la contaminación atmosférica en los diferentes sitios del Valle de México, por lo que podrían ser utilizadas en análisis toxicológicos posteriores para el caso de *Robinsonecio gerberifolius* como biomonitor, y de acumuladora de metales pesados para el caso de *Senecio roseus*. Ambas especies evidenciaron mayor daño durante la temporada de lluvias y en las estaciones de CCA y Ecatepec, y en presencia de los metales pesados que se encontraron en mayor proporción fueron: Al^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{+2} .

Se pudo comprobar la expresión del miR398 en ambas especies, sin embargo, no se observó de manera inversa al estrés oxidante como ha sido reportado. Se requiere realizar más estudios sobre este miRNA en estas especies para determinar si puede ser utilizado como un indicador de estrés oxidante por metales pesados o no.

Se cuantificaron tanto las EROs como los pigmentos tipo carotenoides para determinar el nivel de estrés de las plantas, así como su respuesta fisiológica ante éste. Si bien, se pudieron identificar ciertos puntos de estrés oxidante y cambio de concentración de carotenoides ante la contaminación, no fue posible asociar de manera directa con el daño al DNA. Esto último puede deberse al metabolismo particular de cada especie, en las cuales los diversos sistemas antioxidantes o de reparación pudieron estar involucrados y que no fueron medidos en este estudio.

Al observar los resultados de ambas plantas, a pesar de la variabilidad se encontraron resultados consistentes. También, se debe tener precaución de realizar conclusiones simples en este tipo de estudios donde se utilizaron especies silvestres de plantas. No obstante, el presente estudio contribuye de manera importante sobre el conocimiento de *Robinsonecio gerberifolius* y *Senecio roseus* tanto sobre su biología como para utilizarlas como biomonitores.

REFERENCIAS

- Ansoar R.Y., Fontanetti C.S., Christofolletti C.A. y Díaz L.S.C. 2015. Aplicaciones del ensayo cometa en genética ecotoxicológica. *CENIC Ciencias Biológicas*. 46 (1): 51-62.
- Apel K. y Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55:373–99.
- Ashby J. 1982. Screening chemicals for mutagenicity: practices and pitfalls. En Mutagenicity new horizons in genetic toxicology. Heddle J.A. (Ed.). *Academic Press*. Canada, pp. 2-32.
- Ballester F. 2005. Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *Revista Española de Salud Pública*. 79: 159-175.
- Baltrop J.A. y Owen T.C. 1991. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-Dimethyl Thiazolyl)-3-(4-Sulfophenyl) Tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1: 611-614.
- Bartel D. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- Bashir K., Rasheed S., Kobayashi T., Seki M. y Nishizawa N.K. 2016. Regulating subcellular metal homeostasis: The key to crop improvement. *Frontiers in Plant Science*. 7:1192.
- Beckett K.P., Freer-Smith P.H. y Taylor G. 2000. Particulate pollution capture by urban trees: effect of species and windspeed. *Global Change Biology*. 6: 995-1003.
- Caires O.A., Silva dos Santos V., Correia dos Santos D., Duarte S.C.R., Santos S.A. y Costa F.S.L. 2014. Determination of the mineral composition of Caigua (*Cyclanthera pedata*) and evaluation using multivariate analysis. *Food Chemistry*. 152: 619–623.
- Calderón-Garcidueñas L., Kulesza R.J., Doty R.L., D'Angiulli A. y Torres-Jardón R. 2015. Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environmental Research*. 137:157-169.
- Choudhury S., Panda P., Sahoo L y Kumar P.S. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. 8: e23681.
- Ciurli A., Lenzi L., Alpi A. y Pardossi A. 2014. Arsenic uptake and translocation by plants in pot and field experiments. *International Journal of Phytoremediation*. 16: 804-823.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*. 88:1707–1719.

Collins R.A., Azqueta O.A., Brunborg G., Gaiva I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., y Stetina R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 23(3): 143–151.

Collins A.R. 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840:794-800.

Díez L.J. 2009. Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas (Tesis de doctorado). Universidad de Santiago de Compostela. España.

Dinkova T.D. y Juárez-González V.T. 2016. El Universo de RNAs pequeños en plantas: su versatilidad en la regulación de la expresión genética. *MENSAJE BIOQUÍMICO*. XL: 87-110.

Dolker T., Mukherjee A., Agrawal S. B. y Agrawal M. 2019. Ozone phytotoxicity to *Panicum maximum* and *Cenchrus ciliaris* at Indo-Gangetic plains: An assessment of antioxidative defense and growth responses. *Ecotoxicology*. 28:853–868.

Evans M.D., Dizdaroglu M. y Cooke M.S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutation Research*. 567:1–61.

Fajersztajn L., Saldiva P., Pereira L.A.A., Figueiredo L.V. y Buehler A.M. 2017. Short-term effects of fine particulate matter pollution on daily health events in Latin America: a systematic review and metaanalysis. *International Journal of Public Health*. 62(7):729-738.

Felemban A., Braguy J., Zurbriggen M.D. y Al-Babili S. 2019. Apocarotenoids Involved in Plant Development and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*. 10:1168.

Floris M., Mahgoub H., Lanet E., Robaglia C. y Menand B. 2009. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 10:3168-3185.

Freedman B. 1995. Environmental Ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. Academic Press. 2nd Edition United Kingdom, 606 p.

Fryzova R., Pohanka M., Martinkova P., Cihlarova H., Brtnicky M., Hladky J., y Jindrich K. 2017. Oxidative Stress and Heavy Metals in Plants. *Reviews of environmental contamination and toxicology*.

Gallego M.S., Kogan M., Azpilicueta C.E., Peña C. y Tomaro M.L. 2005. Glutathione-mediated antioxidative mechanisms in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cells in response to cadmium stress. *Journal of Plant Growth Regulation*. 46:267-276.

Gallego M.S., Pena B.L., García A.R., Azpilicueta E.C., Iannone F.M., Rosales P.E., Sawoznik S.M., Groppa D.M. y Benavides M.P. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*. 83:33–46.

- Genisel M., Demir Y., Gorcek Z., Turk H., Yanmis D., Karaman A., Genc E. y Khosroushani F.K. 2015. Effect of lead stress on antioxidant mechanism and DNA profile in different wheat cultivars. *Journal of Environmental Protection and Ecology*. 16:1282–1296.
- Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Loza-Gómez P., Arenas-Huertero F., Grutter de la Mora M. y Morton-Bermea O. 2018a. *In situ* biomonitoring of air quality in rural and urban environments of Mexico Valley through genotoxicity evaluated in wild plants. *Atmospheric Pollution Research*. 9:119-125.
- Gómez-Arroyo, S., Barba-García A., Arenas-Huertero F., Cortés-Eslava J., Grutter de la Mora M. y García-Martínez R. 2018b. Indicators of environmental contamination by heavy metals in leaves of *Taraxacum officinale* in two zones of the metropolitan area of Mexico City. *Environmental Science and Pollution Research*. 62:729–738.
- Grant F.W. y Zura K.D. 1982. Plants as sensitive *in situ* detectors of atmospheric mutagens. En: Mutagenicity new horizons in genetic toxicology. Heddle J.A. (Ed.). *Academic Press*. Canada, pp. 408-429.
- Hannoufa A. y Hossain Z. 2012. Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1: 198–202.
- Havaux M. 2013. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*. 79: 597–606.
- Huang T., Zhu M., Li X. y Zhao S. 2008. Discovery of porcine microRNAs and profiling from skeletal muscle tissues during development. *PLoSOne*. 3:e3225.
- Johnston R. y Hobert O. 2003. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 426:845–849.
- Jones-Rhoades M. y Bartel D. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*. 14:787–799.
- Juknys R., Vitkauskaitė G., Račaitė M. y Vencloviėnė J. 2012. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Central European Journal of Biology*. 7:299-306.
- Keane B., Collier M.H., Shann J.R. y Rogstad S.H. 2001. Metal content of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves in relation to soil contamination and airborne particulate matter. *The Science of the Total Environment*. 281:63-78.
- Kováčik J., Klejdus B., Stork F. y Hedbavny J. 2012. Physiological responses of *Tillandsia albida* (Bromeliaceae) to long-term foliar metal application. *Journal of Hazardous Materials*. 239-240:175-182.
- Kovalchuk I. y Kovalchuk O. 2008. Transgenic plants as sensors of environmental pollution genotoxicity. *Sensors*. 8:1539-1558.

- Kumar R.P. 2016. Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 129:120-136.
- Li H., Dong Y., Sun Y., Zhu E., Yang J., Liu X., Xue P., Xiao Y., Yang S. Wu J. y Li X. 2011. Investigation of the microRNAs in safflower seed, leaf, and petal by high-throughput sequencing. *Planta*. 233:611-619.
- Mahler R.L. 2004. General Overview of Nutrition for Field and Container Crops. *National Nursery Proceedings*. 26-29 pp.
- Mallory A.C., Elmayan T., y Vaucheret H. 2008. MicroRNA maturation and action—the expanding roles of ARGONAUTES. *Current opinion in Plant Biology*. 11:560-566.
- Martínez A. E. y Díaz de Mera M.Y. 2004. Contaminación atmosférica. *Universidad de Castilla La Mancha*, 288 p.
- Mesjasz-Przybyłowicz J., Barnabas A. y Przybyłowicz W. 2007. Comparison of cytology and distribution of nickel in roots of Ni-hyperaccumulating and non-hyperaccumulating genotypes of *Senecio coronatus*. *Plant Soil*. 293:61–78.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. y Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9:490-498.
- Möller P. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damage in exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 98:336–345.
- Monavar F.A., Mohammadi S., Frazier T.P., Abbasi A., Abedini R., Farsad L.K., Ehya F., Salekdeh G.H. y Mardi M. 2011. Identification and validation of Asteraceae miRNAs by the expressed sequence tag analysis. *Gene*. 493:253–259.
- Moreno S.R. y Devars S. 1999. Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En Cervantes C. y Moreno S. R. (eds). Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. *AGT* (Ed.), 157 p.
- Morton-Bermea, O. 2006. Contenido de metales pesados en suelos superficiales de la Ciudad de México. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 9:45-57.
- Naja G.M. y Volesky B. 2009. Toxicity and Sources of Pb, Cd, Hg, Cr, As and Radionuclides in the Environment. En: Wang L.K., Chen J.P., Hung Y. y Shammam N.K. (eds.) Heavy Metals in the Environment. *CRC Press Taylor and Francis Group*. USA, pp. 13-62.
- Naya L., Sujay P., Valdés-López O., Mendoza-Soto, A.B., Nova-Franco B., Sosa-Valencia G., Reyes J.L. y Hernández G. 2014. Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS ONE*. 9:e84416.

- Newell K., Kartsonaki C., Hubert L.K.B. y Kurmi O. 2018. Cardiorespiratory health effects of gaseous ambient air pollution exposure in low and middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health*. 17:41.
- Nisar N., Li L., Lu S., Khin N.C. y Pogson B.J. 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*. 8:68-82.
- Olvera A.H., Kubzansky L., Campenc M.J. y Slavich G.M. 2019. Early life stress, air pollution, inflammation, and disease: An integrative review and immunologic model of social-environmental adversity and lifespan health. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 92:226-242.
- Organización Mundial de la Salud. 2016. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250141>.
- Östling O. y Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123:291-298.
- Pepper I.L., Gerba C.P., Brusseau M.L. 2006. Environmental and Pollution Science. *Elsevier Science/ Academic Press*. 2nd ed. San Diego Ca., 552 p.
- Pérez G.P.L. y Pérez de Alejo J.L. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 29:192-198.
- Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S. y Hübner H. 2017. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. Gilbert D.F. y Friedrich O. (eds), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1601: 1-17.
- Qiu Z., Hai B., Guo J., Li Y. y Zhang L. 2016. Characterization of wheat miRNAs and their target genes responsive to cadmium stress. *Plant Physiology et Biochemistry*. 101:60-67.
- Racchi M.L. 2013. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*. 2: 340-369.
- Ramel F., Mialoundama A.S. y Havaux M. 2012. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 64: 799–805.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro (Michoacán), 1406 p.
- Santos C.L.V., Pourrut B. y Ferreira de Oliveira J.M.P. 2015. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics*. 6:216.

- Shahid M., Austruy A., Echevarria G., Arshad M., Sanaullah M., Aslam M., Nadeem M., Nasim W. y Dumat C. 2014. EDTA-Enhanced phytoremediation of heavy metals: A review. *Soil and Sediment Contamination*. 23:389–416.
- Shahid M., Dumat C., Pourrut B., Abbas G., Shahid N. y Pinelli E. 2015. Role of metal speciation in lead-induced oxidative stress to *Vicia faba* roots. *Russian Journal of Plant Physiology*. 62(4):448-454.
- Shahid M., Dumat C., Khalida S., Schreck E., Xiong T., y Niazi N.K. 2017. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*. 325:36-58.
- Sharma P., Bhushan Jha A., Shanker D. R., y Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*.
- Singh N.P., McCoy M.T, Tice R.R, Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-191.
- Sunkar R., Kapoor A. y Zhu J.K. 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*. 18:2051-2065.
- Sytar O., Kumar A., Latowski D., Kuczynska P., Strzalka K. y Prasad M.N.V. 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35:985-999.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. y Sasaki Y.F. 2000. Single cell/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.
- Valverde M. y Rojas E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 681:93-109.
- Vázquez B.A. 2005. Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. *Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*. 695 p.
- Villarini M., Fatigoni C., Dominici L., Maestri S., Ederli L., Pasqualini S., Monarca S. y Moretti M. 2009. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two *in situ* plant bioassays. *Environmental Pollution*. 157:3354-3356.
- Vladimirovna A.L. y Ayushievna A.T. 2019. Accumulation of heavy metals and biochemical responses in Siberian larch needles in urban area. *Ecotoxicology*. 28:578–588.
- Wang Z., Qin H. y Wang J. 2019. Needle pigment responses of *Pinus massoniana* L. to soils

polluted with the heavy metals Zn, Pb and Cu. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*. 19:1-5.

Yang Z. y Tam N.F.Y. 2013. Differences in lead tolerance between *Kandelia obovata* and *Acanthus ilicifolius* seedlings under varying treatment times. *Aquatic Toxicology*. 126:154-156.

Yuan H., Zhang J., Nageswaran D. y Li L. 2015. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research*. 2: 1-11.

Zuluaga Q.M., Valencia R.A M. y Ortiz T.I.C. 2009. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*. 28:33-41.

APÉNDICE I: Especies utilizadas

Robinsonecio



Senecio



APÉNDICE II: Estaciones de exposición

Testigo



Altzomoni



CCA



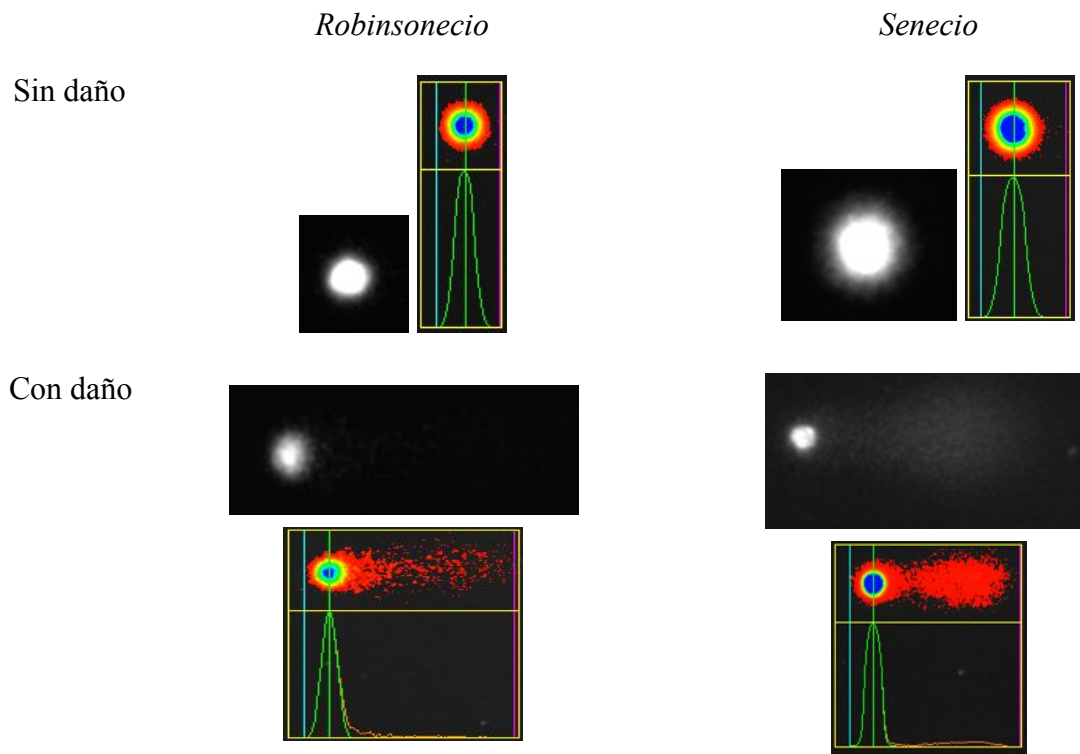
Ecatepec



Tlalnepantla



APÉNDICE III: Fotografías del ensayo cometa.



Fotografías de los núcleos de *Robinsonecio* y de *Senecio* después de la electroforesis, con y sin daño, y capturas de las mismas a través del analizador de imágenes Comet Assay IV.