

003611  
24



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INDUCCION DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS  
DE SANGRE PERIFERICA POR LA FRACCION  
ORGANICA ASOCIADA A AEROPARTICULAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA)**

**PRESENTA:**

**MARIA TERESA ABAD CAMACHO**

Este trabajo se realizó bajo la dirección del  
Dr. Rafael Villalobos Pietrini  
del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM

**MEXICO, D. F. 1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

260587



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Lista de abreviaturas	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	9
III. HIPOTESIS DE TRABAJO	10
IV. MATERIAL Y METODOS	11
V. RESULTADOS	17
VI. DISCUSION	20
VII. CONCLUSIONES	28
VIII. REFERENCIAS	29
IX. TABLAS Y FIGURAS	36

*Con todo mi amor*

*A mis padres:*

*Ethelvina q.p.d y Julián Camilo  
por traerme al convite de la vida*

*A Jesús Antonio:  
compañero del combate diario  
y del festín*

*Para Christian, Arely y Mayte*

*Un agradecimiento especial a:*

*Dr. Rafael Villalobos Pietrini  
director de esta tesis, por su apoyo, dedicación y tiempo invertido  
en este trabajo.*

*Dr. Luis Hernández Álvarez  
por su hospitalidad y apoyo en el Bioterio de Biología de la  
Reproducción y Genética de la FMBUAP*

*Dr. Carlos Escamilla  
Director del Bioterio Central Claude Bernard de la BUAP por el  
apoyo incondicional en la manutención y sugerencias para mis  
ratones*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Aceite de maíz
CSGMT	(Collaborative study group for the micronucleus test) Grupo colaborador del estudio para la prueba de micronúcleos
CGRUPE	Coordinación General de Reordenación Urbana y Protección Ecológica
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPCMN	Eritrocitos policromáticos micronucleados
G <sub>1</sub>	Periodo presintético de la interfase mitótica
G <sub>2</sub>	Periodo postsintético de la interfase mitótica
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IMECA	Índice Mexicano de Contaminación Atmosférica
MN	Micronúcleos
MO	Médula ósea
NC	Normocitos
NCMN	Normocitos micronucleados
PM10	Partículas menores de 10 micrómetros
PST	Partículas suspendidas totales
RET	Reticulocitos
RETMN	Reticulocitos micronucleados
S	Periodo de síntesis de la interfase mitótica.
SEDUE	Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología

*Para nuestro trabajo son necesarias dos cosas: una de ellas es una persistencia infatigable; la otra, la habilidad para desechar algo en lo que hemos invertido muchos sudores y muchas ideas.*

*Albert Einstein.*

## RESUMEN

La difusión masiva y creciente de agentes químicos al ambiente ha conducido al desarrollo de acciones tendientes a identificar y evaluar los efectos de esos contaminantes sobre el ecosistema; En México según la SEDUE (1986), las emisiones anuales de contaminantes son mayores de 16 millones de toneladas, de las que el 35% tienen origen industrial y el 65% son de origen vehicular (SEDUE 1986) solo se han identificado del 30 al 40% del total de los compuestos orgánicos que están asociados a las aeropartículas, de manera que es importante realizar estudios de estos compuestos, considerando el riesgo toxicológico completo que implica.

Entre los contaminantes más importantes de la Ciudad de México, se encuentran las aeropartículas, a las que se asocian compuestos orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que se forman por la combustión incompleta de energéticos fósiles. El propósito de este trabajo fue investigar y comparar la actividad genotóxica de los extractos del material orgánico asociado a las aeropartículas suspendidas totales y aquellas con diámetro igual o menor a diez micrómetros, mediante la prueba de micronúcleos (MN), ensayo *in vivo*, recomendado como estudio inicial en la búsqueda de daño citogenético por su ventaja en la detección de agentes clastogénicos o venenos del huso acromático y porque puede ofrecer información sobre citotoxicidad y mutagenicidad del agente ensayado con la preparación simple y rápida de muestras.



Las partículas suspendidas en el aire se colectaron mediante filtros de fibra de vidrio expuestos al ambiente durante 24 h en muestreadores (Andersen Samplers Inc.), de grandes volúmenes para partículas suspendidas totales (PST) y partículas iguales o menores de 10  $\mu\text{m}$  (PM10), calibrados a un flujo aproximado de 1.13  $\text{m}^3/\text{min}$ . Los filtros fueron mantenidos en condiciones estándar de 27° C y 35% de humedad relativa hasta que fueron pesados 24 h antes y 24 h después de la exposición lo que permitió conocer el peso del material particulado capturado.

Se colectó una masa de 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de PM10 y 230  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST en 24 h encontrándose fenantreno, benzo(a)pireno, criseno y benzo(b)fluoranteno en la fracción PM10 y únicamente fluoreno y pireno en la de PST

Los extractos tanto de PM10 como de PST produjeron elevación significativa ( $p < 0.05$ ) de RETMN siendo  $\text{PM10} > \text{PST}$ . En cambio citotóxicamente,  $\text{PM10} < \text{PST}$ . Los resultados justifican el uso del sistema de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica como sensor biológico en los análisis de rutina para establecer criterios de toxicidad y genotoxicidad en mamíferos.

La prueba de micronúcleos se realizó en el Departamento de Genética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## INTRODUCCION

La difusión masiva y creciente de agentes químicos al ambiente ha conducido al desarrollo de acciones tendientes a identificar y evaluar los efectos de esos contaminantes sobre el ambiente, la flora, la fauna y los seres humanos.

Según la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE 1986), las emisiones anuales de contaminantes son mayores de 16 millones de toneladas, de las cuales el 35% son de origen industrial y el 65% de origen vehicular. Los contaminantes del aire son gases y partículas, estas son mezclas complejas de carbono, óxidos, sales inorgánicas y metales a los que se adsorben compuestos orgánicos como los hidrocarburos que son contaminantes importantes de las zonas urbanas de países tanto desarrollados como en vías de desarrollo (Chamberlain 1983, SEDUE 1986).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en la atmósfera se encuentran en forma gaseosa y particulada (Saltzman et al. 1985). Algunos autores han correlacionando la mutagenicidad de las aeropartículas con los contaminantes del aire (Alink et al. 1983, Finlayson-Pitts y Pitts 1986), ya que el tamaño de los corpúsculos permite determinar su estancia en el aire y su penetración en el tracto respiratorio (Finlayson-Pitts y Pitts 1986). A las partículas con diámetro aerodinámico menor de  $10\ \mu\text{m}$  se les conoce como la fracción respirable (Breyse y Swift 1990). El 90% tienen diámetro menor a  $5\ \mu\text{m}$  y de esas las de  $1.5\ \mu\text{m}$  son capaces de penetrar más fácilmente hasta los alvéolos pulmonares (Bowes et al. 1990), a este polvo de material particulado se le ha asociado con el cáncer de pulmón. Hughes et al. (1980) y Tokiwa et

al (1980) sugieren que las partículas con diámetro de  $0.03 \mu\text{m}$  a  $1.0 \mu\text{m}$  son especialmente peligrosas por su posible penetración al pulmón humano y su difícil remoción, considerándose que las partículas con diámetro menor a  $2.5 \mu\text{m}$  son las que presentan más actividad mutagenica (Pitts et al. 1978, Hughes et al. 1980, van Houdt et al. 1987).

La combustión, pirrólisis y pirosíntesis de materia orgánica origina los HAP a los que el humano está expuesto mediante la respiración, ingestión y contacto dérmico, así se inhalan al fumar o simplemente al respirar aire contaminado o bien se ingieren con alimentos procesados. Muchos de estos HAP, son iniciadores y promotores de tumores e inductores de mutaciones tanto *in vivo* como *in vitro* (Talcott y Harger 1979).

Numerosos procesos corrientes de la combustión en refinerías y en vehiculos que utilizan gasolina y diesel (energéticos fósiles) producen en grado variable este tipo de contaminantes. En México el 65% de las emisiones anuales son de origen vehicular (SEDUE 1986). Solamente se han identificado del 30 al 40% del total de las fracciones orgánicas que están asociadas a las aeropartículas, de manera que es importante realizar estudios sobre la porción no identificada para conocer el riesgo toxicológico completo que implica, ya que según van Houdt et al. (1987) la muestra compleja da una base más real de la actividad mutagénica que la prueba de sus componentes individuales, debido a que posiblemente exista sinergismo o antagonismo entre estos compuestos (Alink et al 1983).

Por todo lo anterior es importante probar la mezcla compleja del aire de la Ciudad de México en diversos sistemas biológicos para determinar el daño que produce especialmente a nivel genético.

Una de las formas clásicas de estudiar este daño, es mediante el análisis de aberraciones cromosómicas en metafases de las células tratadas tanto *in vivo* como *in vitro*, con los agentes que se prueban; sin embargo, esto es laborioso y caro. Sin embargo surge como una alternativa al análisis clásico de metafases, la prueba de micronúcleos, en eritrocitos policromáticos, la cual es rápida, sensible y económica.

Los micronúcleos (MN), se originan de la cromatina que no se fusiona con el núcleo principal y forma uno o varios núcleos pequeños. Esto, puede ocurrir por los siguientes mecanismos: rompimiento cromosómico, que se traduce en la formación de fragmentos acéntricos, daño del huso acromático ó inactivación del centrómero que origina micronúcleos de mayor tamaño.. (Schmid 1975, 1976, Heddle et al. 1991)( Fig. 1).

La existencia de micronúcleos ha sido reconocida desde hace muchos años (cuerpos de Howell-Jolly); pues en 1937 Brenneke (citado por Heddle et al. 1983) los relacionó con daño cromosómico en trabajos hechos con radiaciones. El primer intento serio para utilizar a los micronúcleos como ensayo para medir el daño citogenético, aparece descrito por Evans et al. en 1959 (citado por Heddle 1988) y a partir de entonces ha sido aplicada esta técnica en diversos tejidos y tipos de organismos.

En plantas se han utilizado los tejidos meristemáticos de la raíz de plántulas de *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Tradescantia* y *Vicia faba* (Sharma y Sahur 1977, Linnainmaa et al. 1978, Gómez-Arroyo et al. 1985), para estudiar las alteraciones cromosómicas especialmente por la ventaja que ofrecen estos organismos para ser empleados como sensores ambientales.

En varias especies de mamíferos se han aplicado los análisis de micronúcleos En humanos también se ha trabajado a este nivel en médula

ósea *in vivo* (Matter y Schmid 1971), sin embargo es difícil la obtención de muestras; no obstante, se han encontrado eritrocitos micronucleados en pacientes tratados con diferentes medicamentos (Goetz et al. 1975, Krogh-Jensen 1977, Heddle et al 1978, Krogh-Jensen y Nyfors 1979, Sorensen y Krogh-Jensen 1981) y se han estudiado en cultivos celulares de linfocitos humanos después de la aplicación de radiaciones X (Countryman y Heddle 1976).

Una de las ventajas de la prueba de micronúcleos sobre el análisis de los cromosomas metafásicos radica en que es 10 veces más rápida y sencilla (Heddle 1973), también es posible realizarla tanto en la médula ósea como en sangre periférica y la cantidad de células para el registro es elevada y fácil, aún para personas con poco adiestramiento en citogenética. Otro aspecto importante es que no se requiere de estimulación externa para activar la división celular y obtener así una gran población (Schmid 1976). La frecuencia basal de células micronucleadas es baja y casi uniforme (Heddle et al. 1983).

Originalmente las observaciones de MN se hacían en toda la población celular de la médula ósea, pero desde von Ledebur y Schmid (1973) se revisan solamente eritrocitos jóvenes o policromáticos ya que la facilidad aumenta cuando se selecciona una población celular de identificación sencilla.

Durante la generación de los elementos mieloides, la célula madre o célula del retículo puede originar tres líneas, a partir del megacariocito se producen las plaquetas, del promielocito, los *granulocitos segmentados* y del proeritroblasto maduran los eritrocitos.

Un eritroblasto requiere de cuatro días para llegar a la madurez. Los procesos principales que intervienen en su maduración son la reducción del

volumen, la condensación de la cromatina nuclear y finalmente la pérdida del núcleo y de los organelos celulares con la adquisición de la hemoglobina.

La formación del eritrocito es un proceso continuo que se ha dividido en varias etapas: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático y eritrocito maduro o normocito (Fig. 2) (Ham 1969).

Aunque muchos aspectos de la biología del eritroblasto policromático (EPC) no han sido suficientemente estudiados se sabe que pierde su núcleo de 8 a 12 h después de la última mitosis del normoblasto (Salamone et al. 1980), sin embargo, no se conocen los mecanismos mediante los cuales esto se lleva a cabo, ni tampoco si todos los micronúcleos escapan a la expulsión.

Las células precursoras de los eritrocitos, los eritroblastos sintetizan la hemoglobina, para lo cual desarrollan una cantidad considerable de ribosomas, los eritroblastos se dividen tres veces y al hacerlo van perdiendo ribosomas, después de tantas divisiones están tan divididos que ya no le imparten basofilia citoplasmática a los eritrocitos. En condiciones normales sólo algunos eritrocitos con suficiente basofilia son liberados a la circulación, esto se observa con la tinción supravital del colorante azul brillante de cresilo, que reacciona con los ribosomas apareciendo como una red interna muy fina. Los eritrocitos inmaduros o reticulocitos cuando se tiñen con colorantes del tipo Giemsa, presentan color gris azulado que contrasta con los maduros que se tiñen de rosa-naranja. El reticulocito corresponde al eritrocito policromático (EPC) cuya duración es de un día. Los reticulocitos jóvenes muestran más retículo que los maduros y son ligeramente más grandes que los normocitos (Ham 1969). Estas diferencias entre ambos tipos de eritrocitos se han empleado para distinguir a los eritrocitos policromáticos de los normocitos en el análisis de micronúcleos (Schmid 1976).

Las ventajas que presenta la prueba de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos son las siguientes: son células muy abundantes y fácilmente reconocibles, de reciente división celular y no poseen núcleo. lo que facilita el análisis

No se sabe con seguridad cual es la cantidad de eritrocitos nuevos liberados hacia la circulación, la mayoría pierde su material basófilo en la médula ósea. Cuando aumenta la producción, el espacio de almacenamiento de la médula no lo hace en la misma proporción y se libera una cantidad mayor de eritrocitos en la sangre, estos EPC, contribuyen con el porcentaje más elevado de reticulocitos, por eso su cuenta brinda información acerca del ritmo de generación de glóbulos rojos y en forma indirecta de su destrucción o pérdida (Ham 1969).

Los micronúcleos ya sean inducidos por venenos mitóticos o por rompimientos cromosómicos, tienen apariencia similar: redondos, de contorno bien definido, con diámetro que va de  $1/20$  a  $1/5$  del eritrocito, una minoría semeja la forma de almendra o mango y los menos tienen aspecto de anillo. La mayoría de las células tienen sólo un MN, aunque en algunas hay 2 ó 3.

Según Schmid (1976), los agentes que actúan predominantemente durante la fase S del ciclo celular no producen MN en cantidad apreciable, ya que consideran que 30 horas es poco tiempo para completar parte de S,  $G_2$ , mitosis, expulsión del núcleo y maduración del eritrocito, los MN aumentan cuando la acción se realiza sobre cromosomas en  $G_2$  ó sobre el aparato mitótico.

Por otra parte, aunque un micronúcleo indica la ocurrencia de una aberración cromosómica no es posible especificar de que tipo es, lo que



representa una desventaja. Los micronúcleos inducidos por venenos del huso son más grandes que los generados por clastógenos ya que incluyen cromosomas completos y el tiempo de su producción es acortado varias horas ya que se circunscribe a la mitosis

La prueba de MN es evidencia de eventos que causan pérdida de cromatina, sin embargo, una célula al perder suficiente material genético es eliminada rápidamente. Según Schmid (1976) los MN causados por tratamientos crónicos con un mutágeno no se acumulan, pero Schlegel y MacGregor (1982), consideran que la frecuencia de micronúcleos después de una exposición prolongada a algunos mutágenos debe ser aditiva dado que los eritrocitos micronucleados permanecen en la circulación periférica hasta por un mes

En un estudio de Yamamoto y Kikuchi (1980) sobre el tamaño de los micronúcleos generados por clastógenos o por venenos del huso, se indica que es posible identificar la forma de acción del agente inductor de micronúcleos midiendo sobre fotografías los diámetros del citoplasma y del micronúcleo, de cada eritrocito micronucleado, notándose que los MN del grupo tratado con venenos mitóticos son más grandes que los micronúcleos causados por la exposición a clastógenos y que la talla celular del primer grupo varía más ampliamente. Los micronúcleos liberados de fragmentos acéntricos causados por daño cromosómico (Heddle y Carrano 1977), son considerablemente más pequeños que los ocasionados por falla del aparato mitótico y esa variación de tamaño puede reflejar una división celular anormal en el eritroblasto precursor.

En el ratón, la expulsión del núcleo del eritroblasto ocurre 6 h después de la última mitosis y los siguientes estados del EPC están en la médula ósea

durante 12 a 24 h, después aparecen en sangre periférica por un tiempo similar en donde el EPC madura a eritrocito normocromático (ENC): estos últimos persisten en la sangre periférica por 20 a 45 días (Schlegel y MacGregor 1982).

Un periodo de 6 h ó más transcurre cuando el ciclo se retrasa, desde la exposición del ratón a un mutágeno y la observación del daño como EPCMN en médula ósea; veinticuatro horas después será observado en sangre periférica (MacGregor et al. 1980). El nivel de producción de EPCMN depende de la presencia del agente y de la lesión al DNA, así no es posible predecir el tiempo preciso de máxima expresión para un compuesto específico. En varias especies los EPCMN son removidos de la circulación por el bazo, pero este no es el caso para la mayoría de las líneas de ratón (Schlegel y MacGregor 1982).

A pesar de que gran parte de las investigaciones se han realizado en médula ósea, Mavourin et al. (1990) incluyen recomendaciones para el protocolo de esta prueba en sangre periférica como una variación del ensayo de médula ósea. El estudio en sangre periférica es similar al de la médula ósea excepto por el tiempo de recuperación de las muestras que se hace 24 h más tarde. Una enorme ventaja de la prueba de micronúcleos en sangre periférica es que resulta más económica ya que se pueden coleccionar varias veces muestras del mismo ratón hasta obtener el tiempo preciso en que aparece la máxima frecuencia de micronúcleos.

## **OBJETIVO**

Se comparó la actividad genotóxica del material orgánico asociado a partículas suspendidas totales (PST) en el aire, con aquellas de diámetro igual o menor de diez micrómetros (PM10), mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

1ª

H<sub>0</sub> LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS ASOCIADOS A LAS PM<sub>10</sub> Y PST NO INDUCEN ELEVACION EN LA FRECUENCIA DE RETMN.

2ª

H<sub>0</sub>. EL PORCENTAJE DE RET CON LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE PM10 ES MENOR O IGUAL AL PORCENTAJE DE RET CON LOS DE PST

$$PM10 \leq PST$$

3ª

H<sub>0</sub>: LA FRECUENCIA DE RETMN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE PM10 ES MENOR O IGUAL A LA FRECUENCIA DE RETMN DE LOS DE PST

$$PM10 \leq PST$$

## MATERIAL Y METODOS

Las partículas suspendidas en el aire se colectaron mediante filtros de fibra de vidrio expuestos al ambiente durante 24 h en muestreadores (Andersen Samplers Inc.), de grandes volúmenes para partículas suspendidas totales (PST) y partículas iguales o menores de 10  $\mu\text{m}$  (PM10), calibrados a un flujo aproximado de 1.13  $\text{m}^3/\text{min}$ . Los filtros se mantuvieron en condiciones estándar de 27 $^{\circ}$  C y 35% de humedad relativa hasta que fueron pesados 24 h antes y 24 h después de la exposición lo que permitió conocer el peso del material particulado capturado.

El muestreo se realizó en la Merced, área del centro de la zona Metropolitana de la Ciudad de México (Fig.3); una de las estaciones que la Comisión Metropolitana para el Control y Prevención de la Contaminación Ambiental tiene para el monitoreo de la calidad del aire (Tabla I) y que tuvo los niveles de contaminación mas altos entre los meses de enero a agosto de 1991 (CGRUPE 1991).

Los filtros se trataron con 250 ml de metanol en un aparato Soxhlet, durante 6 h, según las técnicas descritas por Gordon (1974), Grosjean (1975), Cautreels y van Cauwenberghe (1976), Hill et al. (1977), Tokiwa et al.(1977) y de Raat, (1983), después se evaporó a sequedad total en baño María y se llevó a un volumen fijo de 1 ml con metanol, que permite extraer eficazmente los compuestos orgánicos (Jungers y Lewtas 1980).

Una vez obtenido el extracto se dividió en alícuotas; para hacer el análisis cromatográfico y la prueba de *micronúcleos en sangre periférica*, así

como para los ensayos de Ames y de Drosophila, que complementaron el estudio

#### Análisis químico:

Para determinar la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos se examinaron las muestras por medio de cromatografía de gases de la siguiente manera.

1. Se realizó la concentración en baño María a 70°C.
2. Se inyectaron 2 ml al cromatógrafo (Perkin-Elmer 2000), con el separador cerrado durante 30 seg a temperatura programada, de acuerdo con el método de la EPA-610.

	Inicial	Final
Temperatura	80	310
Tiempo (min)		2
-----		
Velocidad de calentamiento		60 C min
Temperatura del inyector		2300 C
Temperatura del detector		3250 C

3. La cuantificación de HAP y sus nitroderivados se hizo con la ayuda de un estándar externo que contenía los HAP a concentración de 1-20 µg/ml (Tabla II).

Como eluyente se empleó metanol (grado cromatográfico), como gas de arrastre hidrógeno y la columna fue de metil fenil silicona (50%). Se empleó el detector de ionización de llama y de nitrógeno fósforo.

Para utilizar la muestra en la inducción de micronúcleos (MN) en reticulocitos (RET), ésta se evaporó a sequedad total en baño María y se le agregaron 0.3 ml de aceite de maíz, de aquí se tomaron 0.1 ml y se llevaron a 5 ml conteniendo el equivalente de  $54.39 \text{ m}^3$  de aire, para buscar la concentración de administración adecuada. Se prepararon 2 frascos más de igual forma.

Para el experimento preliminar se usaron 16 ratones blancos de la línea CD-1, de 6 a 8 semanas de edad con pesos promedio de  $26.9 \text{ g} \pm 1.93(\text{DE})$  en las hembras y de  $30.85 \text{ g} \pm 2.41 (\text{DE})$  en los machos, mantenidos en condiciones de bioterio estándar (temperatura constante, ambiente libre de patógenos, ciclos de iluminación de 12 por 12 h, alimento purina Chow y agua purificada *ad libitum*). Se dividieron en dos grupos: los que recibieron la mezcla compleja y los testigos. El tratamiento fue agudo por vía intraperitoneal en concentración única a las 0 h. La cantidad máxima aplicada tanto de mezcla compleja como de aceite de maíz (testigo negativo) fue de 0.66 ml.

Se administró la mezcla compleja de PM10 (Merced 02-08-91 clave 5), a concentración de  $7.5 \text{ m}^3$ ,  $15 \text{ m}^3$ ,  $30 \text{ m}^3$ ,  $60 \text{ m}^3$ ,  $120 \text{ m}^3$  y  $240 \text{ m}^3$  por kilogramo de peso ( Hayashi 1984), utilizando como vehículo el aceite de maíz.

En el experimento preliminar se emplearon dos ratones para cada concentración, uno de cada sexo, (CSGMT 1988). Los testigos negativos solo recibieron el vehículo. A los testigos positivos se les aplicó 60 mg/kg de peso de ciclofosfanida.

Para la toma de muestras se hizo un corte fino del extremo distal de la cola del ratón con tijeras iris y se colocó una gota pequeña de sangre periférica en cada portaobjetos realizando su extensión con otro en posición de 45° sobre el primero. Se tomaron dos frotis de cada ratón de acuerdo con la técnica descrita por Schmid (1976), a las 24, 48 y 72 h, después del tratamiento para establecer el momento de máxima expresión de RETMN, según el reporte del CSGMT (1986,1988,1992).

Los frotis se secaron al aire por 24 h y se fijaron en metanol absoluto por 5 min para después teñirlos según la técnica de Gollapudi y Kamra (1978) con Giemsa al 5% en amortiguador fosfato pH 6.8.

Mediante el objetivo de alto poder (100x), se leyeron las frecuencias de RETMN en 2000 RET de cada animal y las de normocitos micronucleados (NCMN) en 1000 normocitos (NC). Se determinó la relación RET:NC de cada concentración como indicador de la proliferación o del retraso del ciclo celular contando el número de RET por cada 1000 NC.

El análisis estadístico para comparar la frecuencia de MN se basó en la prueba de Kastenbaum-Bowman (1970).

En esta experiencia preliminar solo las concentraciones de 30 y 60 m<sup>3</sup>, a las 24 h posttratamiento elevaron los RETMN en forma significativa con un valor de  $p < 0.05$ . Con esto como base se realizó la prueba de MN con una cantidad mayor de animales y con las concentraciones siguientes:

30 m<sup>3</sup>/kg, 60 m<sup>3</sup>/kg y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso, de la mezcla compleja PM10 de la Merced (02-08-91) a 9 ratones CD-1 (5 machos y 4 hembras por concentración).



Se les administró un volumen de 10 ml/kg de peso de aceite de maíz a los testigos negativos (5 machos y 3 hembras)

Se aplicaron dos testigos positivos, uno con estructura semejante a la de HAP contenidos en el extracto: el benzo(a)pireno [B(a)P], a concentraciones de 100 mg/kg de peso a 5 machos y otro, la ciclofosfamida (CFM), como testigo positivo comúnmente usado a concentración de 60 mg/kg de peso a 3 hembras y 3 machos.

El peso promedio de los machos fue  $17.4 \text{ g} \pm 2.9$  (DE) y el de las hembras de  $18.8 \text{ g} \pm 3.9$  (DE)

A las 24 h del tratamiento se tomaron dos frotis de cada animal para procesarlos y leerlos de acuerdo con la técnica descrita previamente.

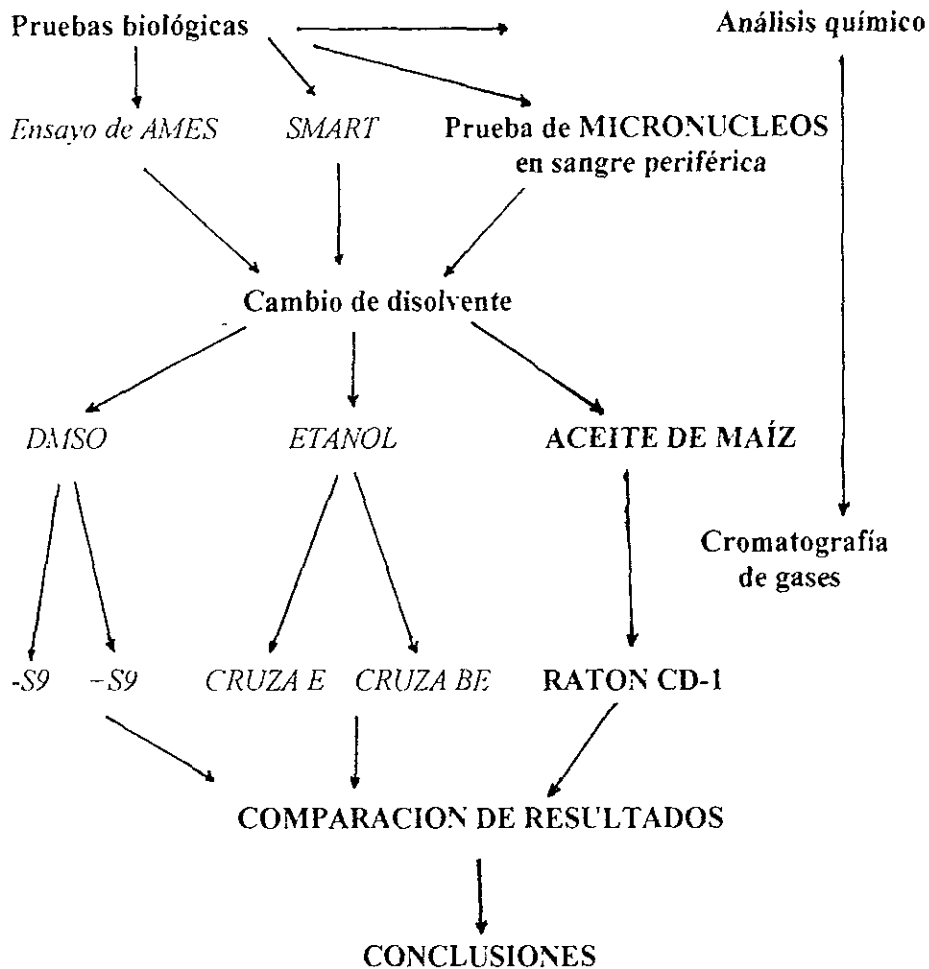
Para establecer la comparación entre las mezclas complejas de PM10 y PST se utilizó la muestra No.7 de LA MERCED (02-08-91) que se colectara al mismo tiempo que la anterior.

Se utilizaron 10 ratones CD-1 (5 machos y 5 hembras por concentración) de 6 a 8 semanas de edad, con pesos promedio en los machos de  $29.9 \text{ g} \pm 3.4$  (DE) y en las hembras de  $24.4 \text{ g} \pm 3.9$  (DE) y se les aplicaron concentraciones de 30 m<sup>3</sup>/kg, 60 m<sup>3</sup>/kg, 90 m<sup>3</sup>/kg de PST. Además se administró como testigo positivo 100 mg/kg de B(a)P, a 4 machos y a 5 hembras y 60 mg/kg de CFM a 3 machos y 4 hembras.

Todos los tratamientos se administraron intraperitonealmente a la hora 0 y a las 24 h postratamiento, se obtuvieron dos frotis de cada animal que se procesaron y analizaron con la técnica previamente descrita.

# FLUJOGRAMA

Extracción de la muestra de aeropartículas



## RESULTADOS

Estimación de la masa de partículas por filtro:

La masa de partículas colectadas en los muestreos realizados en La Merced, fueron  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{10}$  y  $230 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST que no rebasan los límites permitidos de 150 y  $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectivamente.

Análisis químico:

Se comprobó la existencia de cuatro HAP en el análisis químico de las mezclas extraídas de  $\text{PM}_{10}$ : fenantreno, criseno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno y solo dos HAP en PST: fluoreno y pireno (Tabla III), cuyas fórmulas estructurales se presentan en la figura 4.

Efectos genotóxicos.

Como se puede apreciar en la tabla IV y en la figura 5, el porcentaje de RET disminuye con el tiempo ya que en todas las concentraciones de mezcla compleja de  $\text{PM}_{10}$  probadas, la cantidad de reticulocitos fue a las 24h>48h>72h, excepto para de  $7.5 \text{ m}^3$  que a las 24 h tiene 6.4%, baja a 3.3% a las 48 h y se aprecia en 4.6% a las 72 h, algo semejante ocurre con el aceite de maíz que a las 24 h tiene 6.9% de RET, baja al 2.7% a las 48 h para aumentar a 3.4% a las 72h.

Se notó el mayor número de RETMN a las 24 h postratamiento con mezcla compleja de  $\text{PM}_{10}$  y de CFM en todas las concentraciones probadas (Fig. 6), no así con el aceite de maíz que tuvo la frecuencia mayor de RETMN a las 48 h posteriores al tratamiento

Con concentraciones de 120 m<sup>3</sup> y 240 m<sup>3</sup> de mezcla compleja de PM10 y a las 24 h se encontró un porcentaje de RETMN similar del 2.5 X 10<sup>-3</sup>. La mayor frecuencia registrada fue a los 30 m<sup>3</sup> y 60 m<sup>3</sup>/kg de peso, con 4.3 X 10<sup>-3</sup> y 4.5 X 10<sup>-3</sup>, respectivamente. Con la CFM, hubo 5.3 X 10<sup>-3</sup> de RETMN. Con el aceite de maíz, se manifestó una frecuencia de 1.5 X 10<sup>-3</sup> a las mismas 24 h.

A las 48 h la mayor cantidad de RETMN fue para 60 m<sup>3</sup>/kg de peso con 3 X 10<sup>-3</sup>, que es mayor que la reportada con concentración de 240 m<sup>3</sup>/kg de peso y con aceite de maíz (AM), ambos de 2.3 X 10<sup>-3</sup>. Las frecuencias de RETMN en orden decreciente, fueron de 2 X 10<sup>-3</sup> para 30 m<sup>3</sup>/kg de peso y 1.5 X 10<sup>-3</sup> para 120 m<sup>3</sup> y 7.5 m<sup>3</sup>/kg de peso, siendo la menor frecuencia para 15 m<sup>3</sup>/kg de peso con 1.3 X 10<sup>-3</sup> de RETMN y CFM con 1 X 10<sup>-3</sup>.

A las 72 h postratamiento con mezcla compleja PM10, la mayor frecuencia de RETMN fue para la CFM con 2.3 X 10<sup>-3</sup>, después para el AM con 2 X 10<sup>-3</sup>, y luego 7.5 m<sup>3</sup>, 30 m<sup>3</sup> y 120 m<sup>3</sup>/kg de peso, con 1.8 X 10<sup>-3</sup> de RETMN. La administración de 15 m<sup>3</sup> y 60 m<sup>3</sup>/kg de peso, dió resultado de 1 X 10<sup>-3</sup> y la concentración de 240 m<sup>3</sup>/kg de 0.8 X 10<sup>-3</sup>.

La cantidad total de RETMN en este experimento fue a las 24>48h>72h, (tabla V, Fig. 7) con 75, 46 y 32, respectivamente.

El mayor número de RETMN se encontró a las 24 h con 30 m<sup>3</sup> y 60 m<sup>3</sup>/kg de peso (Tabla V). Con base en estos datos solo resultaron significativos (p<0.05, según la prueba de Kastenbaum-Bowman 1970) estos dos últimos casos. Debido a que a las 24 h se encontró el número mas elevado

de RET se decidió repetir el tratamiento agudo con mayor cantidad de animales y con concentraciones de 30 m<sup>3</sup>, 60 m<sup>3</sup> y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso de mezcla compleja de PM10 y de PST para establecer la comparación entre ambas.

Con la mezcla compleja de partículas iguales o menores de 10 µm (PM10), en la tabla VI y en la Fig.8, aparece el porcentaje de reticulocitos de 3.94, 3.37 y 2.46% a los 30, 60 y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso, respectivamente (al aumentar la concentración disminuyó la cantidad de estos). El porcentaje de RET en los animales tratados con AM fue de 2.95%, 2.64% para los tratados con B(a)P, y de 1.83% para CFM.

Con el extracto de PST (Fig. 9), el porcentaje de RET fue de 2.51%, 1.57% y 2.15% a los 30, 60 y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso respectivamente, siendo el menor valor con 60 m<sup>3</sup>/kg de peso, mientras que con AM fue de 3.45%, el B(a)P de 1.79% y los tratados con CFM de 2.41%.

La frecuencia de RETMN para los tratados con la mezcla compleja de PM10 fue de 2.4, 4.1 y 2.6 en mil, para las concentraciones de 30, 60 y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso, respectivamente (Fig.9); para el B(a)P la frecuencia fue de 3 en mil y para la CFM de 4 en mil, y en los tratados con AM de 0.38 en mil.

La frecuencia de RETMN encontrada con PST, fue de 2.5, 2.0 y 2.6 en mil, para 30, 60, y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso respectivamente, encontrando en los testigos positivos  $2.4 \times 10^{-3}$  para el B(a)P y  $6.4 \times 10^{-3}$  para la CFM. El testigo negativo tuvo una frecuencia de  $0.38 \times 10^{-3}$

## DISCUSIÓN

### PARTÍCULAS COLECTADAS

La Cd. de México alberga la quinta parte de la población total de la República y es una de las ciudades con mayor cantidad de emisiones contaminantes vertidas a la atmósfera, ya que hay estimaciones de 14,000 toneladas al día; la industria contribuye con el 35% anual y el 65% es de origen vehicular (SEDUE 1986, Legorreta 1991).

Debido a su menor tamaño las PM10 suspendidas en el aire permanecen mayor tiempo en la atmósfera, aproximadamente 100 h (Esmen y Corn 1971), son la fracción respirable que alcanzan a los bronquios y a los bronquiolos, se depositan fácilmente en los pulmones eliminándose con mayor dificultad y debido a esto pueden ser transportadas al torrente circulatorio a través de la membrana alveolar, favoreciendo la distribución de estos compuestos a todo el organismo (Chrisp y Fisher 1990). Las partículas más grandes (PST), se mantienen en las vías aéreas superiores de los individuos (fosas nasales, laringe y faringe), son la fracción inhalable, se eliminan mas fácilmente con mecanismos fisiológicos propios como la remoción de la mucosa y el intercambio respiratorio (Breyse y Swift 1990), lo que en todo caso lleva a la ingestión del material contaminado. Estos compuestos pueden ser solubilizados y absorbidos por el intestino y distribuirse a todo el organismo a través de la circulación, llegando a otros órganos susceptibles (Chrisp y Fisher 1990).

La norma mexicana para PST es de  $275 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en 24 h (Fuentes G 1991) y en este trabajo se colectaron  $230 \mu\text{g}/\text{m}^3$  y  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST en 24 h de muestreo. Si para que surjan problemas críticos se requieren cifras superiores a 300 IMECAS ó  $650 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST, existen ciertos fenómenos que pueden contribuir a ésta, como la escasez de vientos o bien un período prolongado de inversión térmica que hace que las partículas contaminantes se estanquen a poca altura y representen un riesgo para la salud de los habitantes del Valle de México. Si bien los efectos nocivos se manifiestan por una parte en la reducción de la visibilidad, por otra, la gran variedad de compuestos tóxicos entre los que se incluyen metales pesados, sustancias orgánicas sintéticas, hidrocarburos aromáticos, etc., tienen oportunidad de actuar de manera acumulada y crónica manifestándose a largo plazo en la salud de los individuos expuestos (Alink et al. 1983, Manahan, 1984, Finlayson-Pitts y Pitts. 1986, Bravo et al. 1991, Quadri et al. 1992).

## ANÁLISIS QUÍMICO

En la fracción respirable (PM10) se hallaron cuatro HAP: fenantreno, criseno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno, que según una evaluación automatizada de las estructuras químicas mediante computadora, (Mersch-Sundermann 1992) tienen características moleculares asociadas con la actividad genotóxica y comprobada en el ensayo con *Escherichia coli* PQ37. El fenantreno produjo respuesta experimental positiva y probabilidad del 99% de ser genotóxico. El criseno, experimentalmente positivo con 97.9% de probabilidad genotóxica. El benzo(a)pireno, experimentalmente positivo con

99.9% de probabilidades genotóxicas. El fluoranteno sin la molécula benzo, fue un compuesto activo solo con 80% de probabilidades genotóxicas

En la fracción de PST se encontraron al fluoreno quien según Mersch-Sundermann (1992) es inactivo con 12.4% de actividad genotóxica y el pireno también inactivo experimentalmente con 0.0% de actividad genotóxica

Esto concuerda con lo observado en este trabajo ya que la fracción PM10 resultó tener mayor actividad genotóxica que la fracción PST y los mismos resultados se encuentran en dos estudios previos en el sistema de AMES (Villalobos-Pietrini et al. 1995) y con la cruz de bioactivación elevada de *Drosophila melanogaster* (DeJgado-Rodríguez 1993) para las mismas muestras (Tabla VII).

Las partículas identificadas en el aire urbano son una mezcla compleja de compuestos orgánicos, muchos de ellos provienen de la quema incompleta de materia orgánica y de combustibles fósiles (Crittenden y Long 1976, IARC 1987), el metabolismo de esos compuestos puede liberar productos relativamente no tóxicos que son eliminados del organismo rápidamente. Sin embargo, muchos de ellos pueden metabolizarse en sustancias más reactivas capaces de interaccionar con macromoléculas celulares como el DNA, un ejemplo es el metabolismo del B(a)P, que produce pireno-7,8-diol 9,10-epóxido, que es el inicio de una secuencia de eventos que causan genotoxicidad y carcinogenicidad. Se ha demostrado que los extractos de aire urbano y de partículas del escape de los automóviles contienen HAP y pueden provocar la inducción de la actividad de dos citocromos P450 en células cultivadas de hepatoma de rata y el aumento de uno de ellos: el citocromo P450I que incluye la presencia de dos genes CYP1A1 Y CYP1A2, que son inducibles con hidrocarburos aromáticos policíclicos. El incremento de la



expresión del gen CYP1A1 ha estado implicado en el desarrollo de cáncer (Mason 1994) y no todas las razas de ratones son sensibles a la inducción de estos (CSGMT 1988, 1992, Sato et al. 1987, 1990, Hatanaka et al.1992).

## EFFECTOS GENOTÓXICOS

En la figura 5, se puede apreciar que con la concentración de 7.5 m<sup>3</sup>/kg de peso de PM10, a las 24 h existe reticulocitosis (6.4%), semejante a lo que ocurre con el AM (6.9%), ya que las cifras normales para nuestro laboratorio y el CSGMT (1992); son de 2 a 5%. . Esto tal vez se explicaría por el sangrado que normalmente se causa al tomar la muestra, el cual incrementa la producción de reticulocitos. La baja producción de estos a las 48 h podría ser el efecto de metabolizar la mezcla compleja ó el AM. A las 72 h, se podría considerar una recuperación, pero no ocurre con las dosis mayores de 7.5 m<sup>3</sup>/kg probadas, ya que aparentemente conforme se metaboliza la mezcla aumenta la citotoxicidad. Simula y Priestly (1991) mencionan la importancia de distinguir el efecto citotóxico causado por diversos aceites del provocado por el compuesto probado ya que la mayoría de ellos aumentan la cantidad de reticulocitos sin incrementar los micronúcleos.

Se encontró una diferencia significativa según la prueba de Kastenbaum-Bowman ( $p < 0.05$ ), en la producción de RETMN con respecto al vehículo (Fig. 6), a las 24 h y con 30 y 60 m<sup>3</sup>/kg de peso de PM10, que no se halló con concentraciones mayores o menores a 48 ó a 72 h, lo que mostró la dificultad para estimar las concentraciones efectivas dentro del evento

buscado. La ausencia de micronúcleos en concentraciones mayores posiblemente se debe al efecto citotóxico que no permite observar a las células dañadas. La frecuencia basal de RETMN en este laboratorio es de  $1.52 \times 10^{-3}$  en 56 000 células. Para determinar el tiempo óptimo de muestreo se totalizaron los resultados según describe Hayashi et al. (1984), notando que las frecuencias de RET y RETMN disminuyen de manera directa con el tiempo, debido posiblemente a la acción citotóxica de la mezcla (Fig. 7). Cuando se especificó por concentraciones (Tabla V), se notó que a los 30 y 60  $m^3/kg$  de peso y a las 24 h, las frecuencias de RETMN, son del orden del testigo positivo y significativos estadísticamente del testigo negativo ( $p < 0.05$ ), es decir son concentraciones genotóxicas que no llegan a ser citotóxicas. Con base en esto se decidió probar los extractos PM10 y PST con mayor cantidad de animales a concentraciones de 30, 60 y 90  $m^3/kg$  de peso, a las 24 h, a pesar de que, según Mavourin et al. (1990) los RETMN aparecen por primera vez en sangre periférica 24 h después que en médula ósea (MO). El daño inducido al final de la fase de síntesis ó mas temprano se verá reflejado solo en los EPCMN en poco mas de 30 h (Schmid et al. 1976), las células que al principio del tratamiento ya pasaron la fase de síntesis y que fueron dañadas en  $G_2$  o en la mitosis, son capaces de alcanzar el estado de NC en ese tiempo; sin embargo, la cuenta de NCMN difiere de la de EPCMN que se incrementa de manera proporcional a la concentración empleada Cole et al. (1979), obtienen EPCMN con sustancias aneugénicas y clastogénicas después de 6 a 10 h de postratamiento, respectivamente. Vanparys et al. (1992) mencionan que es más probable que venenos del huso y clastógenos o sus metabolitos reactivos puedan ser detectados en MO, 24 y 48 h después de la administración. Los resultados de este trabajo plantean la posibilidad de que

los RETMN aparezcan al mismo tiempo en MO y en sangre periférica como lo sugieren Hayashi et al. (1990) y posiblemente el daño celular acorta el ciclo o provoca la aparición prematura los RETMN en la sangre periférica, por esta razón la cuenta reticulocitaria es una manera simple y directa de saber la tasa de producción eritroide y las formas inmaduras en sangre periférica indican citotoxicidad en MO, sangrado o bien terapia adecuada para anemia (Williams et al 1972).

Los NC persisten en la circulación periférica alrededor de un mes (Mavourin et al. 1990) siendo su vida media de 20 a 45 días (Schlegel y MacGregor 1982). Los RET permanecen por 24 h en sangre periférica antes de madurar.

Los NCMN además de su utilidad para reconocer la presencia de artefactos, ayudan a desentrañar el mecanismo de acción de las sustancias ensayadas, ya que el tiempo que transcurre de la fase de síntesis hasta el fin de la mitosis, la expulsión del núcleo y la maduración del proeritroblasto a NC, excede ligeramente las 30 h. La incidencia de más de un NCMN por mil RET, indica un efecto sobre las células que pasaron la fase de síntesis (Maier y Schmid 1976, Schmid 1976) (Fig. 2). La reducción de RET a menos del 1% es indicadora de toxicidad excesiva en MO (von Ledebur y Schmid 1973, Mavourin et al. 1990).

Los resultados del tratamiento con PM10 y concentraciones de 30, 60 y 90 m<sup>3</sup>/kg de peso se pueden apreciar en la tabla VI y figura 8, notándose un ligero aumento de RET en 30 y 60 m<sup>3</sup>/kg de peso, no así en 90 m<sup>3</sup>/kg. de peso. La frecuencia de RETMN fue significativamente alta en las tres concentraciones probadas existiendo una mayor genotoxicidad con 60 m<sup>3</sup>/kg de peso con PM10.

Con los extractos de PST, se produce mayor citotoxicidad a los 60 m<sup>3</sup>/kg de peso ya que el valor normal es de 2.37 a 5.33 % en el laboratorio. La frecuencia de RETMN fue significativamente alta en las tres concentraciones. Es posible considerar que el material orgánico obtenido de PM10 y PST es genotóxico ( $p < 0.05$ , según la prueba de Kastenbaum-Bowman) y que es mas evidente en la fracción PM10 a los 60 m<sup>3</sup>/kg de peso. Asimismo, los extractos de PST son mas citotóxicos que los de PM10 sobre todo a los 60 m<sup>3</sup>/kg de peso y ambas actúan de manera rápida acelerando la formación de RETMN ya que a las 24 h se encontró la respuesta en sangre periférica y no a las 48 ó 72 h como lo describen algunos autores (Schmid 1976, CSGMT 1992, Vanparys et al. 1992), (Figs. 8 y 9)

La presencia de carcinógenos y mutágenos químicos en el aire urbano difiere de acuerdo con el origen de los contaminantes y varios de ellos se producen con la transformación secundaria por las reacciones propias de su entorno (Atkinson y Arey 1994, Möller et al. 1994, Crutzen 1996). Los efectos mutagénicos es posible que se induzcan en distintos organismos incluyendo al ser humano expuesto y especialmente en los más susceptibles. Es muy importante la identificación de mutágenos ambientales y la determinación del riesgo de exposición a las mezclas complejas mediante diversos sistemas ya que es particularmente difícil detectar sustancias que causan toxicidad a largo plazo. Si bien los estudios epidemiológicos son muy empleados para considerar el daño, tienen baja potencia, ya que se requiere un incremento importante de la incidencia o tasa de morbi-mortalidad para poder mostrar diferencias estadísticas, y aún así se necesita de un aumento mayor para estimar la magnitud de tal efecto. Así que en situaciones en donde no hay una exposición elevada o cuando los tiempos de latencia son demasiado largos (de

años o décadas como en las leucemias) el riesgo a bajos niveles de exposición se puede estimar mediante las pruebas de mutagenicidad y carcinogenicidad así como a través de la prueba de micronúcleos, aún cuando el problema se presenta al traducir las observaciones al riesgo en humanos. Para establecer el posible daño mas que hacer una estimación directa del riesgo en humanos a niveles bajos de exposición, Gold et al. (1992) recomiendan la aplicación de un índice de exposición humana/potencia en roedores, que es muy útil para regular y generar el concepto de riesgo relativo (Möller et al. 1994, Törnqvist y Ehrenberg 1994).

## CONCLUSIONES

1. Los ratones CD-1, responden positivamente a los extractos atmosféricos de PM10 y PST, elevando la frecuencia de RETMN
2. El extracto de PM10 generó MN 24 h después del tratamiento.
3. Es probable que al metabolizar los componentes de PM10 se produzcan también efectos citotóxicos a las 48 y 72 h
4. Los extractos de PM10 y PST se comportan como lo hacen los mutagenos indirectos probados ya que a las 24 h aparecen los efectos citotóxicos y genotóxicos
5. Los extractos PM10 son mas genotóxicos que los de PST.
6. Las PST son mas citotóxicas que las PM10
7. Los extractos orgánicos de PM10 y PST son genotóxicos en la prueba de micronúcleos de sangre periférica de ratón.

## REFERENCIAS

- Alink F. M., Smit H. A., van Houdt J. J., van Kolkamn J. R. y Boleij J. S. M. (1983). Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations. *Mutat. Res.* 116, 21-34
- Atkinson R y Arey J. (1994). Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 4), 117-126.
- Bowes III S.M., Frank R y Swift D L. (1990). The head dome: a simplified method for human exposure to inhaled air pollutants. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 51, 257-260.
- Breyse P.N. y Swift D.L. (1990). Inhability of large particules into the human nasal passage: *in vivo* studies in still air. *Aerosol Sci. Technol* 13, 459-464.
- Bruce W.R (1979). The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella* and sperm abnormality assays. *Can. J. Genet. Cytol.* 21, 319-334.
- Cautreels W y van Cauwenberghe K. (1976). Extraction of organic compounds from airborne particulate matter. *Water, Air, Soil Pollut.* 6, 103-110.
- CGRUPE (Coordinación General de Reordenación Urbana y Protección Ecológica ) (1991). Reporte mensual sobre la calidad del aire en la ciudad de México (Septiembre ) México, D.F., 24 p.
- Cole R.J., Taylor N. A , Cole J. y Arlett C.F. (1979). Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *Nature (London)* 277, 317-318.
- Countryman P I y Heddle J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321-332.
- Chamberlain A. (1983). Effect or airborne lead on blood lead. *Atmos. Environ.* 11, 677-692
- Chrisp C.E. y Fisher G.L. (1990). Mutagenicity of airborne particles. *Mutat. Res.* 76, 143-164.
- CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1986). Sex difference in the micronucleus test *Mutat. Res.* 172, 151-163.
- CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1988). Strain difference in the micronucleus test. *Mutat. Res.* 204, 307-316.

- CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining. The summary report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat. Res.* 278, 83-98.
- Crittenden B D y Long R. (1976). The mechanisms of formation of polynuclear aromatic compounds in combustion systems. En: *Carcinogenesis: a comprehensive survey. Polynuclear aromatic hydrocarbons. Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis.* (M.A. Freudenthal y P.W. Jones, Eds.) Raven, Nueva York, Vol 1, pp 209-223.
- Crutzen J.P (1996). My life with O<sub>3</sub>, NO<sub>x</sub> and other YZO<sub>x</sub> compounds (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed., Engl.* 35, 1758-1777.
- Delgado-Rodríguez A.(1993). Genotoxicidad producida por aeropartículas en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., 61 p.
- DeMarini D.M., (1994). Induction of mutation spectra by complex mixtures: Approaches, problems, and possibilities. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 4), 127-130.
- de Raat W.K. (1983). Genotoxicity of aerosol extracts. Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations. *Mutat. Res.* 116, 47-63.
- Esmen N. y Corn M. (1971). Residence time of particulates in urban air. *Atmos. Environ.* 5, 571-578.
- Finlayson-Pitts B.J. y Pitts J.N. (1986). *Atmospheric Chemistry.* Wiley, Nueva York.
- Fuentes Gea V. (1991). La contaminación por partículas suspendidas en la atmósfera del Valle de Mexico. *Ciencias* 22, 45-49.
- Gollapudi B. y Kamra O P. (1978). Application of a simple Giemsa staining method in the micronucleus test. *Mutat. Res.* 64, 45-45.
- Goetz P., Sram R. J. y Dohnaldva J. (1975). Relationship between experimental results in mammals and man. I. Cytogenetic analysis of bone marrow injury induced by single dose of cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 31, 247-254.
- Gold L.S., Slone T. H., Stern B. R., Manley N. B. y Ames B. N. (1992). Rodent carcinogens: setting priorities. *Science* 258, 261-265.
- Gómez-Arroyo S., Baiza A.M., López G. y Villalobos-Pietrini R. (1985). A comparative study of the cytogenetic effects of the insecticides



- heptachlor, malathion and methyl parathion in *Vicia faba*. Contam. Ambient. 1, 7-16
- Gordon R.J (1974). Solvent selection in extraction of airborne particulate matter. Atmos. Environ. 8, 189-191.
- Grosjean D (1975). Solvent extraction and organic carbon determination in atmospheric particulate matter: the organic extraction-organic carbon analyzer (OE-OCA) technique. Analyt. Chem. 47, 797-805.
- Ham W. A. (1969). *Tratado de histología. Glóbulos rojos* (eritrocitos o hematies). Ed. Interamericana. México D.F., 294 p.
- Harper B.L., Ramanujam V.M.S y Legator M.S. (1989). Micronucleus formation by benzene, cyclophosphamide, benzo(a)pyrene, and benzidine in male, female, pregnant female, and fetal mice. Teratogen Carcinogen. Mutagen. 9, 239-252.
- Hart J.W. y Hartley-Asp. B. (1983). Induction of micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis. Mutat. Res. 120, 127-132.
- Hatanaka Y., Kitagawa Y., Toyoda Y., Kawata T., Ando N., Kawabata Y., Iwai M., y Arimura H. (1992). Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood reticulocytes. Mutat. Res. 278, 99-101
- Hayashi M., Sofuni T. e Ishidate Jr. M. (1984). A pilot experiment for the micronucleus test. The multi-sampling multi-dose levels method. Mutat. Res. 141, 165-169.
- Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T. e Ishidate M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat. Res. 245, 245-249.
- Heddle J.A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosome damage. Mutat. Res. 18, 187-190.
- Heddle J A. y Carrano A.V. (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by irradiation evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. Mutat. Res. 44, 63-69.
- Heddle J. A., Lue C.B., Saunders F. y Benz D. (1978). Sensitivity to five mutagens in Fanconi's Anemia as measured by the micronucleus method Cancer Res. 38, 2983-2988.
- Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J.T., Newell G.W. y Salamone M. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. Mutat. Res. 123, 61-118.

- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P. y MacGregor J.T. (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 277-291.
- Hill H.H., Chan K.W. y Karasek F.W. (1977). Extraction of organic compounds from airborne particulate matter for gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr.* 131, 245-252.
- Hughes T.J., Pellizzari E., Little L., Sparacino C. y Kolber A. (1980). Ambient air pollutants: collection, chemical characterization and mutagenicity testing. *Mutat. Res.* 76, 51-83
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987). Overall evaluation of carcinogenicity. Evaluation of carcinogenic risk to humans. Suppl.7 An updating of IARC monographs. Vol. 1-42, 440 p.
- Jungers R.H. y Lewtas J. (1980). Airborne particle collection and extraction methods applicable to genetic bioassays. En: *Genotoxic effects of airborne agents*. (R.R. Tice, D. Costa y K. Schaich, Eds.). Plenum Press, Nueva York, 35-47.
- Kastenbaum M.A. y Bowman K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549.
- Krogh-Jensen M. (1977). Cytogenetic findings in pernicious anaemia. Comparison between results obtained with chromosome studies and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 45, 249-252.
- Krogh-Jensen M. y Nyfors A. (1979). Cytogenetic effect of methotrexate on human cells in vivo. Comparison between results obtained by chromosome studies on bone-marrow cells and blood lymphocytes and by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 64, 339-343.
- Legorreta J. (1991). La grave contaminación atmosférica de la Ciudad de México. *Ciencias* 22, 55-61.
- Linnainmaa K., Meretoja T., Sorsa M. y Vainid H. (1978). Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide. *Mutat. Res.* 58, 277-286.
- MacGregor J.T., Wehr C.M. y Gould D.H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen.* 2, 509-514.
- Mackey E.B. y MacGregor T.J. (1979). The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutat. Res.* 64, 195-204.
- Maier P. y Schmid W. (1976). Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test *Mutat. Res.* 40, 325-338.
- Manahan S.E. (1984). *Environmental chemistry*. Willard, Boston.

- Mason G.G.F.(1994). Dioxin-receptor ligands in urban air and vehicle exhaust. *Environ. Health. Perspect.* 102 (Suppl 4), 111-116
- Matter B. y Schmid W. (1971). Trenimon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 12, 417-425
- Mavourin K.H., Blakey D.H, Cimino M.C., Salamone M.F. y Heddle J.A. (1990). The *m vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S Enviromental Protection Agency. Gene-Tox Program *Mutat. Res.* 239, 29-80.
- Mersch-Sundermann V. , Rosenkranz H:S. y Klopman G. (1992). Structural basis of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutagenesis* 7, 211-218
- Möller L., Schuetzle D.y Herman A. (1994). Future research needs associated with the assessment of potential human health risks from exposure to toxic ambient air pollutants. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 4), 193-210.
- Pitts J.N., van Cauwenberghe K.A., Grosjean D., Schmid J.P. y Fitz D.R. (1978). Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science* 202, 515-519.
- Quadri G. y Sanchez L.R. (1992). *La ciudad de México y la contaminación atmosférica*. Limusa, México.
- Salamone M., Heddle E.J., Stuart E. y Katz M (1980). Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents Mitomycin C, ciclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.* 74, 247-356.
- Saltzman B.E., Cholak J., Schafer L.J., Yeager D.W., Meiners B.G. y Suetlik J. (1985). Concentrations of six metals in the air of eight cities. *Environ. Sci. Technol.* 19, 329-333.
- Sato S., Kitajima H., Konishi S., Takizawa H. e Inui N (1987). Mouse strain differences in the induction of micronuclei by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 197, 185-189
- Sato S., Takizawa H. e Inui N. (1990). A comparison of micronucleus induction in 3 mouse strains with representative clastogens. *Toxicology* 52, 215-220.
- Schlegel R.J. y MacGregor J.T. (1982). The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes; detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutat. Res.* 104, 365-369.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.

- Schmid W.(1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: *Chemical Mutagens Principles and methods for their detection* (A. Hollaender, Ed.). Vol. 4, Plenum Press. Nueva York, pp 31-53.
- SEDUE (Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecologia)(1986). Informe sobre el estado del medio ambiente en México, D.F.
- Sharma C B.R. y Sahur K. (1977). Cytogenetic hazards from agricultural chemicals. 1. A preliminar study on the responses of root meristems to exotoxin from *Bacillus churingiensis* a constituent of a microbial insecticide thuricide. *Mutat. Res.* 46, 19-26.
- Simula A. P. y Priestly B. G. (1991). Influence of vegetable oil vehicles on bone-marrow, proliferation in mouse micronucleus test. *Mutat. Res.* 261, 83-84.
- Sorensen J.P. y Krogh-Jensen M. (1981). Cytogenetic studies in patients treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Mutat. Res.* 89, 91-94.
- Talcott R. y Harger W. (1979). Mutagenic activity of aerosol size fractions. EPA 600/3-79-032.
- Tokiwa H., Monta K., Takeyoshi H., Takahashi K. y Onishi Y. (1977). Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants. *Mutat. Res.* 48, 237-248.
- Tokiwa H., Kitamori S., Takahashi K. y Ohnishi Y. (1980). Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates. *Mutat. Res.* 77, 99-108.
- Tornqvist M. y Ehrenberg L. (1994). On cancer risk estimation of urban air pollution. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 4), 173-181.
- Trzos R. J., Petzold G. L. Brunden M. N. y Swenberg J. A. (1978). The evaluation of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutat. Res.* 58, 79-86.
- van Houdt J.J., Alink G.M. y Boleij J.S.M. (1987). Mutagenicity of airborne particles related to meteorological and air pollution parameters. *Sci. Total Environ.* 61, 23-36.
- Vanparys P., Deknudt G., Vermeiren F., Sysmans M. y Marsboom R. (1992). Sampling times in micronucleus testing. *Mutat. Res.* 282, 191-196.
- Villalobos-Pietrini R., Blanco S. y Gómez-Arroyo S. (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmos. Environ.* 29, 517-524.
- von Ledebur M. y Schmid W. (1973). The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat. Res.* 19, 109-117.

- Williams W.J, Beuteler. E., Errsleu A. J. y Rundles R. W. (1972).  
*Hematology*. Mc Graw Hill. Nueva York, 482 p.
- Yamamoto K. y Kikuchi Y. (1980). A comparison of diameters of  
micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.*  
71. 127-131

## TABLA I.

ESTACIONES DE LA COMISIÓN METROPOLITANA PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL (ANTES SEDUE Y SEDESOL) QUE FORMAN PARTE DE LA RED DE CALIDAD DEL AIRE EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MEXICO

No. Estación	No. Estación
1. Lagunilla	14. Pedregal
2. Vallejo	15. Cerro de la estrella
3. Santa Úrsula	16. Plateros
4. Tacuba	17. Hangares
5. ENEP Acatlán	18. UAM Iztapalapa
6. Los Laureles	19. Aragón
7. La Presa	20. Netzahualcoyotl
8. La Villa	21. Instituto Mexicano del Petróleo
9. San Agustín	22. Benito Juárez
10. Azcapotzalco	23. Taxqueña
11. Tlalnepantla	24. Insurgentes
12. Xalostoc	25. Cuitláhuac
13. Merced	

**TABLA II.**

**HAP INCLUIDOS EN EL ESTANDAR EXTERNO DEL ANALISIS DE  
CROMATOGRAFIA DE GASES**

COMPUESTO	FORMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	PUNTO DE EBULLICION (0°C)
ACENAFTENO	C12H10	154.21	279
FLUORENO	C13H10	166	293
FENANTRENO	C14H10	178	338.4
ANTRACENO	C14H10	178	340
FLUORANTENO	C16H10	202	383.5
PIRENO	C16H10	202	393.5
CRISENO	C18H12	228	441
BENZO (A) ANTRACENO	C18H12	228	437.5
BENZO (B) FLUORANTENO	C20H12	252	481.2
BENZO (K) FLUORANTENO	C20H12	252	481
BENZO (A) PIRENO	C20H12	252	495.5

### TABLA III.

#### HAP ANALIZADOS EN MUESTRAS DE AIRE DE PM10 Y PST DE LA ESTACION MERCED

COMPUESTO	SITIO Y FECHA DE MUESTREO	
	M020891	M020891
	PM10	PST
ACENAFTENO	-	-
FLUORENO	-	+
FENANTRENO	+	-
ANTRACENO	-	-
FLUORANTENO	-	-
PIRENO	-	+
CRISENO	+	-
BENZO (A) ANTRACENO	-	-
BENZO (B) FLUORANTENO	+	-
BENZO (K) FLUORANTENO	-	-
BENZO (A) PIRENO	+	-

- no detectado, + detectado, M Merced



TABLA IV

RESULTADOS DEL TRATAMIENTO PRELIMINAR CON PM10

CONCENTRACIONES m <sup>3</sup> /kg	TIEMPOS MUESTRA	% RET a	% NCMN a	NO RETMN b	FRECUENCIA X 10 <sup>-3</sup>
0 ml	24	6.9	0.050	6	1.5
	48	2.7	0.075	9	2.25
	72	3.4	0.100	8	2.0
7.5	24	6.4	0.750	9	2.25
	48	3.3	0	6	1.5
	72	4.6	0.250	7	1.75
15	24	5.0	0.075	11	2.75
	48	4.0	0.100	5	1.25
	72	3.1	0	4	1
30*	24	3.9	0.225	17	4.25
	48	3.1	0.050	8	2
	72	2.6	0.075	7	1.75
60*	24	4.1	0.200	18	4.5
	48	2.2	0	12	3
	72	1.5	0.050	4	1
120	24	3.3	0	10	2.5
	48	3.1	0.050	6	1.5
	72	1.7	0.075	7	1.75
240	24	3.8	0.120	10	2.5
	48	2.0	0.050	9	2.25
	72	1.9	0.025	3	0.8
60 mg/kg <sup>□</sup>	24	5.4	0.175	21	5.25
	48	4.0	0.075	4	1
	72	3.9	0.050	9	2.25

a= En 2000 células contadas por concentración y tiempo, b= en 4000 células contadas por concentración y tiempo \* = significativa estadísticamente (p< 0.05), según la prueba de Kastenbaum-Bowman □= ciclofosfamida

TABLA V

CANTIDAD DE RETMN\* POSTRATAMIENTO. CON LA FRACCIÓN ORGANICA EXTRAÍDA DE PM10

CONCENTRACION m <sup>3</sup> /kg	24 h	48 h	72 h	Total
0	6	9	8	23
7.5	9	6	7	22
15	11	5	4	20
30	17	8	7	32
60	18	12	4	34
120	10	6	7	23
240	10	9	3	22
Totales	75	46	32	153
60mg□	21	4	9	34

PORCENTAJE DE RET\*\* POSTRATAMIENTO CON LA FRACCIÓN ORGÁNICA EXTRAÍDA DE PM10

CONCENTRACION m <sup>3</sup> /Kg	24 h	48 h	72 h	Total
0	6.9	2.7	3.4	13
7.5	6.4	3.3	4.6	14.3
15	5.0	4.0	3.1	12.1
30	3.9	3.1	2.6	9.6
60	4.1	2.2	1.5	7.8
120	3.3	3.1	1.7	8.1
240	3.8	2.0	1.95	7.8
Total	26.5	17.7	15.5	59.7
60 mg□	5.4	4.0	3.9	13.3

\*4000 RETMN observados por concentración, \*\*RET en 1000 NC observados por concentración, □ ciclofosfámidas

**TABLA VI**

**RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS FRACCIONES ORGÁNICAS ASOCIADAS A PM10 Y PST**

**PM10**

Concentración m <sup>3</sup> /kg	Cantidad de Animales	% RET	% NCMN	RETMN x10 <sup>-3</sup>
0	8	2.95	0.05	0.4
30	9	3.94	0.03	2.4
60	9	3.37	0.02	4.1
90	9	2.46	0.07	2.6
100 mg/kg $\varnothing$	5	2.64	0.02	3.0
60 mg/kg $\square$	6	1.83	0.11	4.0

**PST**

Concentración m <sup>3</sup> /kg	Cantidad de Animales	% RET	% NCMN	RETMN x10 <sup>-3</sup>
0	8	3.45	0	0.4
30	10	2.51	0.04	2.5
60	10	1.57	0.02	2.0
90	10	2.15	0.12	2.6
100 mg/kg $\varnothing$	9	1.79	0	2.4
60 mg/kg $\square$	7	2.41	0.17	6.4

$\varnothing$  = Benzo(a)pireno

$\square$  = Ciclofosfamida

TABLA VII

RESPUESTA A LA FRACCION ORGÁNICA EXTRAÍDA DE PM10 Y DE PST EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRUEBA

SISTEMA	Concentración	RESPUESTA	p =
AMES			
S/S9	67.9 m <sup>3</sup> /ml	MUTAGÉNICO	< 0.05
C/S9	Idem	MUTAGÉNICO	< 0.01
DROSOPHILA MELANOGASTER			
E	9.76 m <sup>3</sup> /ml	ACTIVO PST>PM10	
BE	Idem.	MUTAGENICO PM10>PST	
RATON			
	30, 60, 90 m <sup>3</sup> /kg	CITOTÓXICO PST>PM10	< 0.05
	30, 60, 90 m <sup>3</sup> /kg	MICRONUCLEOS PM10>PST	< 0.05

TABLA VIII

FRECUENCIAS BASALES ENCONTRADAS EN EL LABORATORIO DE GENETICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UAP

FRECUENCIA BASAL DE RETICULOCITOS 3.85% ± 1.48

Relación = 0.0385 (0.0533 - 0.0237) RET = 2-5%

RETMN (basal en 56,000 cels.)= 1.52 x10<sup>-3</sup> RETMN =1.5%

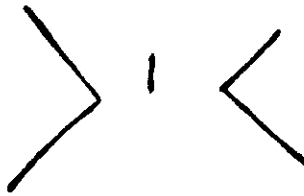
NCMN (basal en 28,000 cels.)=0.32 x10<sup>-3</sup> NCMN= 0.3%

FRECUENCIAS DESCRITAS POR CSGMT (1992)

RETMN = 1.45 ± 1.24 n = 1179



Fragmento acéntrico



Retraso en el movimiento cromosómico



Cromosomas con el centrómero inactivado



Figura 1. Diversas vías de producción de micronúcleos

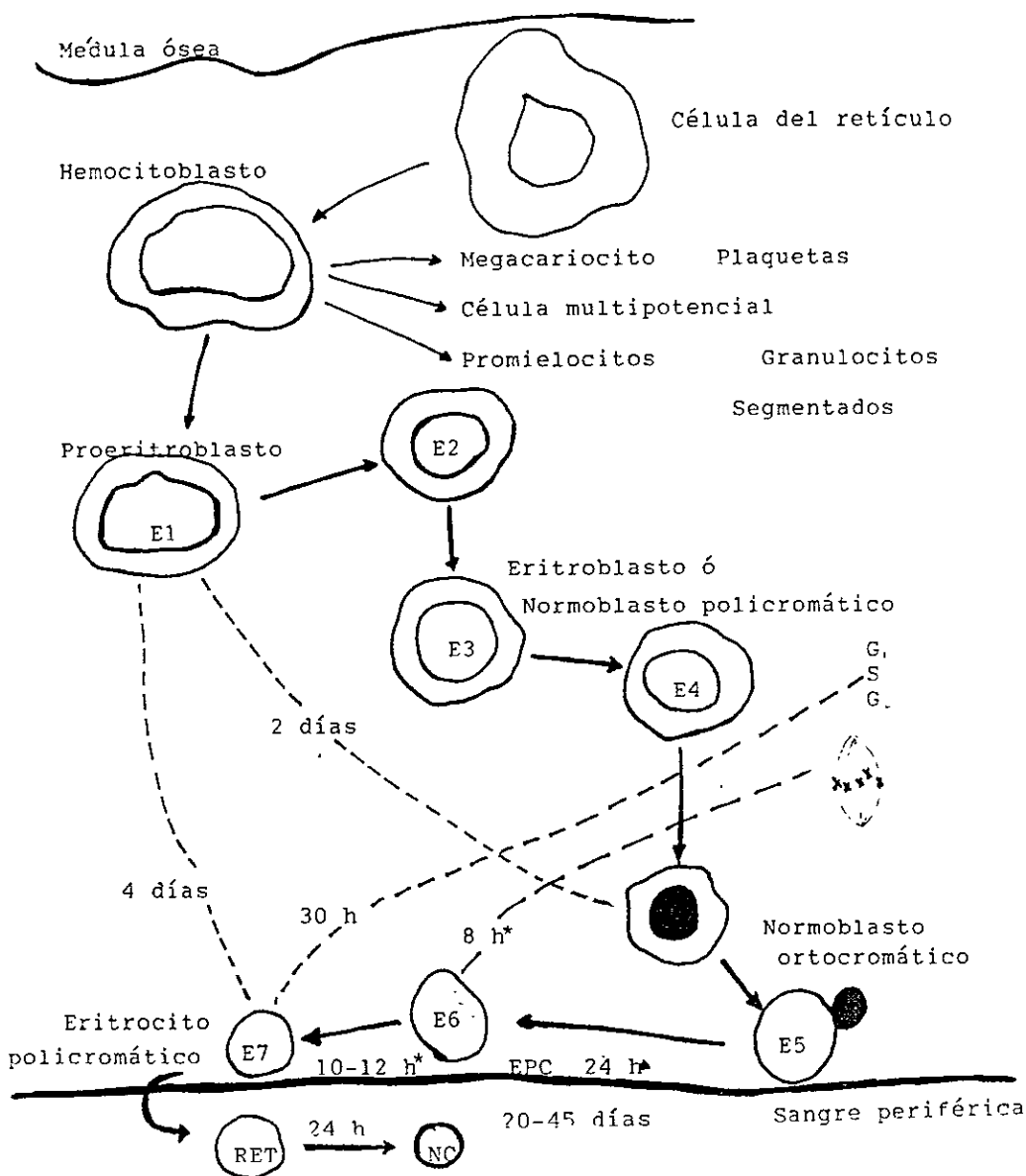


Figura 2. Esquema que ilustra la duración de las células eritropoyéticas del ratón ( Bruce 1979, \* Salamone et al. 1980, + Schlegel y MacGregor 1982)

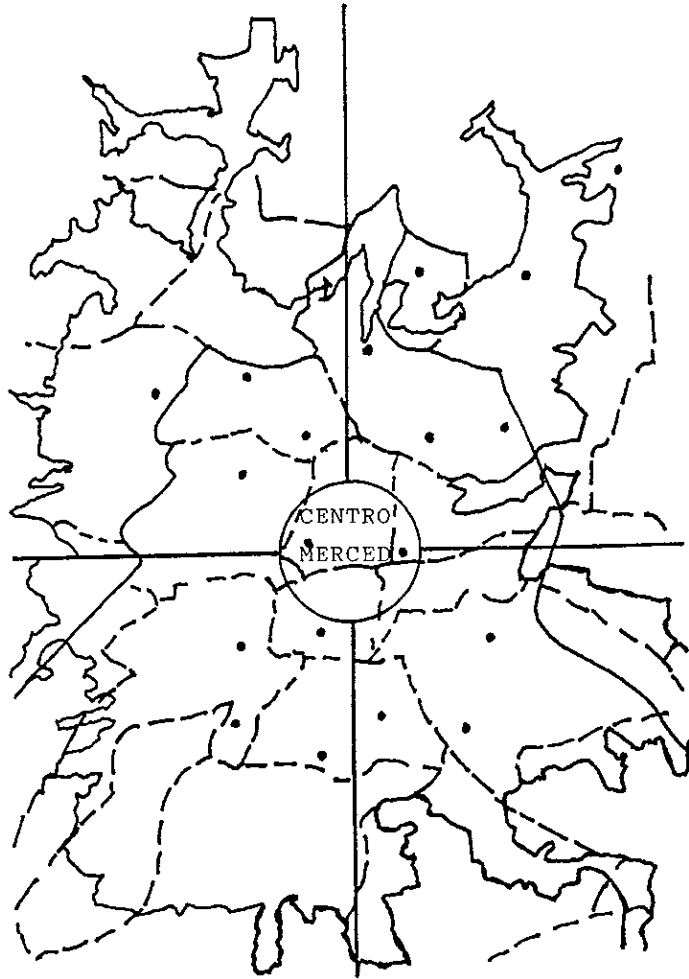


Figura 3. Ubicación de las estaciones de SEDESOL que conforman la red de calidad del aire en la zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM).

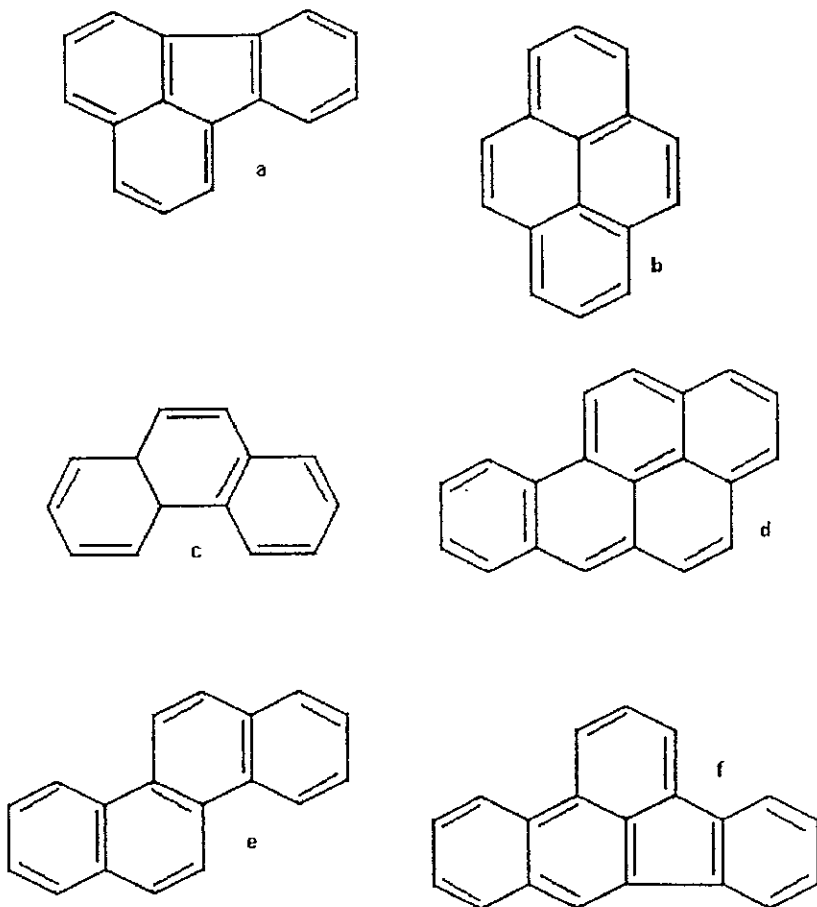


Figura 4. Fórmulas estructurales de los HAP encontrados en las PST Y PM10  
 a=fluoreno, b=pireno, c=fenantreno, d=benzo(a)pireno  
 e=criseno, f=benzo(b)fluoranteno.



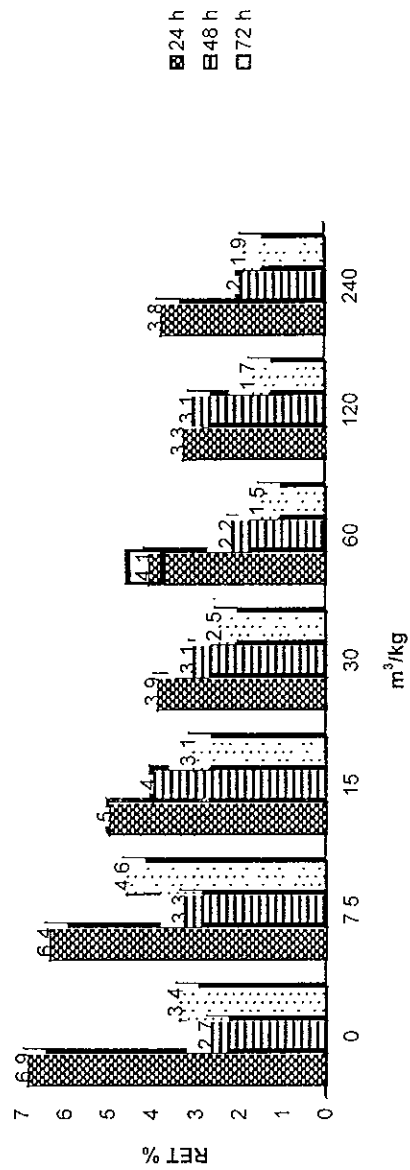


Fig. 5. Porcentaje de RET en el postratamiento preliminar con PM10

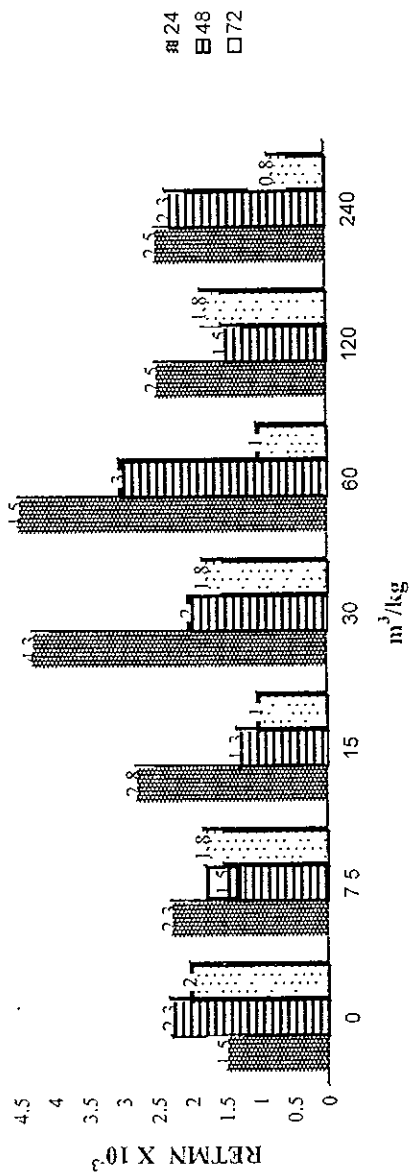


Fig. 6. Frecuencia de RETMN en el tratamiento preliminar con PM10.

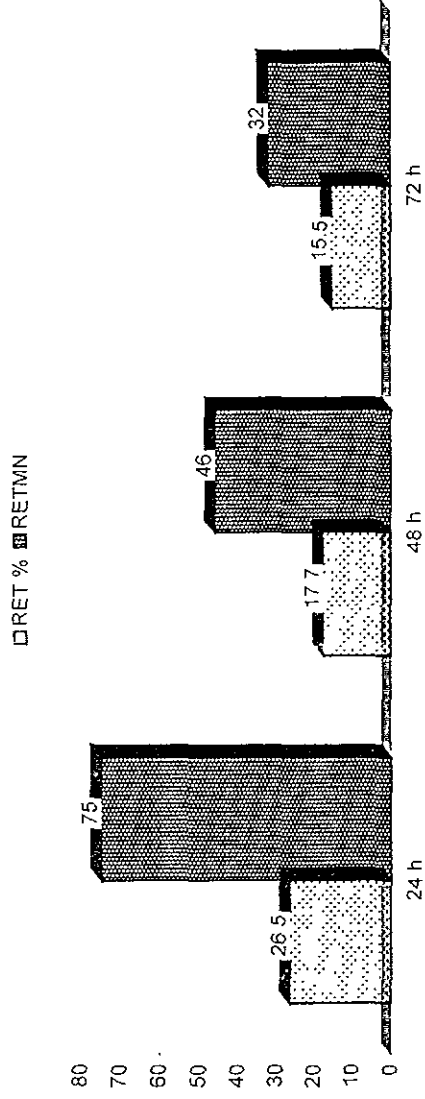


Fig. 7. Porcentaje de RET y cantidad de RETMN en tratamiento preliminar con PM10

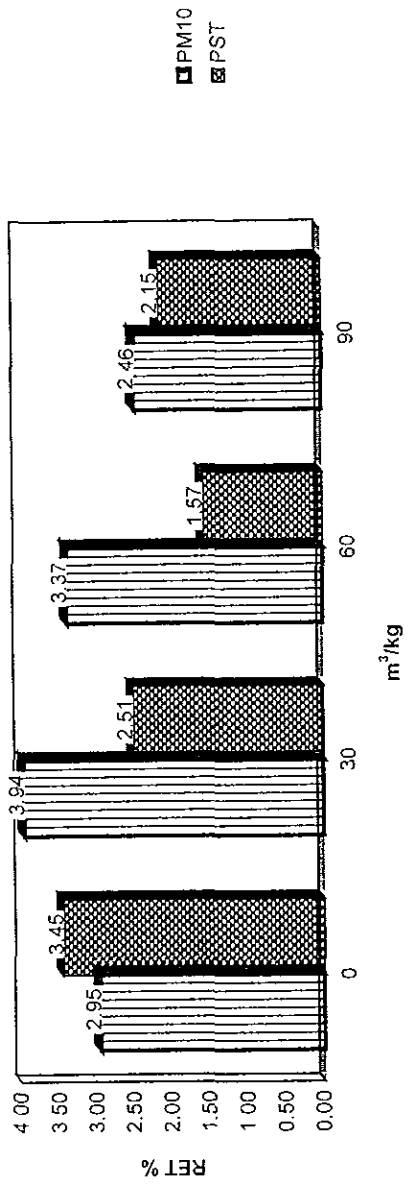


Fig. 8. Porcentaje de RET en el postratamiento con PM10 y PST

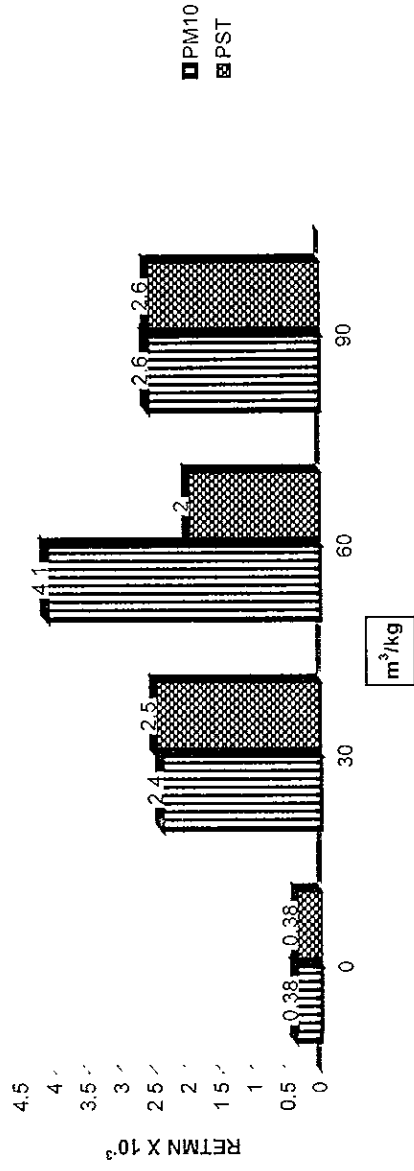


Fig. 9. Frecuencia de RETMN en el postratamiento con PM10 y PST