



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**Daño al DNA inducido por PM_{10} de la
Ciudad de México con diferente
contenido de metales.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
PRESENTA

FLOR MARÍA MARTÍNEZ ROMERO

Directora de tesis: Dra. Claudia María García Cuellar.



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.

México, D. F.

Junio,

2006

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a la **Dra. Claudia María García Cuellar** por todo el apoyo recibido durante la realización de la Tesis.

Al Dr. Álvaro Osornio Vargas por su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A la M. en C. Yesennia Sánchez Pérez por su valiosa colaboración y apoyo en este escrito.

Quiero agradecer a los miembros del jurado que me han apoyado durante la realización del escrito y muy en especial a la **Dra. Irma Rosas** por su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

Al **Instituto Nacional de Cancerología** por brindarme sus instalaciones y equipo, donde se llevo a cabo el trabajo experimental de esta tesis.

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de la beca de Maestría número de registro 167197; (2001-2003). Al programa UCLA-Fogarty por la beca otorgada durante julio 2003- julio 2004 para la realización de

una estancia en el Center for Occupation and Environmental Health, Los Angeles California (UCLA). Bajo la supervisión del Dr. Robert Schiestl.

DEDICATORIA

A mi madre por todo su apoyo incondicional y por ser el motor de mi vida.

A mis hermanas Carmen, Zulma, Paty y Alma por darme su confianza y cariño.

A mis compañeros y amigos que siempre me han apoyado: Víctor Torres,
Yazmín Segura, Raúl Quintana, Inés Vázquez, Alejandro Cabrera, Víctor Dávila
y Geraldine Flores

A Luis Serrano García por su amor y apoyo.

A la Dra. Kanan Patel-Coleman por brindarme su amistad y apoyo durante mi estancia en Los Angeles.

A Yolanda Monzón Herrera y Herguin Arellano Cuevas por brindarme su apoyo en los momentos difíciles

INDICE

Lista de abreviaturas	8
Abstract	10
Resumen	11
Introducción	12
Características geográficas y atmosféricas de la Ciudad de México	12
a) Composición de las aeropartículas	14
b) PM ₁₀ y estudios epidemiológicos	16
Estrés oxidante	17
Radicales libres y especies reactivas de oxígeno	20
Principales especies reactivas de oxígeno	22
Oxígeno singulete	22
Anión superóxido	22
Peróxido de hidrógeno	23
Radical hidroxilo	23
Modelos de estudio	24
Daño a DNA por PM's	26
Justificación	29
Hipótesis	32
Objetivo General	32
Objetivos particulares	32
Material y Métodos	33

a) Área de Estudio	33
b) Colecta de las aeropartículas	34
c) Obtención del material particulado PM ₁₀	35
d) Cultivo celular de la línea Balb-C 3T3	35
e) Extracción y cuantificación del DNA de la línea celular Balb-C 3T3	35
f) Exposición de DNA desnudo de células Balb-C 3T3 a las PM ₁₀	37
g) Evaluación del daño al DNA mediante el Ensayo Cometa	37
h) Determinación de 8-oxo-2´deoxiguanosina (8-oxo-dG)	39
Análisis Estadístico	40
Resultados	41
Daño a DNA desnudo inducido por las PM ₁₀ de la Ciudad de México	41
Daño a DNA de células Balb-C 3T3 inducido por PM ₁₀ de la Ciudad de México (Ensayo Cometa)	43
Oxidación de DNA (8-oxo-dG) por PM ₁₀ de la Ciudad de México	44
Discusión	46
Conclusión	50
Apéndice	51
Bibliografía	52

LISTA DE ABREVIATURAS.

AP	Fosfatasa alcalina
ATCC	American Type Culture Collection
C	Centro
DNA	Acido desoxirribonucléico
dG	Desoxiguanina
8-oxo-dG	8-oxo- 2´deoxiguanosina
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DTPA	Dietilen-triamino-penta-acético
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acético
ERO´s	Especies reactivas de oxígeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
KCl	Cloruro de Potasio
LPS	Lipopolisacáridos
PBS	Amortiguador de fosfatos
PDE	Fosfodiesterasa
PM	Material particulado
PM ₁₀	Material particulado menor o igual a 10 µm
PM _{2.5}	Material particulado menor o igual a 2.5 µm
PST	Partículas suspendidas totales
N	Norte

NaCl	Cloruro de Sodio
S	Sur
SOD	Superóxido dismutasa
TBE	Tris-borato-EDTA
ZMCM	Zona Metropolitana de la Ciudad de México

ABSTRACT

Sociopolitical and geographical condition of Mexico City has fomented an increase in the level of airborne pollutants. Exposure to airborne particles of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ has been associated with an increase in the morbidity and mortality in the inhabitants of the polluted cities

Little evidence of the mechanisms exists as to the composition of the associated particles the stress oxidation. In the present study the damage was evaluated with DNA naked of the cells Balb-C 3T3 to use the assay comet and the formation of adducts of 8-oxo-dG in cells exposed to PM_{10} the induce a differential effect where the North particles produced greater damage, followed by the Center and the South, they varied on the according collection zone and the metals content.

The results show that there is an association between the comet assay and the degradation of DNA, degradation was observed in the DNA from 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the case of North, Central 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and South from 80 and 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In respect to the damage of DNA evaluated by the comet assay a differential effect is shown to concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As for the formation of adducts this presents a relationship completely inverse of one of what was observed in comets.

The results indicate an association among the toxic effects observed and metals content found in the samples, what suggests to us that composition plays an important role in the effects of the particulate.

RESUMEN

Las condiciones geográficas y sociopolíticas de la Ciudad de México han propiciado un incremento en los niveles de contaminación afectando la calidad del aire. La exposición a las aeropartículas con un diámetro $\leq 10 \mu\text{m}$ se ha asociado con un aumento en la morbilidad y mortalidad en los habitantes de las ciudades contaminadas. Existe poca evidencia de los mecanismos involucrados y de la composición de las partículas asociadas con el estrés oxidante. En el presente estudio se evaluó el daño al DNA desnudo de las células Balb-C 3T3 utilizando el ensayo cometa y la formación de aductos de 8-oxo-dG en células expuestas a PM_{10} colectadas en el Norte, Centro y Sur de la Ciudad de México. Se encontró que las PM_{10} inducen un efecto diferencial en donde las partículas del Norte producen mayor daño, seguido del Centro y el Sur, dependiente de la zona de colecta y del contenido de metales. Los resultados muestran que hay una asociación entre el ensayo cometa y la degradación del DNA, observándose un patrón de daño diferencial en donde la degradación del DNA se da a partir de $10 \mu\text{g/mL}$ para el caso de Norte, Centro $80 \mu\text{g/mL}$ y Sur 80 y $160 \mu\text{g/mL}$. Con respecto al daño al DNA evaluado por el ensayo cometa se muestra un efecto diferencial a una concentración de $20 \mu\text{g/mL}$. En cuanto a la formación de aductos éste presenta una relación completamente a la inversa de lo observado en cometas. Estos resultados señalan una asociación entre los efectos tóxicos

observados y contenido de metales encontrados en las muestras, lo que nos sugiere que la composición juega un papel importante en el efecto de las aeropartículas.

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS Y ATMOSFÉRICAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO.

La Ciudad de México es una de las más contaminadas y pobladas del mundo. El crecimiento industrial y el aumento en la mancha urbana, son factores que han provocado un impacto negativo en el ambiente, todo esto producto de una expansión sin planeación, tecnología e infraestructura adecuada. La zona metropolitana de la ciudad de México (ZMCM) está habitada por casi 20.2 millones de personas (II Censo de Población y Vivienda 2005).

Aunado a las actividades antropogénicas, el problema de la contaminación del aire en la ZMCM se agrava por las características geográficas, topográficas y meteorológicas de la zona. La ciudad se localiza a 2,240 metros sobre el nivel del mar, en una cuenca lacustre rodeada de montañas de más de 3,000 m de altura, característica que le confiere un clima subtropical de altura. Se presenta una estación de lluvias de mayo a octubre y una estación de secas el resto del año (Calderón-Segura *et al.*, 2004). La temperatura anual oscila entre 5.3 y 26.5 °C, con vientos dominantes en dirección noreste a suroeste, durante los meses fríos la temperatura oscila entre 4 y 18 °C (diciembre-febrero) y en los meses más calurosos oscila entre 28 y 34 °C (marzo-junio) (Jiménez, 2001).

La altitud a la que se localiza la ciudad tiene como consecuencia una menor concentración de O₂ , condición que altera la eficiencia del proceso de

combustión generando mayores concentraciones de CO₂ e hidrocarburos (Doran *et al.*, 1998).

En la atmósfera de la ciudad de México existe gran variedad de sustancias contaminantes. Entre éstas, las más importantes para evaluar la calidad del aire son: partículas suspendidas totales (PST), plomo, dióxido de azufre, óxido de nitrógeno, hidrocarburos, ozono y otros oxidantes como los fotoquímicos. En los primeros seis casos se trata de sustancias emitidas en forma directa por la combustión y diversos procesos industriales, así como por la erosión, los incendios y otros fenómenos naturales, por ello se conocen como contaminantes primarios. El último se produce en la atmósfera como resultado de las reacciones fotoquímicas que en presencia de la radiación ultravioleta de los rayos del sol se originan las lluvias ácidas y el efecto invernadero (Llorénte, 1989).

Dadas las características geográficas y antropogénicas de la Ciudad de México, ésta se ha dividido para su estudio en tres grandes zonas: norte, centro y sur, ya que tienen diferentes fuentes de emisión lo cual les da características importantes.

La zona Norte (N) presenta principalmente una actividad industrial, que arroja diariamente toneladas de contaminantes al aire, al suelo y a los desagües. Aunado a esto, está la contaminación emitida por los vehículos automotores (Miranda *et al.*, 2000).

La zona centro (C) es comercial por excelencia y presenta los mayores problemas de circulación y congestionamiento vehicular, sumando a esto la

emisión de gases y polvos así como la falta de áreas verdes es lo que conlleva a tener los más altos índices de contaminación (Miranda *et al.*, 2000).

En la zona Sur (S) la emisión por contaminantes es por automóviles y fuentes naturales (polen-suelo). Gran parte de su territorio está asignado a usos agrícolas (36% del área total y 38.1% del área no urbanizada), presentando grandes espacios abiertos y zonas verdes (Rosas *et al.*, 2004)

Composición de las aeropartículas

En la contaminación atmosférica se reconoce como partícula a cualquier material sólido o líquido con un diámetro que oscila entre 0.1 y 70 micrómetros (μm). En conjunto se designan como partículas suspendidas totales o (PST). El tamaño, la composición química y otras propiedades físicas (Bonner *et al.*, 1998) y biológicas (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002; García-Cuellar *et al.*, 2002; Osornio *et al.*, 2003) del material particulado dependen de la fuente de origen (Miranda *et al.*, 2000), así como de los cambios a que están sujetas durante su permanencia en la atmósfera (Jiménez, 2001) y del sitio geográfico de colecta.

Las partículas suspendidas totales se diferencian según su tamaño aerodinámico y en ellas se encuentran contenidas las PM_{10} que incluye a las partículas con un diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) y las ($\text{PM}_{2.5}$) con un diámetro aerodinámico $\leq 2.5 \mu\text{m}$; por último tenemos a las ultrafinas o nucleares que incluyen a partículas menores de $0.1 \mu\text{m}$ de diámetro. Las PM_{10} son las que permanecen en las vías superiores, fosas nasales, laringe y faringe, a estas se

les conoce como fracción respirable y a las $PM_{2.5}$ como inhalables, estas últimas se depositan más eficientemente en el pulmón y son eliminadas con mayor dificultad ya que se mantienen por más tiempo en la atmósfera (Brauer *et al.*, 2001).

El origen de las PM_{10} está asociado a la erosión del suelo, desprendimiento de diversas fuentes de minerales insolubles (óxidos de silicio, de calcio, de magnesio de hierro etc). También están compuestas por carbonatos de sodio y otras sales, así como por partículas de origen biológico dentro de las que se incluyen bacterias, hongos, polen, algas, protozoarios, insectos y compuestos biogénicos, como proteínas, micotoxinas y endotoxinas bacterianas (Suárez, 1991; Rosas *et al.*, 1995; Lang, 1996; Miranda *et al.*, 2005).

Se ha visto que aproximadamente el 18% de las partículas provienen de la industria y un 26% son originadas por las emisiones de vehículos automotores (Cometravi, 1997). El origen geológico de las partículas está caracterizado por Al, Si, Fe, Mg y Ca (Miranda *et al.*, 2000). El 1% lo conforman las partículas originadas por los establecimientos o lugares donde se desarrollan actividades de tipo industrial y las emitidas por ambientes domésticos y de servicio en cantidades relativamente pequeñas. En tanto que el origen de las partículas finas y ultrafinas se debe a emisiones y procesos de combustión o bien por reacciones químicas atmosféricas; generalmente están constituidas de carbono elemental y compuestos orgánicos (hidrocarburos poli-cíclicos aromáticos y productos de reacción fotoquímica) metales, nitratos, iones amonio, ácidos y

sales utilizadas; componentes que le confieren acidez a las partículas (Fortoul *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2000).

PM₁₀ y estudios epidemiológicos

La exposición a PM₁₀ ha generado un área de estudio de gran interés, ya que en recientes años se ha reportado que por cada incremento de 10 µg/m³ de PM₁₀ hay un aumento de 4 a 8 % en la mortalidad diaria relacionada con problemas cardiovasculares como disritmias, isquemias y cáncer de pulmón (Pope *et al.*, 2003), si bien los mecanismos mediante los cuales las PM₁₀ inducen daño fisiopatológico son poco conocidos, actualmente sabemos que este incremento en la mortalidad diaria ha ido aumentando de un 8 a 18 % asociado a problemas cardiovasculares por partículas finas en fumadores (Pope *et al.*, 2004). En la ZMCM a mediados del los 90 se mantuvieron las condiciones ambientales, en donde el incremento en ozono se asoció con síntomas respiratorios además de problemas oculares (Sánchez *et al.*, 2004). En la Ciudad de México se ha reportado que un aumento de 10 µg/m³ se asocia con una elevación del 1.4 % de mortalidad diaria en personas mayores de 65 años, además de problemas cardiovasculares (Borja-Aburto *et al.*, 1998). Se conoce que las partículas contienen metales así como otras sustancias de origen inorgánico y éstas tienen la capacidad de generar un estrés oxidante que se ha asociado con problemas pulmonares y cáncer en pacientes expuestos a estas partículas (Donalson *et al.*, 2003; Delfino *et al.*, 2005) también se sabe que las PM₁₀ y PM_{2.5} inducen un

estrés oxidante en células de pulmón de rata medido por malonaldehído (Jin-Hyunk *et al.*, 2004).

Si bien poco se sabe de los mecanismos mediante los cuales las PM's inducen daño a la salud, en los últimos años el estrés oxidante ha sido uno de los principales mecanismos de daño por PM's propuestos; donde los metales de transición así como en LPS y los hidrocarburos poli-cíclicos aromáticos juegan un papel importante en inducir estrés oxidante.

ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante ocurre cuando hay un desbalance entre antioxidantes y oxidantes producidos durante el metabolismo normal celular (Fig 1). En este metabolismo el daño celular es inducido por las especies reactivas de oxígeno como: el radical hidroxilo, súper oxido y peróxido de hidrógeno. La fuente natural de ERO's *in vivo* es la respiración aeróbica en donde se producen compuestos xenobióticos así como por la β -oxidación de ácidos grasos y la activación del metabolismo de P450 (sistema enzimático del metabolismo de xenobióticos de fase I). Bajo condiciones normales el mecanismo de protección está dado por la súper oxido dismutasa (SOD), catalasa o glutatión peroxidasa (GSH).

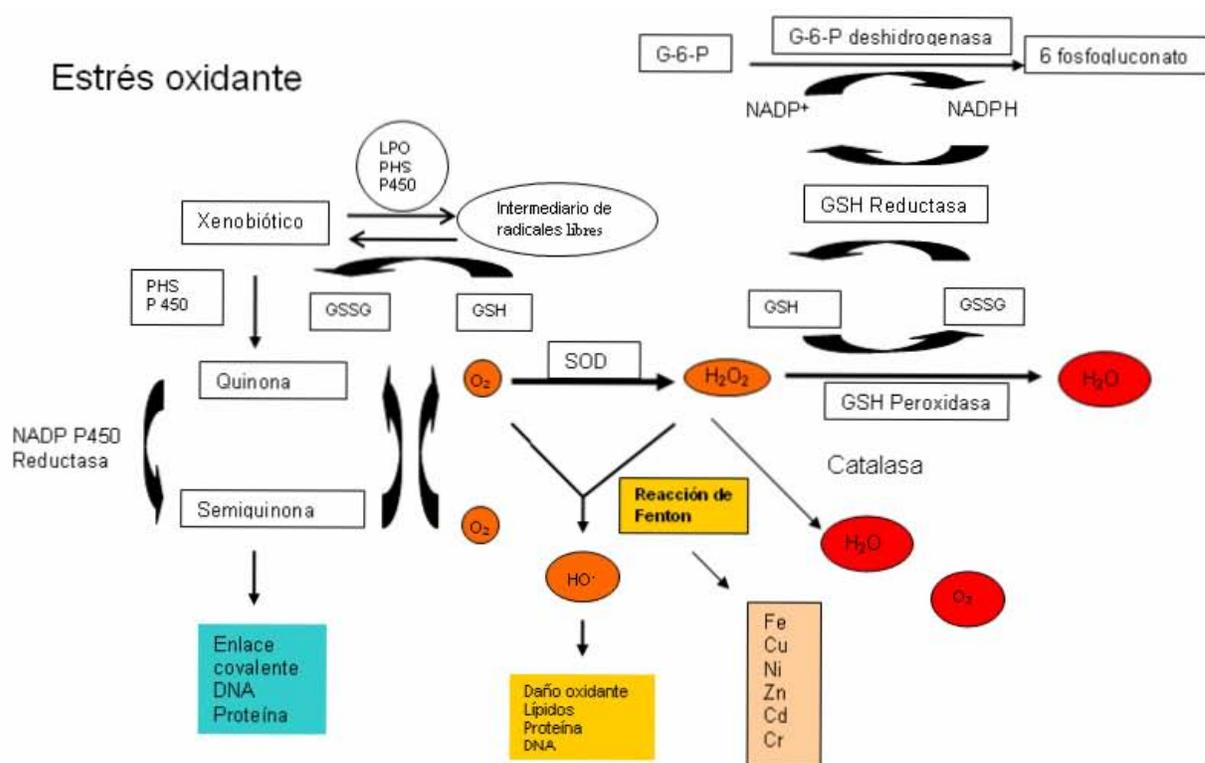


Fig 1.- Mecanismos involucrados en el daño celular provocados por la acción de los radicales libres.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se encuentra la vitamina C, el ácido úrico y los flavonoides polifenólicos dentro de los cuales se encuentran las vitaminas A, E y los β -carotenos así como la ubiquinona o Coenzima Q (Valko *et al.*, 2006)

El estrés oxidante también ocurre por exposición del organismo a agentes ambientales (Fig 2). Este desequilibrio puede alterar procesos celulares entre ellos la traducción de señales, la expresión génica, la proliferación celular y la muerte celular entre otros. Cuando se pierde este equilibrio, también se pierde el control de procesos celulares como los mencionados anteriormente provocando

daño celular, el cual puede mediar o llevar a un estado apoptótico de proliferación celular, senescencia, cáncer o a la muerte del organismo (Ariza *et al.*, 1999).

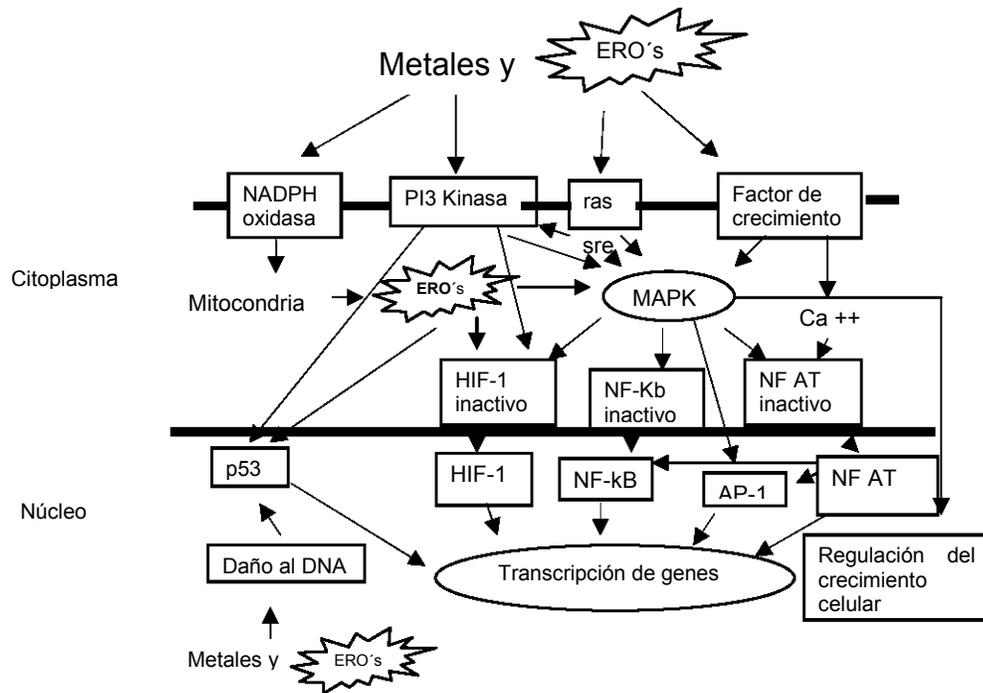


Fig 2. Interacción de metales y ERO's activando vías de señalización causando respuestas a nivel celular. Tomado de (Valko *et al.*, 2006)

La pérdida del control en el balance oxidante está relacionada al uso de oxígeno molecular por la célula y éste puede contribuir en menor o mayor grado a la toxicidad celular (Valko *et al.*, 2006). Aunque es inevitable la generación de especies reactivas debido a que tienen funciones fisiológicas en la célula (Fig 1) y en diferentes niveles del organismo, es importante contar con suficientes antioxidantes y enzimas para prevenir o limitar el daño que estas especies

pueden generar. Se ha estimado que las células de mamíferos presentan aproximadamente 10,000 oxidaciones por día como resultado de la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son capaces de destruir bacterias así como inactivar enzimas, interactuando con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Lloyd y Phillips, 1999).

La sobreproducción de especies oxidantes y radicales libres, la descompartimentalización de los complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica y la modificación de las defensas contra radicales libres son algunos de los efectos del estrés oxidante generado en la célula (Valko *et al.*, 2006)

Radicales libres y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's).

Un radical libre es cualquier especie capaz de existir de manera independiente con uno o más electrones no apareados, debido a que son altamente reactivos, tiene un tiempo de vida media corto y pueden comportarse como donadores o aceptores de electrones. Pueden estar cargados positiva o negativamente o estar eléctricamente neutros. Los radicales generados tienen la capacidad de reaccionar con un no radical para dar lugar a un nuevo radical. Son producidos por procesos fisiológicos celulares y también por exposiciones a algún agente ambiental como luz UV y metales (Figs 1 y 2). Se forman en compartimientos como los lisosomas, mitocondrias, peroxisomas, membrana celular y retículo

endoplásmico. En el caso de la mitocondria, la eliminación de electrones del oxígeno genera radicales libres (Waris y Ahsan, 2006).

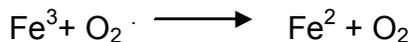
El metabolismo del oxígeno va acompañado por una reacción de transferencia de un electrón que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno. La formación de los radicales libres puede estar catalizada por metales de transición, por la formación de productos reactivos y por oxido-reducción vía la reacción de Fenton.

Esta reacción comprende la utilización de Fe en presencia H_2O_2 , generando así el radical hidroxilo, el cual es uno de los principales radicales que puede causar daño a DNA y a otras macromoléculas. La reacción de Haber-Weiss es muy importante por que se lleva a cabo la reducción del metal por $O_2 \cdot$ generando peróxido que a su vez vía una reacción de Fenton genera radicales hidroxilo. La reacción se muestra de la siguiente manera:

Reacción de Fenton



Reacción Haber-Weiss



Diversos estudios implican a las especies reactivas en diferentes procesos patológicos como: enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, aterosclerosis y carcinogénesis (Ariza *et al.*, 1999).

Las especies reactivas de oxígeno son ejemplo de radicales libres y aunque existen también especies reactivas de nitrógeno, son las de oxígeno las más ampliamente estudiadas.

El oxígeno está unido por dos electrones formando un enlace covalente y dos electrones no apareados, esto hace que el oxígeno tenga la habilidad de oxidar otra molécula mediante la aceptación de un par de electrones. El oxígeno transfiere un electrón lo que produce radicales de oxígeno. La actividad molecular puede aumentar moviendo electrones pero esto requiere energía y genera oxígeno en singulete (Ariza *et al.*, 1999)

Principales especies reactivas de oxígeno

Oxígeno singulete. El oxígeno singulete puede originarse a partir del H_2O_2 , por la acción de la mieloperoxidasa, produciéndose el anión superóxido teniendo un tiempo de vida de microsegundos (Ariza *et al.*, 1999)

Esta molécula no es un radical, pero reacciona con moléculas biológicas como los lípidos de membrana y el DNA, en el cual produce el rompimiento de una de sus hebras.

Anión superóxido. Este radical es producido por la reducción molecular del oxígeno en singulete. Se forma del 2 % del oxígeno reducido por las mitocondrias. Tiene reactividad química limitada comparada con otras ERO's, no es capaz de cruzar las membranas biológicas, su protonación produce el radical hidroperoxilo y tiene un tiempo de vida de microsegundos.

La disociación del superóxido en soluciones acuosas se relaciona con su capacidad de dismutar, eso quiere decir que la misma especie es oxidada y reducida a la vez en una misma reacción, esta característica es más rápida en soluciones acuosas ácidas (Waris y Ahsa, 2006)

Peróxido de hidrógeno. Esta molécula no es un radical, se forma por la dismutación del anión superóxido y por las oxidasas celulares. Se ve involucrado en diferentes procesos biológicos como la proliferación celular, expresión genética y la transducción de señales. Puede penetrar membranas biológicas por difusión, convirtiéndose en el radical hidroxilo u otro oxidante univalente, es decir, es capaz de generar radicales libres por la interacción de un metal de transición (Waris y Ahsa, 2006)

Radical hidroxilo. El radical hidroxilo se puede generar en sistemas biológicos por diversas reacciones, por ejemplo Fenton o Haber-Weiss. Una de las fuentes de generación del radical hidroxilo es la irradiación ionizante, dado que el constituyente más abundante de las células es el agua, la exposición a radiaciones de alta energía (rayos γ) resulta en la producción de radicales hidroxilo. Estos son responsables del daño al DNA, proteína y lípidos (Waris y Ahsa, 2006).

MODELOS DE ESTUDIO

La formación de radicales libres vía reacción de Fenton y su efecto en biomoléculas se ha estudiado tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*. En un estudio realizado utilizando como modelo la inducción de cambio conformacional del plásmido ϕ X174 al sufrir corte en una o dos cadenas de su DNA, se evaluó el daño oxidante que producen los radicales hidroxilo producidos vía reacción de Fenton que se atribuye al hierro presente en las fibras de asbesto evaluadas, esto debido a que, cuando se utilizó manitol como atrapador de radicales hidroxilo, éste fue capaz de proteger parcialmente el daño al plásmido (Gilmour *et al.*, 1996). En el plásmido *Bluescript* se han visto rompimientos de 1 ó 2 cadenas del DNA en presencia de compuestos como Tiol/ Fe^{3+}O_2 y S-nitrositol/ H_2O_2 (Jee-Woo *et al.*, 1994). En este mismo modelo, previamente se había descrito el rompimiento de 1 y 2 cadenas de DNA, al incubar el plásmido con CuSO_4 más H_2O_2 . Estos rompimientos disminuyen al utilizar EDTA en el sistema, por lo que se deduce que el cobre, vía una reacción tipo Fenton, está mediando este daño (Lloyd y Phillips ,1999).

Se ha evaluado que las PM_{10} inducen daño oxidante al DNA, observado en el plásmido ϕ X174 señalando que el Fe juega un papel importante en la generación de radicales libres con capacidad de dañar al DNA. En este sistema utilizaron quelantes de metales como la ferrozina para Fe^{2+} y deferoxamina para Fe^{3+} y observaron una protección parcial del plásmido (Gilmour *et al.*, 1996)

En cultivos celulares, se ha encontrado que las PM's son capaces de inducir daño al DNA. Otra manera en que se ha evaluado daño a DNA por PM's es mediante la técnica del cometa que bajo condiciones alcalinas el contenido genético migra durante el corrido electroforético en el gel de agarosa, podemos mencionar trabajos como el de Alfaro-Moreno *et al.*, (2002) en donde evaluó el daño al DNA de las PM₁₀ de tres zonas de la Ciudad de México y observó daño en Norte, Centro y Sur de manera diferencial N>C>S. También se ha visto que las PM₁₀ y PM_{2.5} de la Ciudad de México inducen daño al DNA en células A549 evaluado por el ensayo cometa (Gutiérrez-Castillo *et al.*, 2006).

Otra evaluación importante para medir daño oxidante producido por el material particulado es mediante la formación de aductos de 8-oxo-dG, utilizado modelos *in vitro* que han permitido identificar la capacidad para producir daño al DNA e identificar componentes de estos materiales que están participando en la generación del daño (Sorensen *et al.*, 2005). Tal es el caso en donde se ha utilizado DNA desnudo de esperma de salmón, el cual al ser incubado con Hierro, sulfato de cobre o níquel II en presencia de H₂O₂, ocurrió daño al DNA medido por formación de aductos 8-OHdG y cuando se uso EDTA como quelante de metales y manitol como un atrapador de radicales libres, el daño al DNA fue menor, lo que sugiere que en la producción del daño participan los metales, que vía una reacción de Fenton originan radicales libres (Lloyd y Phillips, 1999). Esta presencia de radicales libres también se ha asociado a partículas generadas por la combustión de ROFA que se sabe están compuestas de sulfatos, silicatos, compuestos nitrogenados y metales como V,

Fe, Ni, Cr, Co y Mg (Ghio *et al.*, 2002). Los autores concluyen que el estrés oxidante juega un papel importante en el riesgo de cáncer pulmonar por la generación de radicales libres vía reacción de Fenton

Daño al DNA por PM's

El daño al DNA por compuestos xenobióticos tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas y nitrosaminas, es debido principalmente a la formación de aductos, los cuales pueden causar mutaciones y llevar a la inducción de tumores en modelos animales (Phillips *et al.*, 1993).

Los niveles de aductos pueden medirse en desordenes clásicos como es la enfermedad de Wilson en la que hay una acumulación anormal de cobre que se ha asociado a daño oxidante y estrés (Nair *et al.*, 2003).

La actividad de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumor son un potencial de estimulación de señales, alterando la expresión de genes que conllevan al desarrollo del cáncer; expresión que se ha visto alterada por la presencia de estrés oxidante (Cerdeja y Wetzman, 1997). Las PM₁₀ inducen generación de radicales libres en la superficie celular y éste es uno de los mecanismos mediante los cuales las PM₁₀ ejercen su potencial patogénico y se ha descrito que la actividad de estos radicales libres causa en ratones inflamación pulmonar y daño epitelial (Li *et al.*, 1996). Se ha visto que las PM₁₀ activan señales que podrían participar en el desarrollo de cáncer de pulmón, por la expresión de algunos genes que juegan un papel muy importante en la

inflamación, como las MAPKs, el factor nuclear NF-kappaB, AP-1 y la acetilación de histonas (Donaldson *et al.*, 2003)

Se sabe que las células Balb-C 3T3 expuestas a material particulado ($\leq 15 \mu\text{m}$) forman agregados o colonias en agar muy parecido a lo que se observa con Benzo (a) pireno, lo que sugiere que estas partículas pueden ser carcinogénicas (Zelikoff *et al.*, 1985).

En un estudio de mutagénesis realizado con la prueba de Ames en *Salmonella typhimurium*, se determinó el daño genotóxico asociado a las PM₁₀ de la zona centro y sur de la Ciudad de México, observándose un efecto mayor con las partículas del centro que del sur debido a que se ha encontrado mayor cantidad de hidrocarburos poli-cíclicos aromáticos en estas muestras colectadas en centro de la ciudad (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1995). Así mismo se ha demostrado que en *Drosophila melanogaster* hay mutaciones en las alas de estos dípteros cuando son expuestas a PM₁₀ de la Ciudad de México de dos zonas centro y sur en donde la diferencia es mayor en centro debido al contenido de material orgánico (poli-cíclicos aromáticos) (Delgado *et al.*, 1999).

Por otro lado se ha visto que las PM₁₀ producen citotoxicidad y daño genotóxico evaluado por cristal violeta y ensayo cometa en donde los efectos son diferentes, de acuerdo a la zona de colecta. (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002). Las partículas también producen efectos citotóxicos y proinflamatorios; utilizando partículas PM₁₀ y PM_{2.5} del sureste (Iztapalapa) y noreste (centro) de la Ciudad de México, los resultados muestran que las partículas PM₁₀ del sureste son dos veces más tóxicas causando la secreción de citocinas proinflamatorias. La

toxicidad medida por apoptosis fue la misma en PM_{10} y $PM_{2.5}$ pero el material colectado del noreste para los dos casos fue más toxico (Osornio-Vargas *et al.*, 2003). El autor menciona que las $PM_{2.5}$ inducen citotoxicidad a través de mecanismos independientes de la endotoxina que probablemente sean por los metales de transición que se sabe se encuentran en las partículas y que para el caso de las PM_{10} este sea a través de un mecanismo dependiente de la endotoxina.

Extractos orgánicos de las PM_{10} de tres estaciones del año durante los meses de abril, agosto y noviembre se ha visto que son capaces de inducir daño citotóxico (muerte celular) y genotóxico evaluado por medio del intercambio de cromátidas hermanas, relacionándose con la época de colecta en donde fue mayor en noviembre comparada con abril y agosto (Calderón-Segura *et al.*, 2004)

JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental ha sido uno de los principales males que aquejan a nuestra ciudad por sus efectos nocivos en la salud y en donde el material particulado presente en el aire, contribuye de forma importante ya que son partículas que por su composición y capacidad de penetración en las vías respiratorias tienen efectos dañinos a la salud, conclusión apoyada por una gran diversidad de estudios epidemiológicos (Borja-Aburto *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 2002). Por estas razones las células del aparato respiratorio tendrán mayor probabilidad de estar expuestas durante largos períodos de manera directa a los diversos componentes que estén asociados a esas partículas. Dichos compuestos pueden ser gradualmente removidos y subsecuentemente transportados a través de la membrana alveolar al torrente sanguíneo y hacia otros tejidos sensibles que pueden quedar expuestos. La importancia de identificar a los componentes presentes en las partículas con capacidad para producir daño y además evaluar su potencia para producirlo, nos permitirá cada vez obtener mayor conocimiento acerca de cómo los diferentes componentes de las PM's son capaces de generar ese daño, de esta forma podremos diseñar estudios que permitan profundizar en el estudio de los efectos toxicológicos de las PM's, ligados a las fuentes de emisión de contaminantes que influyen en su composición.

Por otra parte el estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el manejo celular podrían determinar alteraciones celulares con consecuencias para la salud.

En cuanto a la composición se ha determinado que estas partículas contienen una gran variedad de componentes entre los que hay que destacar la presencia de diversos metales (Bonner *et al.*, 1998). Para fines de este trabajo, es pertinente enfatizar que se conoce que algunos metales en presencia de H₂O₂ son inductores de reacciones tipo Fenton, con la consecuente generación de radicales hidroxilo que en un sistema *in vitro*, se originan al interactuar un metal divalente con el peróxido de hidrógeno. Para evaluar el daño a macromoléculas como el DNA, de los radicales libres inducidos por las PM's se han utilizado tanto quelantes de metales como atrapadores de este radical como son los casos de la deferoxamina que atrapa al Fe III impidiendo la producción de radicales libres vía reacción de Fenton y del manitol que atrapa los radicales OH· generados en el sistema. Debido a que las PM₁₀ contienen metales consideramos que es importante conocer cual es el potencial que tienen para inducir daño al DNA y relacionar si éste se asocia al contenido de metales, para lo cual utilizamos a las PM₁₀ colectadas en la Ciudad de México, de las cuales conocemos que tienen diferente contenido de endotoxinas y metales como: Cu, Fe, Ni, V, Zn, Pb (Bonner *et al.*, 1998) que inducen efectos biológicos de forma distinta, debido a la diferente composición que tienen las partículas influenciada por la asociación de contaminantes específicos característicos de cada zona de la ciudad en donde fueron recolectadas. Para realizar este estudio, utilizamos primeramente un sistema *in vitro* que consiste en interactuar a las partículas con el DNA aislado de la línea Balb-C 3T3 en presencia de 1mM de H₂O₂ y para identificar si los metales encontrados en estas partículas participan en la

inducción del daño, utilizamos deferoxamina y manitol. El empleo de este sistema nos permite identificar si el componente metálico de las PM's es capaz de producir daño. Posteriormente empleamos cultivos celulares para evaluar el daño al DNA mediante el ensayo de cometas y la evaluación de aductos de 8-oxo-dG y conocer si existe relación con el contenido de metales de las PM's utilizadas y si hay diferencias en las zonas utilizadas.

Hipótesis:

1. Las PM₁₀ de la Ciudad de México inducirán daño en el DNA asociado al contenido de metales.
2. El daño al DNA causado por las partículas estará asociado a su potencial oxidante vía reacción de Fenton.

Objetivo General:

Determinar si las PM₁₀ de la Ciudad de México (1991), son capaces de inducir daño al DNA en células Balb-C 3T3 (desnudo *in vitro*, cometas y 8-oxo-dG en cultivo celular)

Objetivos particulares.

1. Evaluar la inducción de daño oxidante al DNA desnudo expuesto a PM₁₀ del Norte, Centro y Sur de la Ciudad de México
2. Identificar si las partículas con diferente contenido de metales, inducen efectos diferenciales en el DNA en células expuestas, utilizando el ensayo de cometa.
3. Evaluar la formación de aductos de 8-oxo-dG en células expuestas
4. Analizar si el daño al DNA producido por las PM₁₀ de la Ciudad de México es inhibido mediante la utilización del manitol (antioxidante) y la deferoxamina (quelante de metal Fe³⁺)

MATERIAL Y MÉTODOS.

Área de estudio:

La recolección de las partículas se llevó a cabo en la Ciudad de México durante el año de 1991, seleccionando tres zonas de la Ciudad con características contrastantes ligadas a las fuentes de emisión de los contaminantes: Una zona industrial, una zona comercial con alto tráfico vehicular y una zona de tipo residencial. Las partículas fueron donadas para su estudio por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (RAMA)

Zona norte (N).

La estación de monitoreo se encuentra dentro de las instalaciones del Instituto Mexicano del Petróleo, ubicado en Eje Central "Lázaro Cárdenas" No.152, Colonia San Bartolo Atepehuacan, Delegación Gustavo A. Madero, México D.F. CP 07730. La Estación de Monitoreo se localiza en la azotea del edificio de "Sismología" (inmueble de dos niveles de construcción) a un altura de 13.5 m

Zona centro (C).

La estación de monitoreo se encuentra en la azotea del centro de salud Dr. Luis E. Ruiz, localizado en la Avenida Congreso de la Unión No.148, Colonia Merced Balbuena. Delegación Venustiano Carranza. México D.F., a una altura de 4.5m.

Zona sur (S).

Las muestras de aeropartículas de la zona sur se obtuvieron en la Delegación Álvaro Obregón, calle Cañada No.370 esquina con Avenida Cráter, Colonia Pedregal de San Ángel. La estación de monitoreo está en la azotea de la escuela primaria “John F Kennedy” a una altura de 4.5 m.

Colecta de las aeropartículas

Las aeropartículas fueron colectadas en 1991 y los muestreos se realizaron 4 días por semana. La colecta se efectuó con un muestreador para PM₁₀ de grandes volúmenes (GMW modelo 1200VFC HVPM10 Sierra Andersen, Smyrna, GA USA), cuyo funcionamiento se fundamenta en el fraccionamiento de las partículas por su distribución en tamaños. El muestreador colecta partículas con un diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$, a un flujo de 1.13 m³/min que se mantiene con un controlador de flujo (Andersen Sampler Inc. 1984). Se utilizó como soporte de colecta filtros de fibra de vidrio tipo A/E de 20.3 x 25.4 cm 61638 (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI USA). Los filtros fueron previamente estabilizados por 24 horas en un cuarto de temperatura 22 °C \pm 3 °C a una humedad de 50 % \pm 5 % constantes.

Obtención de PM₁₀

Para recuperar las aeropartículas, los filtros fueron sonicados en seco (sonicador Branson modelo 5210, Branson Ultrasonics Corporation, USA) durante dos horas y posteriormente se realizó un barrido cuidadoso con un pincel de pelo fino, para evitar el desprendimiento de fibras del filtro. Una vez obtenidas las partículas, se mezclaron y guardaron en viales libres de endotoxinas (tratadas a 200 °C por 4h) y se almacenaron en un desecador a 4 °C hasta su uso. Las concentraciones de las partículas PM₁₀ para células adheridas utilizadas fueron en µg/cm² y cuando los experimentos fueron en volumen se utilizó µg/mL. En este trabajo se mantuvo una equivalencia de 1 µg/cm² = 2 µg/mL (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002) cuando se expuso en solución.

Cultivo de la línea celular Balb-C 3T3.

En este trabajo se utilizó la línea celular Balb-C 3T3 la cual fue obtenida de la ATCC, las células se cultivaron en cajas de 75 cm² (NUNC Brand Productos) con medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (Gibco BRL) 10 %; y se incubó a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % hasta que llegaron a confluencia.

Extracción y cuantificación del DNA de la línea celular Balb-C 3T3

El DNA se extrajo de 1×10^7 células de Balb-C 3T3 con un kit comercial [DNA isolation Kit for cells and Tissue Cat No. 1814770 (Roche)]. Este Kit fue utilizado porque en la extracción del DNA no se usa fenol-cloroformo que puede inducir daño oxidante al DNA, ni EDTA el cual es un quelante de metales. Se retiró el medio de las cajas de cultivo, se hicieron dos lavados con PBS, se agregaron 3 ml de amortiguador de lisis y se resuspendió. El lisado se pasó a un tubo de ensaye previamente estéril y se agregaron 2 μ l de proteínasa K y se mezcló por inversión. Se incubaron a 65 °C (Temp-block Equatherm) por 2 h. Se le adicionó 100 μ l de RNasa, se mezcló y se incubó a 37 °C durante 1 h.

Se le añadió 1.2 mL de la solución de precipitación y se mezcló. Se incubaron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 26,900 g a 20 °C \pm 5 °C durante 20 min (Beckman XL 90) con un rotor Ti 50. Se colectó el sobrenadante en tubos cónicos de polipropileno para centrifuga de 15 ml (Falcon). Se agregó 0.7 mL del isopropanol y se centrifugó a 1,370 g por 10 min a temperatura ambiente (Sorvall RC-5B) y se decantó el sobrenadante. A la pastilla se le agregaron 2 mL de Etanol al 70 % y se centrifugó a 1,370 g por 5 min. Finalmente el DNA se resuspendió en H₂O bidestilada y se cuantificó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm y 280 nm (Beckman DU 650).

La integridad del DNA se verificó corriendo 100ng de DNA en un gel de agarosa al 1.5% usando como referencia de tamaño el fago λ cortado con Hind III (Invitrogen No Cat 15612-013). La muestra corrió a 100 volts (Fuente de poder Bio-Rad 1000/500) por una hora utilizando amortiguador TBE [(Tris base 0.5M, ácido bórico 0.5 M y EDTA 0.5M pH 8.0 (Gibco BRL)]

Exposición de DNA a PM₁₀

Las partículas se pesaron en viales libres de endotoxina y como testigo se utilizaron partículas del Monte Santa Helena las cuales no contienen metales detectables. Las partículas se esterilizaron en una autoclave (Hirayama Modelo HA-300MII) previo a su utilización a 121 °C por 20 min a una presión de 2.425 libras/cm² y posteriormente se resuspendieron en 3 mL de H₂O desionizada. La reacción de las partículas con el DNA se hizo utilizando 400 ng de DNA con las partículas a concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/mL. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación por 24 h (Incubador rotatorio Lab-Line). A la par se corrieron los experimentos en presencia de 1mM de manitol ó 1 mM de deferoxamina.

Evaluación del daño al DNA mediante el Ensayo Cometa

Se sembraron 5 x 10⁵ células Balb-C 3T3 por pozo en cajas de 6 pozos de 9.5 cm² con medio DMEM (Gibco BRL) más 10 % de suero de ternera (Gibco BRL), se dejaron crecer a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 48 h. Posteriormente se expusieron a 20 µg/mL de PM₁₀ del Norte, Centro y Sur y se incubaron en las mismas condiciones mencionadas arriba durante 24 h.

Las células expuestas se cosecharon con PBS-EDTA y se tomaron 27,000 células las cuales se resuspendieron en 200 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 2 % (fundida en amortiguador de corrida) (tris 10mM EDTA 1mM, pH 7.4). Posteriormente se distribuyeron en camas de agarosa (las camas se realizaron en rectángulos en donde se vertió agarosa al 2 % fundida en el buffer de corrida). Se dejó solidificar 3 min. Posteriormente se digirió con amortiguador de digestión (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2M, TritonX 100 al 1 %, pH 10), por 10 min. Las camas se sumergieron en amortiguador de desenrollamiento (NaCl 100 mM EDTA 1mM) por 5 min. Se hizo un lavado con amortiguador de corrida (tris 10mM EDTA 1mM, pH 7.4) por 5 min. Las muestras se corrieron a 50 volts por 30 min en una cámara de electroforesis (Horizon 58 Gibco BRL). Una vez realizado el corrimiento electroforético se agregó bromuro de etidio 1 μ g/mL goteado sobre la preparación. Se observaron y capturaron las imágenes de los cometas con un microscopio de fluorescencia (BX 40F; Olympus Tokio, Japón). Para el análisis de datos se midió la longitud de los cometas en μ m tomando el valor desde la cabeza del cometa hasta la cola del mismo utilizando un analizador de imágenes (PC Image J / Windows 3.1). Los resultados se presentan como medianas, máximos y mínimos y percentiles 25 y 75. Para comparar los grupos se realizó un ANOVA de 1 vía, aplicando el programa STATA 7.0 (Stata, college Station, TX). Se consideraron diferencias significativas cuando la $p < 0.05$.

Determinación de 8-oxo-2´deoxiguanosina (8-oxo-dG)

La medición de aductos de 8-oxo-dG se realizó mediante el método analítico de HPLC con detección electroquímica. Esta técnica permite evaluar los niveles de 8-oxo-dG en condiciones oxidadas.

Las células Balb-C 3T3 fueron expuestas a 20 µg/mL. El DNA se extrajo usando un kit para aislar DNA [(DNA isolation kit for cells and Tissue Cat No 1814770) (Roche)]. El DNA fue disuelto en un amortiguador AE (Qiagen). Se tomaron 100 µg de DNA que fueron digeridos como se describió previamente (Huang Xi *et al.*, 2001). Las incubaciones fueron desarrolladas de la siguiente manera, se le agregó 1 µl DNAasa1 y se incubó por 30 min a 37 °C, se tomaron 0.5 µg/µl de NP1 (nucleasa) a pH 5.2 y se incubó por 60 min a 37 °C, posteriormente se tomaron 0.5 µg/µl de fosfatasa alcalina a pH 7.6 y se dejó incubando por 30 min a 37 °C, finalmente se agregaron 0.5 µg/µl de fosfodiesterasa I y fosfodiesterasa II a pH 8 y se incubó por 30 min a 37 °C. La incubación fue mezclada y filtrada a través de una membrana de 0.5 µm (Milipore, Bedford, MA). Se utilizó 0.1mM (DTPA) quelante de hierro para prevenir la oxidación

artificial de DNA. Veinte microlitros de la hidrólisis fue analizada por HPLC. El HPLC-ECD es un detector de captura electrónica electroquímica, que es controlado por un software para análisis químico 7.01 (Tecnología Agilent, San Diego CA). Se utilizó un acolumna C₁₈ de 75 x 4.6 mm cuyo tamaño de partícula es de 5 µm (Alltech, Deerfield IL) y una columna YMC ODS-AQ 4.6 X 15 cm, 120Å, 5.5 (Millipore, MA). La fase móvil consiste en un 8 % de metanol conteniendo 50 mM de amortiguador de acetato de sodio (pH 5.2). La elución fue isocrática con una tasa de reflujo de 0.8 mL. La concentración de dG fue monitoreada con base en la absorbancia de 245 nm y la concentración de 8OHdG se estableció en la lectura electroforética (400 mV). Los niveles fueron cuantificados usando una curva estándar para cada componente. La oxidación de DNA fue expresada en OHdG por 10⁶dG.

Análisis Estadístico

El análisis se realizó a los datos obtenidos con el ensayo cometa fue una prueba paramétrica como es el caso de ANOVA (Bonferroni, $p < 0.05$) y una prueba no paramétrica como la distribución de frecuencias medido en cajas, percentiles 25 y 75. El nivel de significación se considero siempre por debajo de 0.05.

RESULTADOS

Daño a DNA desnudo inducido por PM₁₀ de la Ciudad de México (Norte, Centro y Sur)

Para evaluar si las PM₁₀ de la Ciudad de México inducen daño a DNA y el mecanismo mediante el cual lo inducen se utilizó DNA desnudo de células Balb-C 3T3 y se expusieron a PM₁₀ del Norte [5, 10 y 160 µg/mL] a Centro y Sur [5, 80 y 160 µg/mL] en presencia y ausencia de 1mM H₂O₂. Las partículas de la Ciudad de México inducen degradación de DNA solo en presencia de H₂O₂ como se muestra en la Fig 3 (H₂O₂) Las partículas del Monte Santa Helena [160 µg/mL] no inducen ningún tipo de daño ni en presencia, ni en ausencia de H₂O₂ ya que estas partículas no contienen metales. Como testigo positivo de daño oxidante estrés se utilizó una reacción tipo Fenton en la cual se usó CuSO₄ [5mM] H₂O₂ 1mM] y esta fue capaz de degradar completamente el DNA. Las partículas del Norte degradan el DNA a partir de 10 µg/mL de PM₁₀ demostrando una potencia mayor que las partículas del Centro en donde la degradación del DNA se observó a partir de los 80 µg/mL, si bien para la zona Sur se empieza haber una degradación a partir de los 80 µg/mL es menor que para Centro en esta misma concentración y a partir de 160 µg/mL se observa una degradación contundente, por lo tanto esta degradación es dependiente de la zona (Fig 3) y se observó que las partículas del Norte tiene mayor potencia que Centro y Sur, correlacionando con el contenido de metales presentes en las partículas de cada zona según los datos reportados por Bonner 1998 (Tabla 1) el mecanismo

mediante el cual las PM's inducen daño a DNA desnudo es mediante la participación de una reacción tipo Fenton, y el daño solo ocurrió en presencia de H₂O₂ y entre mayor es el contenido de metales mayor es el daño al DNA. El gradiente de daño se presentó N>C>S.

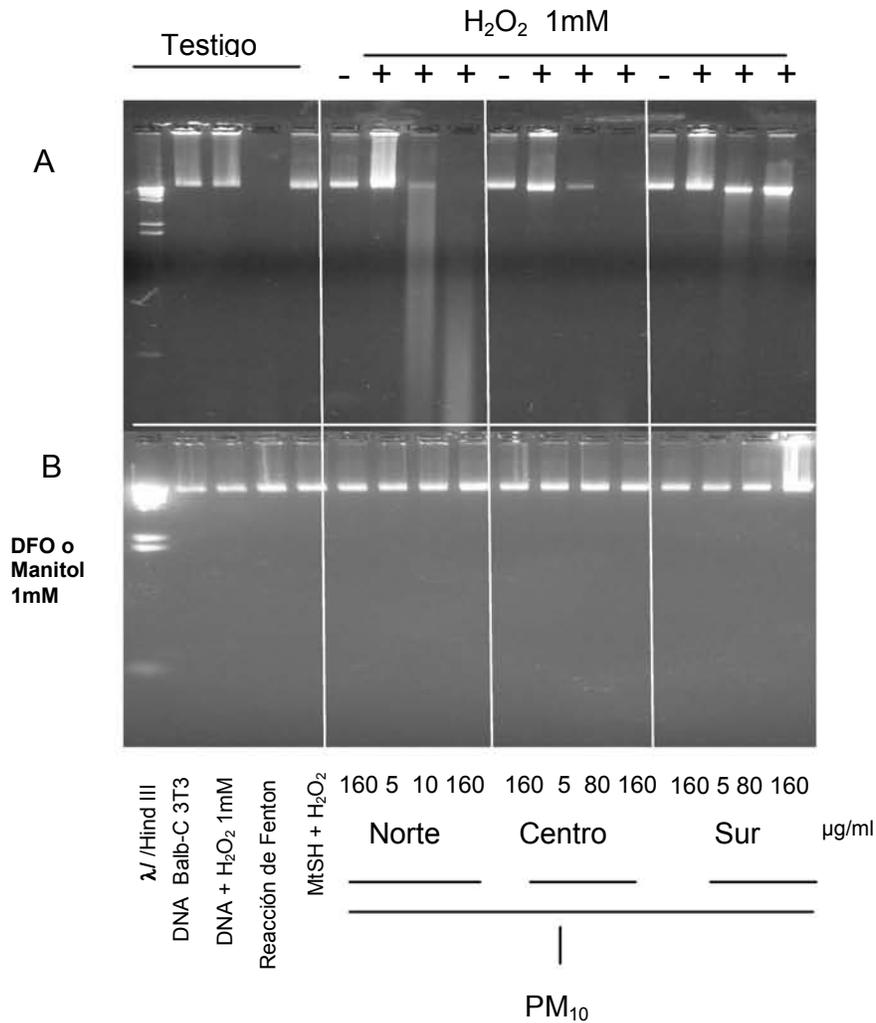


Fig. 3. Degradación de DNA desnudo de células Balb-C 3T3 por PM₁₀ de tres zonas diferentes de la Ciudad de México. (A) Gel de agarosa al 1.5 % con 400 ng de DNA expuesto a PM₁₀ Norte [5,10 y 160 µg/mL], Centro y Sur [5, 80 y 160µg/mL], por 24 h en presencia o ausencia de H₂O₂. (B) Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra el resultado de la incubación del DNA con las PMs en presencia de manitol o deferoxamina (1mM).

Por otro lado, cuando el DNA es incubado con un atrapador de radicales libres (manitol) y un quelante de metales (DFO), las PM's fueron incapaces de inducir daño al DNA (Fig 3 a y b), debido a que ambos compuestos protegieron al DNA, nosotros podemos decir que el daño de las PM's es dependiente de metales y de estrés oxidante.

Daño a DNA de células Balb-C 3T3 inducido por PM₁₀ de la Ciudad de México (Ensayo Cometa)

Para evaluar si las PM₁₀ de la Ciudad de México son capaces de causar daño al DNA en células en cultivo, se utilizó el ensayo cometa. Las células Balb-C 3T3 se expusieron a 20 µg/mL de PM₁₀ de las tres diferentes zonas. Las PM's de la Ciudad fueron capaces de inducir daño al DNA de las células. Se encontró que las partículas del Norte inducen mayor daño al DNA (presentan las colas más largas con un valor en la mediana de 53.95 µm) a diferencia de las partículas de Centro y Sur con 44.12 µm y 21.16 µm respectivamente (Fig. 4a y b). Las diferencias que se encontraron con respecto al testigo son significativos para las tres zonas ya que presentaron valor de $p < 0.05$ (N,C, y S $p_v=0001$), evaluado mediante el análisis de ANOVA (Bonferroni, $p<0.05$). Si bien nosotros no evaluamos los cometas en porcentaje podemos decir que si hay diferencias entre los diferentes tratamientos.

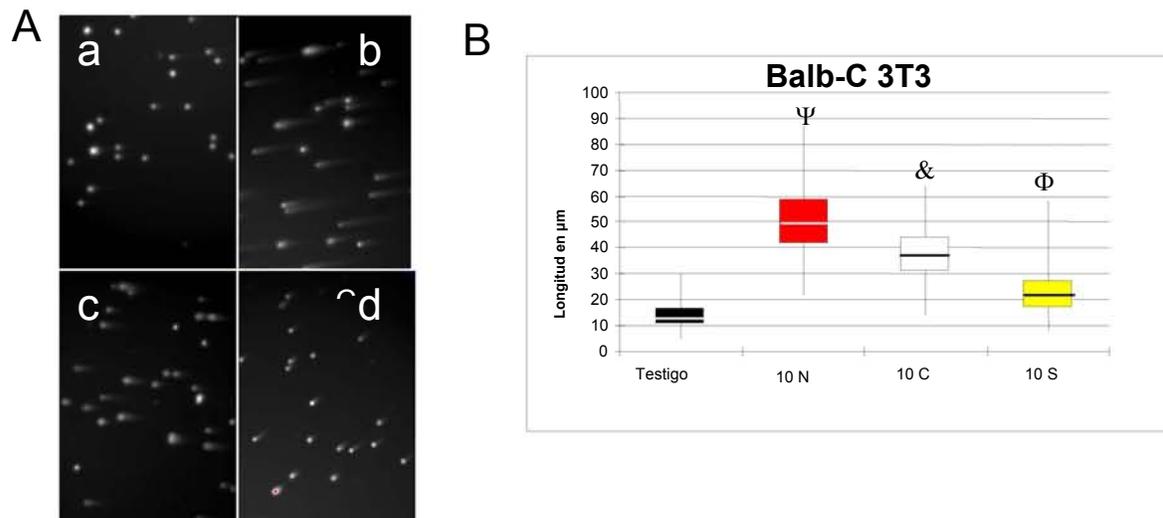


Fig 4. Distribución de la longitud de los cometas de células de Balb-C 3T3 expuestas 24 h a 20 µg/mL de PM₁₀ de tres zonas de la Ciudad de México. (A) Electroforesis de las células: (a) células sin exponer, (b) células expuestas a PM₁₀ del Norte (c), células expuestas a PM₁₀ del Centro (d) y células expuestas a PM₁₀ del Sur (d). (B) Representación gráfica de la distribución de la longitud de los cometas expresada como medianas, máximos y mínimos y percentiles 25 y 75. Los valores de p para las tres zonas con respecto al testigo fueron de 0.001 ($p < 0.05$) evaluado mediante ANOVA Ψ Norte con un valor de $p < 0.05$, de igual forma en & Centro y Sur Φ muestra un valor significativo con respecto al testigo.

Oxidación de DNA (8-oxo-dG) por PM₁₀ de la Ciudad de México

Para evaluar si las PM₁₀ de la Ciudad de México producen daño oxidante en DNA de células se determinó la inducción de aductos de 8-oxo-dG. Para ello se expusieron células Balb-C 3T3 adheridas a 20 µg/mL de PM₁₀ correspondiente a las tres diferentes zonas de la Ciudad de México por 24 h. De las células expuestas se extrajo el DNA y los aductos de oxígeno de 8-oxo-dG se evaluaron mediante HPLC. En esta evaluación se observó que las PM₁₀ del Sur inducen

mayor formación de aductos de 8-oxo-dG con un valor de 33.28 que las del Centro con 21.69 y las del Norte 13.03 (Fig 5). Estos resultados no tienen una relación con el contenido de metales, pero si presentan un gradiente similar al de (LPS) Lipopolisacáridos (Tabla 2).

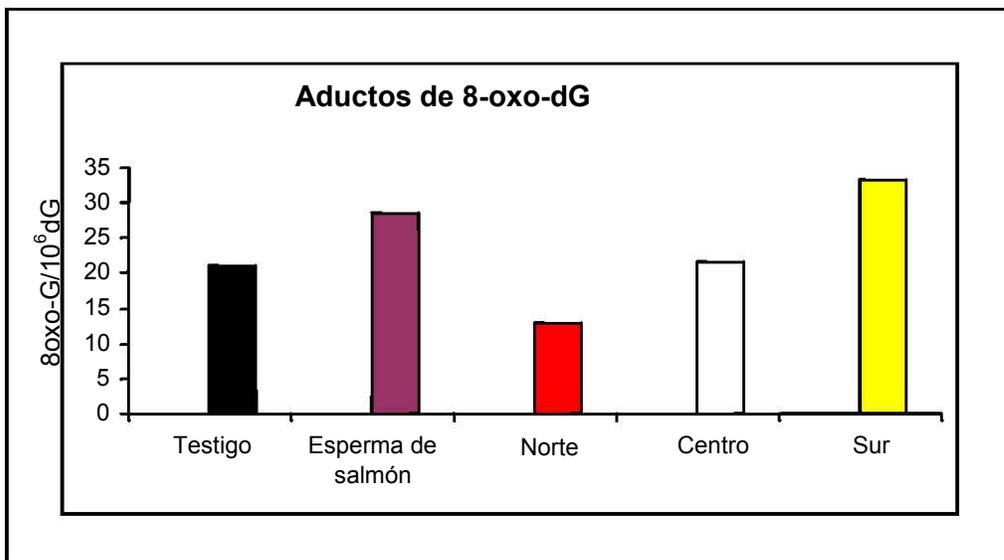


Figura 5. Determinación de bases oxidadas de 8-oxo-dG en células Balb-C 3T3 mediante HPLC
Las células se expusieron a 20 µg/mL por 24 h

DISCUSIÓN

En los últimos años estudios epidemiológicos reportan asociaciones en el incremento de PM₁₀ con efectos en la salud humana (Pope *et al.*, 2004), pero poco se sabe de los mecanismos que llevan a esta asociación. Dentro de los mecanismos se ha propuesto que el estrés oxidante es un mediador importante del daño inducido por las partículas a las células. Dentro de los componentes de las partículas los metales, juegan un papel muy importante; Bonner (1998) reporto que las PM₁₀ contienen metales de transición como Fe, Cu, Ni, V, Pb Zinc y encontró que estos metales se encuentra con un gradiente (N > C > S) en contenido de metales. Este gradiente de metales coincide con la degradación al DNA observada en este trabajo (Fig 3).

Debido a que las partículas degradan al DNA solo en presencia de peróxido de hidrógeno, este daño está dado por la generación de daño oxidante vía reacción de Fenton y Fenton "like" para metales diferentes a Fe. La degradación fue dependiente de la zona de colecta en norte, centro y sur, este patrón de degradación coincide con la concentración de metales de estas partículas.

La utilización de manitol atrapador de radicales hidroxilo y deferoxamina quelante de Fe⁺³ (Gilmour *et al.*, 1996) protegen al DNA de la degradación inducida por las PM's lo cual fortalece la hipótesis de que las partículas inducen una degradación de DNA mediante la participación de reacción tipo Fenton (Stohs y Bagchi, 1995)

Por otro lado las PM's también inducen daño al DNA en células intactas (Fig 4) y al igual que en DNA desnudo este daño presentó una correlación con el contenido de metales (Tabla 2)

En otros estudios (Roosli *et al.*, 2000) donde se utilizan las PM's de diferente sitios en la ciudad de Suiza observamos daño en la misma proporción, a diferencia de nuestros resultados, ya que nosotros encontramos una respuesta diferente dependiente de la zona de colecta en una misma ciudad y diferencias en efecto y composición de las PM's (Fig 3 y 4)

La oxidación de bases en 8-oxo-dG es un indicador de daño oxidante muy estudiado además de ser un importante marcador de mutagenesis (Lawrence *et al.*, 2000), nosotros observamos que las PM's inducen aductos de 8-oxo-dG lo cual nos sugiere que las PM's podrían ser mutagénicas. En (1995) Villalobos-Pietrini *et al.*, determinó que las PM's son mutagénicas, nuestros resultados son diferentes ya que las del Sur inducen más 8-oxo-dG, pero los años de colecta son diferentes.

Las PM's de la Ciudad de México inducen la formación de 8-oxo-dG en DNA pero este no correlaciona con el gradiente de metales, si bien nosotros observamos un comportamiento parecido al contenido de endotoxina (Tabla 2), nosotros no podemos pensar que es dependiente de esta, pero para ello necesitamos la realización de más ensayos.

Aunque la formación de 8-oxo-dG no coincidió con el contenido de metales, no podemos descartar la posibilidad de que algunos metales estén jugando un papel importante en este evento.

En estudios en donde se analiza formación de aductos 8-oxo-dG por PM₁₀ se muestra que la hidroxilación de dG se asocia con el contenido de metales

solubles especialmente Fe y V aunque no se descarta la posibilidad de metales insolubles que lleven a cabo la reacción de Fenton (Valavanidis *et al.*, 2005).

La composición diferencial de las partículas de la Ciudad de México también nos podría explicar el efecto de oxidación por 8-oxo-dG, en cultivos celulares se ha visto que puede influir la contribución endógena de H₂O₂ para inducir la formación 8-oxo dG ya que estas células muestran daño oxidante sin peróxido extracelular (Shi *et al.*, 2006). Las especies reactivas de oxígeno contribuyen a procesos oxidantes en DNA que conllevan a un riesgo de cáncer por mecanismos dentro de los cuales se incluyen proliferación celular, apoptosis, daño a enzimas de reparación, peroxidación lipídica y lesiones en las bases de DNA. Estudios como este nos muestran la importancia que tienen los metales de transición incluidos en las PM₁₀, por lo que es necesario, por una parte conocer más detalladamente la composición de las partículas y diseñar estudios con la finalidad de identificar su asociación con efectos biológicos, ya que es de suma importancia entender mejor el efecto de la contaminación en la salud del ser humano.

La vía más común para la generación de radicales libres es la vía aeróbica, pero otra fuente es la reacción de Fenton en donde la reducción del H₂O₂ genera radicales hidroxilo por la presencia de un metal de transición, ya se han endógenos ó exógenos La observación de daño al DNA por presencia de metales se muestra en un estudio en donde se compara la capacidad para generar daño al DNA medido por el ensayo cometa y la formación de aductos 8-oxo-dG. (Knaapen *et al.*, 2002). Estos autores demuestran que el material

particulado en presencia de H_2O_2 provoca daño al DNA y que el peróxido por sí solo no daña al DNA. Al utilizar deferoxamina y catalasa se aprecia una disminución denotando la importancia de los metales en inducir la formación de radicales libres (Knaapen *et al*, 2002). Nuestros resultados claramente muestran que el daño al DNA está dado por metales (*in vivo*), y que estos mismos estén generando daño al DNA (*in vitro*).

En la Ciudad de México las partículas tienen una composición diferente en cada zona de muestreo. Recientemente se ha visto que la composición de las PM_{10} juegan un papel importante en la inducción del efecto genotóxico. (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002) En un sistema celular observamos que debido a esta composición por zonas el efecto mostrado se presenta con un mayor índice de daño en centro que sur y que, cuando comparamos este daño observamos que no solo está asociado al contenido de metales si no que podría estar asociado al contenido de material orgánico como lo son los hidrocarburos poli-cíclicos aromáticos (Calderón-Segura *et al.*, 2004).

Las PM_{10} contienen metales de transición, los cuales se sabe inducen la formación 8-OHdG vía reacción de Fenton en presencia de H_2O_2 . (Shi *et al.*, 2006) Este mismo autor muestra que las partículas PM_{10} y $PM_{2.5}$ en DNA y en cultivo celular A549 células epiteliales humanas observa daño oxidante a las dos horas.

DISCUSIÓN

En los últimos años estudios epidemiológicos reportan asociaciones en el incremento de PM_{10} con efectos en la salud humana (Pope *et al.*, 2004), pero poco se sabe de los mecanismos que llevan a esta asociación. Dentro de los mecanismos se ha propuesto que el estrés oxidante es un mediador importante del daño inducido por las partículas a las células. Dentro de los componentes de las partículas los metales, juegan un papel muy importante; Bonner (1998) reporto que las PM_{10} contienen metales de transición como Fe, Cu, Ni, V, Pb Zinc y encontró que estos metales se encuentra con un gradiente (N> C> S) en contenido de metales. Este gradiente de metales coincide con la degradación al DNA observada en este trabajo (Fig 3).

Debido a que las partículas degradan al DNA solo en presencia de peroxido de hidrógeno, este daño está dado por la generación de daño oxidante vía reacción de Fenton y Fenton "like" para metales diferentes a Fe. La degradación fue dependiente de la zona de colecta en norte, centro y sur, este patrón de degradación coincide con la concentración de metales de estas partículas.

La utilización de manitol atrapador de radicales hidroxilo y deferoxamina quelante de Fe^{+3} (Gilmour *et al.*, 1996) protegen al DNA de la degradación inducida por las PM 's lo cual fortalece la hipótesis de que las partículas inducen una degradación de DNA mediante la participación de reacción tipo Fenton (Stohs y Bagchi, 1995)

Por otro lado las PM 's también inducen daño al DNA en células intactas (Fig 4) y al igual que en DNA desnudo este daño presentó una correlación con el contenido de metales (Tabla 2)

En otros estudios (Roosli *et al.*, 2000) donde se utilizan las PM's de diferente sitios en la ciudad de Suiza observamos daño en la misma proporción, a diferencia de nuestros resultados, ya que nosotros encontramos una respuesta diferente dependiente de la zona de colecta en una misma ciudad y diferencias en efecto y composición de las PM's (Fig 3 y 4)

La oxidación de bases en 8-oxo-dG es un indicador de daño oxidante muy estudiado además de ser un importante marcador de mutagenesis (Lawrence *et al.*, 2000), nosotros observamos que las PM's inducen aductos de 8-oxo-dG lo cual nos sugiere que las PM's podrían ser mutagénicas. En (1995) Villalobos-Pietrini *et al.*, determinó que las PM's son mutagénicas, nuestros resultados son diferentes ya que las del Sur inducen más 8-oxo-dG, pero los años de colecta son diferentes.

Las PM's de la Ciudad de México inducen la formación de 8-oxo-dG en DNA pero este no correlaciona con el gradiente de metales, si bien nosotros observamos un comportamiento parecido al contenido de endotoxina (Tabla 2), nosotros no podemos pensar que es dependiente de esta, pero para ello necesitamos la realización de más ensayos.

Aunque la formación de 8-oxo-dG no coincidió con el contenido de metales, no podemos descartar la posibilidad de que algunos metales estén jugando un papel importante en este evento.

En estudios en donde se analiza formación de aductos 8-oxo-dG por PM₁₀ se muestra que la hidroxilación de dG se asocia con el contenido de metales solubles especialmente Fe y V aunque no se descarta la posibilidad de metales insolubles que lleven a cabo la reacción de Fenton (Valavanidis *et al.*, 2005).

La composición diferencial de las partículas de la Ciudad de México también nos podría explicar el efecto de oxidación por 8-oxo-dG, en cultivos celulares se ha visto que puede influir la contribución endógena de H_2O_2 para inducir la formación 8-oxo dG ya que estas células muestran daño oxidante sin peróxido extracelular (Shi *et al.*, 2006). Las especies reactivas de oxígeno contribuyen a procesos oxidantes en DNA que conllevan a un riesgo de cáncer por mecanismos dentro de los cuales se incluyen proliferación celular, apoptosis, daño a enzimas de reparación, peroxidación lipídica y lesiones en las bases de DNA. Estudios como este nos muestran la importancia que tienen los metales de transición incluidos en las PM_{10} , por lo que es necesario, por una parte conocer más detalladamente la composición de las partículas y diseñar estudios con la finalidad de identificar su asociación con efectos biológicos, ya que es de suma importancia entender mejor el efecto de la contaminación en la salud del ser humano.

La vía más común para la generación de radicales libres es la vía aeróbica, pero otra fuente es la reacción de Fenton en donde la reducción del H_2O_2 genera radicales hidroxilo por la presencia de un metal de transición, ya se han endógenos ó exógenos. La observación de daño al DNA por presencia de metales se muestra en un estudio en donde se compara la capacidad para generar daño al DNA medido por el ensayo cometa y la formación de aductos 8-oxo-dG. (Knaapen *et al*, 2002). Estos autores demuestran que el material particulado en presencia de H_2O_2 provoca daño al DNA y que el peróxido por sí solo no daña al DNA. Al utilizar deferoxamina y catalasa se aprecia una disminución denotando la importancia de los metales en inducir la formación de radicales libres (Knaapen *et al*, 2002). Nuestros resultados claramente

muestran que el daño al DNA esta dado por metales (*in vivo*), y que estos mismos estén generando daño al DNA (*in vitro*).

En la Ciudad de México las partículas tienen una composición diferente en cada zona de muestreo. Recientemente se ha visto que la composición de las PM_{10} juegan un papel importante en la inducción del efecto genotóxico. (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002) En un sistema celular observamos que debido a esta composición por zonas el efecto mostrado se presenta con un mayor índice de daño en centro que sur y que, cuando comparamos este daño observamos que no solo está asociado al contenido de metales si no que podría estar asociado al contenido de material orgánico como lo son los hidrocarburos poli-cíclicos aromáticos (Calderón-Segura *et al.*, 2004).

Las PM_{10} contienen metales de transición, los cuales se sabe inducen la formación 8-OHdG vía reacción de Fenton en presencia de H_2O_2 . (Shi *et al.*, 2006) Este mismo autor muestra que las partículas PM_{10} y $PM_{2.5}$ en DNA y en cultivo celular A549 células epiteliales humanas observa daño oxidante a las dos horas.

CONCLUSIONES

1.- Al evaluar el daño producido por el estrés oxidante, observamos la participación de una reacción tipo Fenton, mediante la cual los metales están mediando la generación de radicales con capacidad de dañar el DNA; ya que al incubar con manitol un antioxidante y deferoxamina un quelante de metales; ambos presentan un efecto protector para las tres zonas en el DNA, corroborando una reacción de Fenton.

2.- En el estudio *in vitro* analizado por el ensayo cometa. Se obtuvieron resultados muy similares ya que el mayor fue mayor con partículas del norte seguidas de centro y sur.

3.- Para el caso de la oxidación de 8-oxo-dG ésta muestra una tendencia marcada de lo que sucede con LPS en donde los resultados son muy similares.

De manera general podemos concluir que el mecanismo por el cual las PM's inducen daño ésta mediado por estrés oxidante vía reacción tipo Fenton

APÉNDICE

Tabla 1.-Contenido de metales de transición de PM₁₀ de la Ciudad de México y Monte Sta Helena (MSHA)

Zona	Metales totales de las PM ₁₀ en µg/mg
Norte	14.615
Centro	7.386
Sur	6.504
MSHA	1.279

*Tabla tomada de Bonner 1998, el contenido de metales está expresado en µg/mg

Tabla 2.-Contenido de LPS en las PM₁₀ de las zonas de la Ciudad de México y Monte Sta Helena

Zona	Concentración Promedio (Rango)
Norte	10.8 (0.0053 ± 0.0163)
Centro	11.3 (0.0041 ± 0.0184)
Sur	17.8 (0.0153± 0.0206)
MSHA	0.0

Evaluaciones expresadas en ng/mg

*Tabla tomada de Bonner *et al.*, 1998

BIBLIOGRAFÍA

1. Agasanur K., Parlad., Inmon J., Andrew J., Gallagher E (2000). Enhancement of 2' Deoxyguanosine Hydroxylation and DNA damage by coal and oil fly ash in relation to particulate metal content and availability. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 1011-1019
2. Alfaro ME (1996). Efecto tóxico de las partículas PM₁₀ provenientes de tres zonas de la Ciudad de México en diferentes líneas celulares. Encuentro Nacional de investigadores de la Secretaría de Salud.
3. Alfaro Moreno., Martínez L., García C., Bonner C., Clifford Murray J., Rosas I., Rosales SP., Osornio Vargas AR (2002). Biologic effects induced *in vitro* by PM₁₀ from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect.* 110: 715-720
4. Ariza E., Bijar G., Williams M (1999). Environmental Metal Pollutants, Reactive oxygen intermediaries and genotoxicity: Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity. Ed. Kluwer Academic Publishers. E.E. U.U. pp 189
5. Bagchi D., Stohs J (1995). Oxidative Mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* 18(2): 321-336
6. Brauer M., Avila-Casado C., Fortoul TI., Vedal S., Stevens B., Churg A (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect.* 109:1039-43
7. Borja-Aburto VH., Castillejos M., Gold DR., Bierzwinski S., Loomis D (1998). Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ Health Perspect.* 106:849-55
8. Bonner JA., Rice P., Brien P., Dreher K., Rosas I., Alfaro E., Osornio A (1998). Inductions of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19:672-680
9. Calderón-Segura ME., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Butterworth FM., Amador-Muñoz O (2004). The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytotoxicity, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutation Research.* 558 (1-2): 7-17
10. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Información (INEGI) II Censo de población y vivienda 2005. México D. F.

11. Cometravi J (1997). Estrategia integral del transporte y calidad del aire para la zona metropolitana del valle de México. Estudios 5: Definición de políticas de modernización, inspección, sustitución y eliminación. Definitiva de vehículos de transporte y combustible alternos.
12. Delgado-Rodríguez A., Ortiz Martelo R., Villalobos-Pietrini R (1999). Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Chemosphere. 39:33-43
13. Doran J., Abbott J., Archuleta X., Bian J., Chow R., Edgerton S., Elliot S., Fernandez A., Fast J., Hube J., King C., Langley D., Leach J., Lee J., Martín D., Martinez D.M, Martinez J., Mercado G., Mora V., Mulhearn M., Pena J., Pttly R., Porch W., Russell C., Salas R., Shannon J., Shaw W., Sosa G., Tellier L., Templeman B., Watson J., Ehite R., Whiteman C., Wolfe D (1998). The IMADA-VER boundary layer experiment in the México City Area. Bull. Am. Meterological Soc. 79(11): 2497-2508
14. Donaldson K., Stone V., Borm PJ, Jimenez LA., Gilmour PS., Schins RP., Knaapen AM., Rahman I., Faux SP., Brown DM., MacNee W (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). Free Radic Biol Med. 1 (34):1369-82
15. Delfino J., Sioutas C., Malik S (2005). Potencial role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. Environ Health Perspectiv. 113: 934-942
16. Fortoul TL., Osorio LS., Tovar AT., Salazar D., Castilla ME., Olaiz-Fernandez (1996). Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents: comparison of cases from the 1950s and the 1980s. Environ Health Perspectiv. 104: 630-632
17. Gilmour P., Paul H Besswick., David M. Brown., Donaldson K (1995). Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled ϕ X174 RFI plasmid DNA. Carcinogenesis. 16: 2973-2979
18. Gilmour P., Brown F., Lindsay TG., Beswick PH., MacNee W., Donaldson K (1996). Adverse health effect of PM₁₀ particles: involvement of iron generation of hidroxil radial. Occupa Envirom Med. Dec. 53:817-822
19. Gilmour P., Rahman I., Hayashi S., Hongg J., Donaldson K., Macnee W (2001) Adenoviral E1A primes alveolar epithelial cells to PM₁₀ induced transcription of interleukin-8. America Journal Physiol Lung Cell Mol Physiol 281: 598 -606

20. García-Cuellar C., Alfaro-Moreno E., Martínez-Romero F., Ponce de León-Rosales S., Rosas I., Pérez-Cárdenas E., Osornio-Vargas AR (2002) DNA damage induce by PM₁₀ from different zones of México City. Annual Occupational Hygiene Society. (46) 1: 412-428
21. Ghio J., Silbajoris R., Carson J., Sament M (2002). Biologic Effects of Oil Fly Ash. Environl Health Perspectiv. 110: 89 -94
22. Gutiérrez-Castillo M., Rubicek AD., Cebrián-García ME., Vizcaya-Ruiz D., Sordo-Cedeño M., Ostrosky-Wegman P (2006). Effect of Chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. Environ Mol Mutagen. 47: 000-000 In press
23. Huang X., Powell J., Mooney L.A., Li C., Frenkel K (2001). Importance of complete DNA digestion in minimizing variability of 8-oxo-dG analyses. Free Radic Biol Med. 31:1341-1351
24. Jiménez Cisneros Blanca (2001). La contaminación ambiental en México causas y consecuencias. 1era Edición Editorial Limusa. pp 549
25. Jeen Woo Park y Robert A Folyd (1994). Generation of strand breaks and formation of 8-hidroxy-2-deoxyguanosine in DNA by a thiol/Fe³/O₂ –Catalyzed oxidation system. Archives of Biochemistry and Biophysics. 312 (1): 285-291
26. Karlsson H., Nigren J., Möller L (2004). Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell–particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. Mutation Research. 565 (1) 1-10
27. Knaapen M., Tingming Shi., Borm J A., Schins P.F (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. Molecular and Cellular Biochemistry. 234: 3127-326
28. Lang L (1996). Danger in the dust. Environ. Health Perspectiv. 104 (1): 26-30
29. Lawrence JM (2000). Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 21: 361-370
30. Levy D., Sheppard L., Checkoway H., Kaufman J., Lumley T., Koenig J., Siscovick D (2001). A case-crossover analysis of particulate matter air pollution and out-of-hospital primary cardiac arrest. Epidemiology. 12(2):193-9
31. Li WY., Gilmour PS., Donaldson K., MaNee W (1996). Free radical activity and proinflammatory effects of particulates air pollution (PM₁₀) *in vivo* and *in vitro*. Thorax. 51:1216-1222

32. Llórente J (1989). Los patrones de evolución sistemática en México. Revista ciencias (compilador) N° 3
33. Lloyd DR., Philips DH (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and Nickel (II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-estrans breaks, 8-hidroxideoxiguanosine and putative intrastrand cross-links. Mutation Research. 424 (1-2): 23-36
34. McKelewy M., Green M., Schemezzer P., De Meo M., Collins A (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay) A European Review. Mutation Research. 288: 63-74
35. Miranda J., Crespo L., Morales A (2000). Absolute principal component analisis of atmospheric aerosols in Mexico City. Environ. Sci & Pollut. Res. 7: 1-5
36. Miranda J., Barrera V., Espinosa A., Galindo O., Meinguer J (2005). PIXE análisis of atomospheric aerosols in Mexico City. X-RAY Spectrometry. 34: 315-319
37. Nair U., Bartsch H., Nair J (2003). Prevention of degenerative diseases; clues from studies investigating oxidative stress. Mutagenesis. 18 (5):477-83
38. Philips D., Castegnaro M., Batch H (1993). Post-labering methods for the deletion of DNA damage: IARC Scientific Publication, IARC Lyon.
39. Osornio-Vargas AR., Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuéllar C., Rosales SP., Miranda JC., Rosas I (2003). Proinflammatory and Citotoxic Effects of Mexico City air pollution particulate matter *in vitro* are dependent on particle size and composition. Environmental Health Perspect. 111: 1289-1295
40. Pope CA., Burnett R., Thun M., Calle E.E (2003). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 287 (9):1132-1141
41. Pope CA., Burnett RT., Thurston GD., Thun MJ., Thuston G.D., Calles E.E., Krewski D., Godleski J J (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. Circulation. 109 (1):71-7
42. Rison Lotte., Moller P., Loft S (2005) Oxidative Stress-induced DNA damage by particulate air pollution. Mutation Research. 592: 119-137

43. Rosas I., McCartney H., Payne R., Calderón C., Lacey J., Chapela R., Ruiz-Velazco (1998). Analysis of the relationships between environmental factors (aeroallergens, air pollution, and weather) and asthma emergency admissions to a hospital in Mexico City. *Allergy*. 53(4):394-401
44. Rosas I., Yela A., Salinas E., Arreguín R., Rodríguez-Romero A (1995). Preliminary assessment of prein associated with airborne particles in Mexico City. *Aerobiologia*. 11:81-86
45. Rosas I., Ruiz G, Raga G., Miranda J., Oleschko C., Castillejos M., Retama A., Osornio-Vargas AR (2004) Evaluation of the Relationship composition-Toxicity of PM₁₀ and PM_{2.5} in Three Zones of Mexico City, Final Report to The Comisión Ambiental Metropolitana and Massachussets Institute of Technology. Universidad Nacional Autónoma de México: México City.
46. Rossly M., Braun- Fahrlander., Kunzli N., Oglesby L., Theis G., Camenzind M., Staehelin J (2000) Spatial variability of different fractions of particulate matter within an urban environment and between urban and rural sites. *J Air Waste Manag Assoc*. 50(7): 1115-1124
47. Sánchez-Carrillo CI., Ceron-Mireles P., Rojas-Martínez MR., Mendoza-Alvarado L., Olaiz-Fernández G., Borja-Aburto VH (2004). Surveillance of acute health effects of air pollution in Mexico City. *Inhal Toxicol*. 16 Suppl 1:55-8
48. Shi T., Knaapen M., Gegerow J., Birmili W., Borm A., Schins F (2006) Temporal variation of hidroxil radical generation and 8-hidroxy-2-deoxyguansine formation by coarse and fine particulate matter. *Occup Environ Med* (in press)
49. Sorensen M., Schins R., Hertel O., Loft S (2005) Transition metals in personal samples of PM_{2.5} and oxidative stress in human volunteers. *Can Epi Biomarkers Prev*. 14 (5):1340-1343
50. Suárez M (1991). *Información Científica y Tecnológica*. 11: 183-206
51. Waris G y Ahsan H (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinogenesis*. 11: 2-28
52. Valavanidis A., Vlahoyianni T., Frotakis k (2005) Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radical Res*. 39: 1071-81

53. Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Masur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160: 1-40

54. Villalobos-Pietrini., Salvador B., Gomez-Arroyo S (1995). Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmospheric Environ.* 29:517-524

55. Zelikoff JT., Daisey JM., Traul KA., Kneip TJ (1985). Balbc/3T3 cell transformation response to extracts of organic air samples as seen by their survival in aggregate form. *Mutation Research.* 144:107-116