



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE ARDILLA GRIS
(*Sciurus aureogaster*) EN RESPUESTA A CONTAMINANTES
ATMOSFÉRICOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

MODALIDAD DE GRADUACIÓN POR TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JUAN CARLOS HERNÁNDEZ BARBOZA

DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DRA. NATALIA MANZANO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR. RAFAEL ÁVILA FLORES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

*A Nachita
que pese a tu nula instrucción,
me enseñaste demasiado...*

*Rosy y Mario
por darme la vida...*

*Alba, Tito y Beto
por su gran compañía...*

*a mis amigos y
a Pascal Eugéne Bergueyre Lagrange.*

*A orillas de la laguna, los sesenta brujos
se embadurnaron con el unguento mágico,
se dispusieron en círculo, formaron la cadena,
hicieron invocaciones y los conjuros,
y forzaron a las fuerzas superiores a
metamorfosearlos otra vez en fieras del monte.*

*Y he aquí sesenta animales, entre jaguares,
ocelotes, pumas, coyotes y gatos monteses,
corriendo días y días por montes, selvas
y desiertos, para salvar la enorme distancia
que existe entre Aztlán–Chicomoztoc y el cerro
de Coatepec ya cercano a México–Tenochtitlan.*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias de la Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM por aceptarme como alumno.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT – México) por ayudarme con su beca.

A mis asesores Gerardo Suzán Azpiri, Natalia Manzano León y Rafael Ávila Flores por aportar su tiempo y disposición para éste trabajo de investigación.

A las profesoras Alda Rocío Ortiz Muñiz, Edith Cortés Barberena y al Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, por brindarme su calidez y ayuda en la citometría de flujo, sin ustedes éste trabajo no sería realidad.

Al profesor Alejandro Corona Ambríz, del Departamento de Investigación en Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo, por sus asesorías en estadística.

Al profesor Manuel Weber del Colegio de la Frontera Sur Campeche por sus grandes ideas y aportaciones.

A los directores y responsables del Bosque de Chapultepec, Bosque de Aragón, Vivero de Coyoacán y Parque 18 de Marzo, donde se obtuvieron muestras biológicas.

INDICE

LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.....	10
2.2 EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.....	22
2.2.1 <i>Efectos genotóxicos de la contaminación atmosférica en poblaciones humanas</i>	23
2.2.2 <i>Efectos genotóxicos de la contaminación atmosférica en modelos animales</i>	24
2.3 LA PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA COMO INDICADOR DE GENOTOXICIDAD.....	25
2.4 LA ARDILLA GRIS COMO MODELO DE ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO.....	27
2.5 JUSTIFICACIÓN.....	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIAL Y MÉTODOS	37
6. RESULTADOS	47
7. DISCUSIÓN	69
8. CONCLUSIÓN	77
9. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	78
10. BIBLIOGRAFÍA	79
11. ANEXOS	96
ANEXO 1. MOSAICO DE LA CALIDAD DEL AIRE PARA PM _{2.5} ENTRE 2004 – 2011.....	96
ANEXO 2. TAXONOMÍA Y SUBESPECIES DE <i>S. AUREOGASTER</i>	97
ANEXO 3. TRADUCCIONES DE LA PALABRA “ARDILLA” EN DIFERENTES IDIOMAS.....	98
ANEXO 4. DISTRIBUCIÓN DE <i>S. AUREOGASTER</i> EN MÉXICO.....	99
ANEXO 5. REGISTROS DE LA ARDILLA GRIS (<i>S. AUREOGASTER</i>) EN MÉXICO.	100
ANEXO 6. POBLACIONES DE ARDILLA GRIS (<i>S. AUREOGASTER</i>) EN EL VALLE DE MÉXICO.....	103
ANEXO 7. TÉCNICA ESTANDARIZADA DE CONTEO DE MICRÓNÚCLEOS EN RETICULOCITOS.....	104

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros medidos en hembras y machos de ardilla gris	53
Cuadro 2. Morfometría de la ardilla gris (<i>S. aureogaster</i>)	55
Cuadro 3. Promedios celulares y de daño genotóxico de <i>S. aureogaster</i>	57
Cuadro 4. Matriz de correlaciones para las variables medidas.	60
Cuadro 6. Autovalores acumulativos*.	66
Cuadro 7. Eigenectores o vectores propios* del ACP.....	65
Cuadro 8. Promedios de contaminación atmosférica, IMC y daño genotóxico de	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ardilla gris (<i>S. aureogaster</i>).....	28
Figura 2. Estaciones de monitoreo atmosférico y poblaciones de ardillas	37
Figura 3. Regiones de análisis celular.....	42
Figura 4. Zonas celulares del análisis de micronúcleos.	43
Figura 5. Distribución de pesos <i>S. aureogaster</i> agrupados por género.	54
Figura 6. Distribución de IMC* de <i>S. aureogaster</i> de cuatro parques	56
Figura 7. Índice de citotoxicidad en <i>S. aureogaster</i>	58
Figura 8. Índice de genotoxicidad en <i>S. aureogaster</i>	59
Figura 9. Niveles de NO ₂ versus Citotoxicidad en <i>S. aureogaster</i>	61
Figura 10. Niveles de NOx versus Citotoxicidad en <i>S. aureogaster</i>	62
Figura 11. Niveles de PM ₁₀ versus Citotoxicidad en <i>S. aureogaster</i>	63
Figura 12. Niveles de O ₃ versus Genotoxicidad en <i>S. aureogaster</i>	64
Figura 13. Análisis de componentes principales para daño celular	67

RESUMEN

La contaminación atmosférica es un grave problema a nivel mundial, que provoca alteraciones en la salud a nivel sistémico y celular de tipo tóxico, como las rupturas del ADN que pueden verse en forma de micronúcleos en los reticulocitos. La Ciudad de México, una de las urbes más grandes del mundo, constantemente rebasa los niveles permisibles de contaminación atmosférica que desencadenan efectos deletéreos en sus habitantes. La ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), es una especie endémica de México que ha sido propuesta como modelo de estudio eco toxicológico. El objetivo de la presente investigación fue determinar la relación entre los niveles de contaminación atmosférica y genotoxicidad (incidencia de micronúcleos/reticulocitos) de *S. aureogaster* de cuatro zonas de la Ciudad de México. Se realizó un total de 80 capturas de *S. aureogaster* del Bosque de Aragón, Bosque de Chapultepec, Parque 18 de Marzo y Viveros de Coyoacán entre marzo y mayo de 2013. A cada ardilla se le determinó morfometría e incidencia de micronúcleos/reticulocitos de un conteo de 500,000 eventos celulares, mediante la técnica de citometría de flujo usando el anticuerpo CD71–anti rata. Se realizaron correlaciones y un Análisis de Componentes Principales entre los niveles *in situ* de CO, NO_x, NO, NO₂, O₃, PM₁₀, PM_{2.5} y SO₂, *versus* el daño genotóxico por individuo. Se encontró que el daño citotóxico estuvo correlacionado significativamente con los contaminantes NO₂ NO_x y PM₁₀ mientras que el daño genotóxico estuvo correlacionado con el O₃. Se concluye que la contaminación atmosférica de la Ciudad de México provocó genotoxicidad en *S. aureogaster*, principalmente en el Bosque de Aragón y Viveros de Coyoacán.

Palabras clave: genotoxicidad, *S. aureogaster*, ardilla gris, contaminación, México.

ABSTRACT

Air pollution is a serious problem worldwide, causing toxic changes in health to systemic and cellular levels, as DNA breaks that may be in form of micronuclei in reticulocytes. Mexico City, one of the largest cities in the world, consistently exceeded the permissible levels of air pollution that trigger deleterious effects on its inhabitants. The gray squirrel (*Sciurus aureogaster*), is endemic to Mexico that has been recently proposed as a model of eco toxicological study. The aim of this investigation was to determine the relationship between air pollution levels and genotoxicity (incidence micronucleus/reticulocytes) of *S. aureogaster* of four areas of Mexico City. A total of 80 catches of *S. aureogaster* of Bosque de Aragón, Bosque de Chapultepec, Parque 18 de Marzo and Viveros de Coyoacán was conducted between March and May 2013. For each squirrel was determined morphometry and incidence of micronuclei/reticulocyte of 500,000 counts cellular events using the technique of flow cytometry and CD71 antibody anti-rat. Correlations and Principal Component Analysis between *in situ* levels of CO, NO_x, NO, NO₂, O₃, PM₁₀, PM_{2.5} and SO₂ versus genotoxic damage per individual were performed. It was found that the cytotoxic damage was significantly correlated with NO_x and NO₂ pollutants PM₁₀ while genotoxic damage was correlated with O₃. It is concluded that air pollution in Mexico City caused genotoxicity in *S. aureogaster*, mainly in the Bosque de Aragon and Viveros de Coyoacán.

Key Words: genotoxicity, *S. aureogaster*, grey squirrel, pollution, Mexico.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es un problema global concerniente a emisiones naturales y humanas (Villalobos–Pietrini *et al.*, 2011; Molina y Molina, 2004). Las grandes urbes son los sitios con mayor contaminación debido a su acelerado crecimiento poblacional, uso de automóviles e industrialización (SIMAT, 2013; Guzmán–Morales, *et al.*, 2011; Blake y Sherwood, 1997). En la Ciudad de México se han incrementado los niveles de contaminación atmosférica debido a las proporciones demográficas y de servicios que ahí alberga (Molina y Molina, 2004).

La contaminación atmosférica tiene influencias negativas en los individuos expuestos, alterando su salud (SIMAT, 2013; Rosales–Castillo *et al.*, 2001). Existen diversos estudios que relacionan los niveles de contaminación atmosférica con un aumento en el número de ingresos a las salas de emergencias, baja en la productividad por ausencia al trabajo, problemas respiratorios como rinitis, conjuntivitis (INECC, 2014) hasta arterosclerosis (Kunzli *et al.*, 2010) y finalmente un mayor riesgo de muerte (O’Neill *et al.*, 2005). En los últimos años, se ha encontrado que los contaminantes atmosféricos tienen efectos citotóxicos en linfocitos, eritrocitos y cultivos celulares (Calderón–Ezquerro *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2003).

La ardilla gris (*Sciurus aureogaster*) es un buen modelo de estudio ecotoxicológico que puede aportar importantes hallazgos *in situ* (Zúñiga–González *et al.*, 2001a).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la asociación entre la contaminación atmosférica y la presencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de *S. aureogaster* de cuatro parques de la Ciudad de México.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica es un problema global concerniente a emisiones naturales y humanas (Villalobos–Pietrini *et al.*, 2011; Molina y Molina, 2004). El cincuenta por ciento de la población mundial y aproximadamente el 90% de la población rural en los países en desarrollo utilizan leña y arbustos como fuente de energía (Torres–Dosal *et al.*, 2008). Sin embargo, durante los últimos cien años, la contaminación antropogénica se ha convertido en un problema grave y persistente en muchas áreas urbanas de todo el mundo (Molina y Molina, 2004; Akimoto, 2003).

Las grandes urbes son los sitios con mayor contaminación debido a su acelerado crecimiento poblacional, uso de automóviles e industrialización (SIMAT, 2013; Guzmán–Morales, *et al.*, 2011; Blake y Sherwood, 1997). A partir del año 2006 la mayoría de la población mundial vive en las ciudades (Volkamer *et al.*, 2006). En Latinoamérica, el 75% de la población vive en urbes como Santiago, Sao Pablo (Camargo *et al.*, 2006; Carvalho–Oliveira, 2005) y Ciudad de México (Bell *et al.*, 2006). Ésta última, es la décima urbe más poblada del mundo (DWUA, 2014).

La Ciudad de México alberga una población de más de 20 millones de personas, 4 millones de vehículos y 35 000 industrias en 3 500 km². Su valle tiene una altitud de 2 240 msnm, ubicado a 19° 25´ latitud Norte y 99° 10´ longitud Oeste, con temperaturas que oscilan entre 0 y 35°C, rodeado por grandes montañas y bosques que rondan los 4 000 msnm y dos volcanes cercanos, el Popocatepetl de 5 452 msnm y el Iztaccíhuatl de 5 284 msnm (INEGI, 2013).

A partir de los años setentas el Programa de las Naciones Unidas para el Medio

Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han colaborado en un programa internacional de monitoreo de la calidad del aire (Molina y Molina, 2004). En México se han hecho estudios intensivos a partir de los años noventa (Crouse *et al.*, 2009; De Foy *et al.*, 2006) encontrando que en esta ciudad se emite cerca del 2% de la contaminación atmosférica mundial (McKinley *et al.*, 2005).

El monitoreo atmosférico de la República Mexicana se realiza en 56 ciudades con un total de 235 estaciones. Las tres urbes mexicanas con mayores índices de contaminación son: Guadalajara, Monterrey y Distrito Federal (SIMAT, 2013; Dasgupta *et al.*, 1997), ésta última concentra cerca del 13% de las emisiones nacionales (McKinley *et al.*, 2005; Arriaga–Colina *et al.*, 2004).

En la Ciudad de México, el Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) cuenta con 24 estaciones de monitoreo atmosférico, está encargado de evaluar las concentraciones de contaminación y en su caso, de alertar a la población en casos de contingencia ambiental (SIMAT, 2014). Asimismo, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) cuenta con un Centro de Investigaciones en Ciencias de la Atmósfera y una estación móvil de monitoreo atmosférico (Tijerino, 2014).

Los contaminantes atmosféricos se han clasificado como contaminantes criterio y contaminantes no criterio. Debido a que diversos componentes de la contaminación atmosférica han sido relacionados a toxicidad (Romieu *et al.*, 2008), los contaminantes criterio se han identificado como aquellos perjudiciales para la salud de los seres humanos (Gauderman *et al.*, 2004). Dichos contaminantes criterio fueron objeto de evaluaciones en los Estados Unidos, a fin de establecer niveles permisibles que no afectaran la salud, el medio ambiente y el bienestar de la población (INECC, 2014).

Los contaminantes criterio a nivel mundial son: monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), dióxido de azufre (SO₂), ozono (O₃), material particulado (PM) y plomo (Pb) (INECC, 2014). En la Ciudad de México al igual que en otras ciudades, además se han medido diversos compuestos orgánicos volátiles (McKinley *et al.*, 2005) y endotoxinas (Osornio–Vargas *et al.*, 2003) que permiten distinguir variaciones y/o patrones de contaminación en su territorio.

Para especificar la concentración, cada contaminante utiliza una unidad de medida. La más común es la que expresa el número de partes por millón (ppm), es decir la cantidad de moléculas de un contaminante encontrada en un millón de moléculas de aire. La segunda es el porcentaje por volumen, que es la cantidad de volúmenes por cada cien (%). La tercera es la masa de contaminante por volumen de aire, expresada como microgramos por metro cúbico (µg/m³) (Molina y Molina, 2004).

En México, los resultados de las evaluaciones de los contaminantes criterio, son comunicados a la población mediante el Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA). El cálculo IMECA establece los valores criterio para cada contaminante a partir de una base igual a 100 puntos (SIMAT, 2013; Molina y Molina, 2004). A partir de éstas mediciones, se ha encontrado que la contaminación en la capital mexicana presentan un patrón de acumulación durante la época seca–fría en los meses de octubre a marzo y disminuye durante la época de lluvias de abril a septiembre, como se muestra en el Anexo 1 (SIMAT, 2014).

De igual manera, ha sido muy útil diferenciar los contaminantes en dos grandes grupos, según si fueron emitidos directamente a la atmósfera por fuentes de emisión, o si se han formado en la atmósfera (INECC, 2014).

Los contaminantes primarios son aquellos procedentes directamente de las fuentes de emisión, principalmente el plomo (Pb), monóxido de carbono (CO), óxidos de azufre (SO_x), óxidos de nitrógeno (NO_x), hidrocarburos (HC) y material particulado (PM). Los contaminantes secundarios son aquellos originados en el aire por la interacción entre dos o más contaminantes primarios, o por sus reacciones con los componentes naturales de la atmósfera, por ejemplo, el ozono (O₃), peroxiacetil–nitrato (PAN), hidrocarburos (HC), sulfatos (SO₄), nitratos (NO₃) y el ácido sulfúrico (H₂SO₄) (INECC, 2014).

En la Ciudad de México, los contaminantes primarios (CO, NO_x y PM₁₀) presentan acumulación por las mañanas entre las 6:00 y 12:00 horas y los secundarios como el O₃ por las tardes entre las 12:00 y 18:00 horas. Además existe un efecto de acumulación durante los fines de semana (SIMAT, 2013; Jiang *et al.*, 2008). Los contaminantes de mayor importancia en la Ciudad de México son el O₃, PM₁₀ y PM_{2.5}, ya que rebasan continuamente los límites permisibles establecidos (SIMAT, 2014; Cronuse *et al.*, 2009; Gómez–Peráles *et al.*, 2003).

Debido al exceso de contaminación en la Ciudad de México, se han llevado a cabo diversos esfuerzos en la reducción de emisiones atmosféricas, como fueron inicialmente la regulación de incendios en tiraderos de basura durante las décadas de 1940 y 1950, la aprobación de leyes de control de emisiones e implementación del sistema de transporte Trolebús durante las décadas de los años sesenta a ochenta (Molina y Molina, 2004) y posteriormente con programas como PICCA y PROAIRE durante los noventa (McKinley *et al.*, 2005).

Actualmente se han removido de circulación miles de taxis, extendiendo el sistema de transporte colectivo metro (McKinley *et al.*, 2005) que tiene 12 líneas en operación, 195 estaciones y más de 390 trenes, trasladando en promedio 1 608 millones de usuarios al año (GODF, 2013). Además se abrió el Sistema de

Transporte Colectivo Metrobús, que para el año 2014 contó con cinco líneas ahorrando la emisión de 110 000 toneladas de CO₂ al año.

Con el propósito de proteger a la población, la Secretaría de Salud cuenta con Normas Oficiales Mexicanas para establecer los niveles máximos permisibles de emisión de contaminantes como la NOM-085-SEMARNAT-2011. Sin embargo, es importante reconocer que en el contexto de la evidencia científica, los valores de las normas mexicanas no aseguran la protección de los grupos más sensibles (SIMAT, 2012).

Los costos y beneficios del abatimiento de la contaminación han sido debatidos (Brunekreef y Holgate, 2002). McKinley colaboradores (2005) afirman que en México, una reducción gradual de las emisiones entre el 2003 y 2020 tendrían un costo anual para el gobierno de aproximadamente 121.7 millones de dólares. Sin embargo, mencionan que dicha reducción ahorraría 74.7 millones de dólares anuales en la población, por concepto de combustible.

A continuación se abordarán generalidades de cada contaminante y su situación en la Ciudad de México.

Monóxido de carbono (CO)

Es un gas inodoro, incoloro e insípido. Producto de una combustión incompleta, el monóxido de carbono es emitido principalmente por los automóviles, otras fuentes incluyen los incendios forestales, quema de biomasa de la agricultura, la industria y la cocción de los alimentos (Clerbaux *et al.*, 2008; Molina y Molina, 2004). El tiempo de vida del CO se encuentra en un intervalo desde unas cuantas semanas hasta algunos meses, dependiendo de su localización y de la estación anual (Clerbaux *et al.*, 2008; Stephens *et al.*, 2007).

En la capital mexicana, la quema de biomasa contribuye con el 30% del monóxido de carbono total (Crounse *et al.*, 2009) y el parque de taxis emite aproximadamente un 10.7% del mismo (McKinley *et al.*, 2005). Jiang colaboradores (2005) estimaron que en la Ciudad de México, los vehículos emiten $1\,190\,000 \pm 40\,000$ toneladas de CO al año.

La norma oficial mexicana NOM-021-SSA1-1993 establece un nivel máximo de concentración de CO de 11 ppm por espacio de 8 horas continuas. La OMS y EUA recomiendan niveles no mayores 9 ppm para el mismo lapso de horas (Molina y Molina, 2004). Afortunadamente, entre los años 2002 y 2011 los niveles de éste contaminante no superaron la norma oficial mexicana. En 2011 la concentración máxima registrada fue de 4.4 ppm en la estación Xalostoc, Estado de México (SIMAT, 2012).

El monóxido de carbono tiene una alta afinidad con la hemoglobina y reduce considerablemente el oxígeno en la sangre, puede provocar daño cardiovascular y efectos neuronales adversos hasta la muerte (SIMAT, 2012; Molina y Molina, 2004; Gómez-Peráles *et al.*, 2003).

Óxidos de nitrógeno (NOx)

Existen varios óxidos de nitrógeno, comúnmente conocidos como NOx. Los más abundantes son el óxido nítrico (NO) que es un gas incoloro e inodoro y el dióxido de nitrógeno (NO₂) que es un gas café rojizo, con un olor penetrante (Molina y Molina, 2004). En condiciones ambientales el NO es rápidamente transformado en NO₂ por oxidantes atmosféricos como el ozono (Stephens *et al.*, 2007; Brunekreef y Holgate, 2002).

La principal fuente de emisiones de NOx es la quema de combustibles fósiles para cocina, los vehículos (Brunekreef y Holgate, 2002) y las plantas generadoras de

energía (Molina y Molina, 2004). En la Ciudad de México, la combustión automovilística emite aproximadamente $120\ 000 \pm 3\ 000$ toneladas de NO_x por año, lo que representa un 80% de óxidos nitrosos totales y únicamente el servicio de taxis emite un 10.2% de éste (McKinley *et al.*, 2005; Brunekreef y Holgate, 2002).

La norma oficial mexicana establece un límite atmosférico para NO₂ de 0.21 ppm por hora (Molina y Molina, 2004) lo que sería equivalente a $210\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ según Brunekreef y Holgate (2002). El NO₂ es corrosivo para metales y tóxico para humanos. Se sabe que puede agravar las enfermedades respiratorias crónicas y los síntomas respiratorios en los grupos sensibles, causando daño a las membranas del tejido pulmonar, necrosis y apoptosis (Molina y Molina, 2004). Brunekreef y Holgate (2002) analizaron la relación entre los niveles de dióxido de nitrógeno y la mortalidad, sin encontrar relación directa.

Ozono (O₃)

El ozono es un fuerte agente oxidante que se forma en la tropósfera y requiere de procesos fotoquímicos en los que intervienen la luz ultravioleta solar, los compuestos orgánicos volátiles, exceso de hidrocarburos y óxidos nitrosos en relaciones de 1 a 5 (SIMAT, 2008; Molina y Molina, 2004; Brunekreef y Holgate, 2002; Calderón–Garcidueñas *et al.*, 2001). Los principales factores que determinan el ozono atmosférico son las emisiones antropogénicas y los incendios (Crouse *et al.*, 2009).

El ozono es de los principales responsables del problema de contaminación en la Ciudad de México (SIMAT, 2013). La época de mayor acumulación es en primavera de marzo a mayo (Crouse *et al.*, 2009; Shirley *et al.*, 2006), las máximas concentraciones de sus precursores se encuentran en la zona Sur de la ciudad y aumentan de Este a Oeste, principalmente en las delegaciones de

Coyoacán, Tlalpan y Álvaro Obregón (SIMAT, 2012; SIMAT, 2010; Calderón–Garcidueñas *et al.*, 2001).

En la República Mexicana la NOM–020–SSA1–2014 establece que el criterio máximo de ozono atmosférico es de 95 ppb en un máximo de una hora, o bien, 70 ppm en un máximo de 8 horas y no debe ser rebasado una vez al año. En la Ciudad de México, ésta norma fue excedida 259 días en 1986 y 330 días en 1990 (Bell *et al.*, 2006; Blake y Sherwood, 1997) por lo que se llevaron a cabo esfuerzos para reducir sus emisiones.

Para comprender mejor la cantidad de emisiones de ozono de la Ciudad de México, Blake y Sherwood (1997) mencionan que las emisiones de la capital mexicana en 1990 representaban poco más del doble que las emisiones de Los Ángeles, California, una de las ciudades más contaminadas de Estados Unidos.

Afortunadamente, los niveles de ozono de la Ciudad de México se han reducido mucho entre los años 1990 a 2006 (SIMAT, 2010; SIMAT, 2007). Como ejemplo, durante el año 2011 el límite de emisión de ozono fue rebasado en un total de 449 horas, la cifra más baja en 25 años anteriores (SIMAT, 2012).

El O₃ daña al tejido pulmonar, puede provocar tos, dolor de pecho, irritación de los ojos, dolores de cabeza, ataques de asma y envejecimiento celular acelerado (Molina y Molina, 2004). Se ha encontrado que altas concentraciones de O₃ incrementan la síntesis de anticuerpos principalmente IgE (Brunekreef y Holgate, 2002). Bell y colaboradores (2006) pronostican que para el año 2020, tan sólo una reducción del 10% en los niveles de PM₁₀ y O₃ evitaría 3 300 muertes asociadas a padecimientos pulmonares.

Partículas Suspendidas Totales (PST)

El material particulado aéreo es una mezcla de materiales sólidos, líquidos o su combinación suspendidos en el aire (SIMAT, 2012; Brunekreef y Holgate, 2002). Al contrario de otros contaminantes, el material particulado es emitido por una gran variedad de fuentes, en función de las cuales varían sus propiedades físicas como el tamaño, superficie específica, densidad o número y su composición química (Zabalza *et al.*, 2002).

Las partículas se forman por procesos naturales como la polinización de las plantas e incendios forestales y por fuentes antropogénicas que abarcan, desde la quema de combustibles hasta la fertilización de campos agrícolas. Las partículas pueden ser directamente emitidas de la fuente, como partículas primarias o pueden formarse partículas secundarias, cuando reaccionan con algunos gases en la atmósfera tales como los óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, amoníaco, compuestos orgánicos, entre otros (INECC, 2014).

En la década de 1950, el material particulado se medía como partículas suspendidas totales, por sus siglas PST (SIMAT, 2012; Molina y Molina, 2004), las cuales son menores de 100 μm de diámetro aerodinámico. Dicho parámetro de PST se cambió hasta aproximadamente el año 2000 ya que el material particulado varía desde 0.005 hasta 100 micras de diámetro aerodinámico, esto es, desde unos cuantos átomos hasta el grosor de un cabello humano, aproximadamente (INECC, 2014).

La atención entonces, se centró en las partículas menores de 10 μm y posteriormente en las partículas finas y ultra finas, es decir aquellas entre 2.5 y 1 μm , respectivamente. Así, las llamadas PM_{10} se pueden dividir, por su diámetro aerodinámico, en las fracciones gruesa, fina y ultra fina, siendo la fracción gruesa aquella compuesta por partículas cuyo diámetro aerodinámico se encuentra entre

2.5 y 10 μm , la fracción fina que incluye aquellas partículas con diámetro aerodinámico menor a 2.5 μm y finalmente, la fracción ultra fina que incluye a las partículas menores de 1 μm (INECC, 2014).

La Secretaría de Salud a través de la norma oficial mexicana NOM-025-SSA1-2014 estableció que para el año 2014, se debía retirar por completo dicho parámetro PST inhabilitando la última norma del año 1993 donde se establecía un límite de exposición de 210 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PST en 24 horas.

En 1991 se reportó la concentración máxima de 2 585 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y durante 2011 las concentraciones de PST tuvieron un valor máximo de 325 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la estación de Xalostoc, municipio de Ecatepec, Estado de México (SIMAT, 2012). En la capital mexicana Borja-Aburto y colaboradores (1997) encontraron que, por cada aumento de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PST incrementa un 5.8% el riesgo de mortalidad.

Partículas menores a 10 μm (PM_{10})

Las partículas menores a 10 μm (PM_{10}) son generadas por la agricultura, la minería y el tráfico automovilístico (Molina y Molina, 2004). En México, los taxis emiten 3.6% de PM_{10} (McKinley *et al.*, 2005) y el sector de transporte emite aproximadamente un 40% de PM_{10} total (O’Ryan y Larraguibel, 2000 mencionado por Bell *et al.*, 2006). Osornio-Vargas y colaboradores (2003) reportaron una mayor presencia de endotoxinas en las PM_{10} del Sur con respecto a aquellas del Norte de la capital mexicana.

La norma oficial mexicana NOM-025-SSA1-2014 establece un límite de concentración de 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 horas, o bien, de 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual (SIMAT, 2014). En el Valle de México las mayores concentraciones se encuentran generalmente al Norte y al Este (DGGAA, 2006; Edgerton *et al.*, 1998) en la delegación Gustavo A. Madero del Distrito Federal y los municipios de Coacalco y

Ecatepec, Estado de México (SIMAT, 2012).

Bonner y colaboradores (1998) reportaron el promedio de PM_{10} de tres diferentes zonas de la Ciudad de México durante 1991, encontrando un promedio de $121.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el Norte, $107.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el Centro y $75.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el Sur de la capital. Gracias a los esfuerzos gubernamentales dichos parámetros se han reducido. Entre 1997 y 2003 los niveles de PM_{10} promediaron $60.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. El estándar de PM_{10} fue excedido en 112 días en 1995 y 5 días en el 2002 (Bell *et al.*, 2006).

Las PM_{10} tienen la capacidad de penetrar en el sistema respiratorio inferior. Se ha encontrado que un incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} está relacionado con un aumento del 0.6% en mortalidad, un aumento del 1% en ingresos hospitalarios por problemas respiratorios y 0.5% en problemas cardiovasculares (Brunekreef y Holgate, 2002). Alfaro–Moreno y colaboradores (2002) cultivaron monocitos de ratón y los expusieron a diferentes dosis de PM_{10} de las zonas Norte, Centro y Sur de la capital mexicana, encontrando que las primeras, provocaron mayor efecto apoptótico en los cultivos celulares *in vitro*.

Partículas menores a $2.5 \mu\text{m}$ ($PM_{2.5}$)

Las partículas menores a $2.5 \mu\text{m}$ son generadas por la combustión o están formadas como contaminantes secundarios por la condensación de especies en fase gaseosa (DGGAA, 2006; DGGAA, 2005; Molina y Molina, 2004). Después del ozono, la fracción de partículas $PM_{2.5}$ es el contaminante que tiene una mayor contribución al deterioro de la calidad del aire de la capital mexicana (SIMAT, 2012).

Se ha encontrado que aproximadamente un 50% de PM_{10} lo constituye $PM_{2.5}$ (Echeverri–Londono, Maya–Vasco, 2008; Chow *et al.*, 2002). Gómez–Perales y colaboradores (2003) encontraron que en la Ciudad de México durante mayo de

2002, la composición química de $PM_{2.5}$ se encontraba altamente constituida por carbono orgánico (37%) y carbono elemental (11%) entre otros. Osornio–Vargas y colaboradores (2003) reportaron endotoxinas en la composición de $PM_{2.5}$ del Norte y Sur de la Ciudad de México.

La norma oficial mexicana NOM–025–SSA1–2014 establece un límite de exposición aguda de $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2.5}$ en 24 horas, o bien, de $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual (Díaz y Domínguez, 2009). Jiang y colaboradores (2005) estimaron que en la Ciudad de México los vehículos emiten $4\,400 \pm 400$ toneladas de $PM_{2.5}$ anual aproximadamente, lo que representa un 80% de las emisiones totales (McKinley *et al.*, 2005).

Las $PM_{2.5}$ pueden alcanzar la región de intercambio gaseoso pulmonar a nivel de los bronquiolos y los alvéolos (Molina y Molina, 2004; Brunekreef y Holgate, 2002). Se conoce que las $PM_{2.5}$ tienen un impacto más deletéreo que PM_{10} sobre la salud humana (Díaz y Domínguez, 2009) por esta razón, un incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2.5}$ se asocia a un aumento del 1.4% en riesgo de muerte, principalmente en personas de tercera edad (Borja–Aburto *et al.*, 1998). Éstas partículas también son responsables de la reducción de la visibilidad (Molina y Molina, 2004).

Dióxido de azufre (SO_2)

El dióxido de azufre (SO_2) es un gas incoloro, irritante, no inflamable, soluble en agua. Éste gas se produce principalmente por la combustión de carbón, gasolina rica en azufre y diésel (SIMAT, 2012; Molina y Molina, 2004). En la Ciudad de México, la combustión automovilística emite 30% de SO_2 y los taxis emiten 11.5% de SO_2 (McKinley *et al.*, 2005).

Hasta el año 2014, la norma mexicana NOM–023–SSA1–1993 consideró como un nivel máximo de SO_2 0.021 ppm en una hora, una vez al año. En la capital

mexicana no se registró un exceso del límite permisible entre el 2007 y 2011, la concentración máxima en el 2011 fue de 0.200 ppm en la estación FES Acatlán, municipio de Naucalpan, Estado de México (SIMAT, 2012).

Una exposición aguda a este contaminante puede ocasionar dificultad para respirar e irritación severa de las vías respiratorias. La exposición crónica puede vulnerar el sistema inmunológico, ocasionar enfermedades respiratorias como la bronquitis, agravar enfermedades cardiovasculares y muerte celular en el tejido pulmonar (SIMAT, 2012; Molina y Molina, 2004).

2.2 Efectos de la contaminación atmosférica

Numerosos estudios han evaluado la relación entre la contaminación atmosférica y la salud (Bell *et al.*, 2006; Cislighi y Nimis, 1997) ya que la exposición a los tóxicos atmosféricos tiene un impacto negativo en los seres vivos (Villalobos–Pietrini *et al.*, 2011; Rattner, 2009).

En Bélgica (1930) y posteriormente en Inglaterra (1952), un intenso frío generó una inversión térmica, aumentando el uso indiscriminado de carbón para calefacción. En ambos casos, la contaminación atmosférica provocó la muerte de miles de personas (Molina y Molina, 2004; Brunekreef y Holgate, 2002; Mayor of London, 2002).

En la Ciudad de México la contaminación ha sido asociada a procesos inflamatorios en epitelio nasal (Calderón–Garcidueñas *et al.*, 1992), cambios celulares en tejido pulmonar (Churg *et al.*, 2003), efectos apoptóticos en cultivos celulares *in vitro* (Osornio–Vargas *et al.*, 2003; Alfaro–Moreno *et al.*, 2002), incrementos en concentraciones de fibrinógeno (Brunekreef y Holgate, 2002), casos de asma (Rosas *et al.*, 1998) y cambios en el ritmo cardíaco (Holguín *et al.*,

2003).

2.2.1 Efectos genotóxicos de la contaminación atmosférica en poblaciones humanas

Se ha observado que la contaminación atmosférica provoca daño genotóxico detectable mediante micronúcleos (Rossnerova *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 1995) entre 3 y hasta 60 días *post* exposición (Rossnerova *et al.*, 2009) y que dicha asociación es particularmente fuerte en sitios con emisiones de combustión masivas (Soares *et al.*, 2003; Crebelli *et al.*, 1999).

En Praga, República Checa, Rossnerova y colaboradores (2009) estudiaron una población de policías de 34 años de edad promedio, fumadores y no fumadores. Encontraron una asociación entre la frecuencia de micronúcleos y la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos y O-xileno, sin encontrar diferencias significativas entre fumadores y no fumadores.

En Brasil, Coronasa y colaboradores (2009) evaluaron los niveles de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica de residentes cercanos a una refinería de petróleo y un grupo testigo. Encontraron altos índices de micronúcleos asociados principalmente a los niveles de PM₁₀ de la zona cercana a la refinería.

En Colombia, Carranza-López (2011) analizó la contaminación atmosférica y la presencia de micronúcleos en sangre periférica de dos grupos, uno de moto taxistas y uno de oficinistas, sin encontrar diferencias significativas entre ellos.

En la Ciudad de México, Roubiceka y colaboradores (2007) analizaron cultivos de células alveolares epiteliales, expuestas a diferentes dosis de PM₁₀ de dos zonas de la capital. Determinaron que las partículas de la zona industrial, al Norte,

provocaron mayor número de micronúcleos que aquellas de la zona residencial, al Sur.

2.2.2 Efectos genotóxicos de la contaminación atmosférica en modelos animales

En Bulgaria, Mitkovska y colaboradores (2012) estudiaron las proporciones de micronúcleos de *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis* y *Mus macedonicus* en dos sitios, en la Ciudad de Asenovgrad, con altas concentraciones de Cd, SO₂ y NO₂ y el Parque Nacional Strandzha como sitio control. Únicamente la especie *A. flavicollis* presentó diferencias estadísticamente significativas entre la zona contaminada y el sitio control.

En Roma, Italia, Ieradi y colaboradores (1996) investigaron las proporciones de micronúcleos en tres diferentes hábitat de *Mus domesticus* con diferente gradiente de flujo automovilístico. Encontraron mayor presencia de micronúcleos en los animales colectados en el sitio con gran flujo automovilístico.

En España, Ieradi y colaboradores (1998) estudiaron las proporciones de micronúcleos en tres poblaciones de *Mus spretus*, en Huelva una ciudad con industria petroquímica y en dos áreas naturales protegidas. Encontraron altos índices de micronúcleos en la ciudad y una de las dos zonas protegidas.

En Ohio, EUA, Meier y colaboradores (1999) detectaron los micronúcleos de *Peromyscus leucopus* y de *Cryptotis parva* encontrando que el primero presenta un mayor número de micronúcleos, por lo que funciona como un mejor modelo de análisis genotóxico en vida libre.

2.3 La prueba de micronúcleos en sangre periférica como indicador de genotoxicidad

Los micronúcleos, anteriormente conocidos como cuerpos de Howell–Jolly, aparecen en poblaciones celulares como evidencia de rupturas cromosómicas por agentes clastogénicos, o bien, por la pérdida de cromosomas completos (Schlegel *et al.*, 1986), causados por la acción de agentes aneugénicos que dañan el huso mitótico (Jorge, 2008). Los micronúcleos son remanentes cromosómicos que se separan del núcleo celular (Zúñiga–González *et al.*, 2000).

Entre las células más usadas para el ensayo de micronúcleos se encuentran los linfocitos y los reticulocitos aislados de médula, bazo y sangre periférica (Crebelli *et al.*, 1999; Tometsko *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1990). Los eritrocitos de sangre periférica han sido aceptados como un modelo muy útil para el análisis de micronúcleos para daño agudo y acumulado (Dertinger *et al.*, 2011; Kissling *et al.*, 2007). Se usan tinciones de Naranja de acridina o tinción de Wright para análisis microscópico (Salazar *et al.*, 2013; Zalacain *et al.*, 2005) o bien, pueden ser detectados por citometría de flujo (Grawe *et al.*, 2002; Cervantes, 2006).

Además de los agentes genotóxicos, existen factores capaces de influir o modificar el número de micronúcleos presentes en un individuo, como la edad, el género, los tratamientos médicos (Zalacain *et al.*, 2005), la carga parasitaria por ejemplo de *Taenia solium* (Salazar *et al.*, 2013) o la variación en la eficiencia de remoción celular por especie (Zúñiga–González *et al.*, 2000). Es conocido que los organismos con proporciones de micronúcleos cercanos a cero tienen una alta eficiencia en remoción celular, y aunque sean expuestos a agentes genotóxicos, dicha proporción no se incrementa. En cambio, los organismos con menor eficiencia de remoción celular, presentan mayores proporciones de eritrocitos micronucleados (Zúñiga–González *et al.*, 2000).

Por su baja eficiencia de remoción celular, el análisis de micronúcleos ha sido utilizado en roedores desde 1978 para investigar el daño genético inducido por la contaminación ambiental (Mitkovska *et al.*, 2012; Ben-Sholomo y Shanas, 2011; Bickham *et al.*, 2000). Es conocido que el ADN de mamífero es sensible a agentes químicos en el medio ambiente. Esta sensibilidad es preocupante, ya que los productos químicos pueden causar mutaciones o daños en los cromosomas, lo que podría dar lugar a defectos congénitos y varios tipos de cáncer (Tometsko *et al.*, 1993).

La técnica de análisis de micronúcleos se ha adecuado para utilizarse en peces (Kurmar *et al.*, 2013; Selvi *et al.*, 2011; Porto *et al.*, 2005; Palhares y Koppe, 2002), diversos mamíferos como el hámster (Salazar *et al.*, 2013) y hasta plantas (Fuzinatto *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2013; Sisenando *et al.*, 2011; Buschini *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 1997), y en células *in vivo* (Kato *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2007) e *in vitro* (Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2000) cada una con sus debidas variantes.

Witt y colaboradores (2008) compararon las frecuencias de micronúcleos en reticulocitos de roedores tratados con agentes genotóxicos mediante microscopía y citometría de flujo. El estudio menciona que no se observaron diferencias respecto al número de células identificadas. Sin embargo la citometría de flujo fue evidentemente más rápida que el método de microscopía.

La detección de micronúcleos por citometría de flujo en roedores se basa en la separación específica de eritrocitos y reticulocitos, mediante la unión superficial de anticuerpo policlonal CD71 en la superficie de estos últimos (Camerer *et al.*, 2007).

Adicionalmente se usa RNAsa y yoduro de propidio, el cual es un fluorocromo o

agente de fluorescencia e intercalación de ADN. El citómetro de flujo, puede cuantificar el número, tamaño y fluorescencia de la células con y sin micronúcleos para su análisis (Fiedler *et al.*, 2010; Witt *et al.*, 2008; Cervantes, 2006).

En Guadalajara, México, se analizaron las proporciones de micronúcleos en los animales del zoológico de la ciudad. Se encontró que para los roedores endémicos de México, la ardilla gris (*S. aureogaster*) presentó mayor proporción de reticulocitos micronucleados con respecto a las ardillas *Spermophilus mexicanus*, *S. annulatus*, *S. variegatus* y perritos de la pradera (*Coendou mexicanus*) (Zúñiga–González *et al.*, 2000). En este contexto, la ardilla gris, al ser un roedor inmerso en la Ciudad de México, es un buen modelo de estudio ecotoxicológico que abordaremos a continuación.

2.4 La ardilla gris como modelo de estudio ecotoxicológico

Taxonomía. La ardilla gris fue registrada por el zoólogo francés Frederic Cuvier en 1829. Es un *esciuomorfo*, cubierto por un pelaje gris a veces negro, en el dorso y de blanco a rojizo en el abdomen que presenta orejas y ojos pequeños. Su longitud corporal promedio es de 238 ± 9.48 mm y el peso es de 466 ± 32.5 gr (Martínez, 2013). En el Anexo 2 se observa la taxonomía de ardilla gris (*S. aureogaster*).

S. aureogaster puede confundirse con *S. oculatus* y *S. deppei* por ser especies simpátricas, sin embargo, *S. deppei* tiene un tamaño significativamente más pequeño con respecto a las dos primeras. Aunque *S. aureogaster* y *S. oculatus* tienen una talla parecida, ésta última se distingue por tener un cuerpo más robusto y no presentar el tercer premolar (p3) (Best, 1995), mientras que la fórmula dentaria de *S. aureogaster* es i 1/1, c 0/0, p1/1, m3/3, en total 20.

Kelson (1952) estudió las subespecies de *S. aureogaster* en diferentes zonas de México relacionando patrones de color y sitios de colecta de 256 especímenes colectados entre los años 1829 y 1899. Refirió que existían dos subespecies (*S. a. aureogaster* y *S. a. frumentor*) y que no existía un patrón de color asociado al sitio de captura por lo cual, la presencia de individuos negros no era taxonómicamente relevante. Actualmente se considera que *S. aureogaster* tiene nueve subespecies que se mencionan en el Anexo 2.



Figura 1. Ardilla gris (*S. aureogaster*)
(IUCN, 2014)

La ardilla gris ha formado parte sustancial de los mitos de los pueblos en México. En la época precolombina, se conoció a las ardillas grandes como *techálotl* y a las pequeñas como *mototli* que fueron divinizadas (Valdés, 2003), también se les relacionó con los *tlaloques*, ayudantes de Tláloc, dios de la lluvia y con los *tlamacazques*, entes que eran invocados para proteger a los cultivos de los intrusos. (MHNM, 2013). Hoy día muchos pueblos de México tienen contacto con

la ardilla gris, incluyéndola en diversos cuentos, pinturas esculturas y canciones, nombrándola de muy distintas maneras. En el Anexo 3 se presenta un listado del término *ardilla* en diferentes idiomas y en lenguas autóctonas en México (Hernández–Barboza J.¹).

Ecología. La ardilla gris representa un papel ecológico destacado en las comunidades silvestres. Habita principalmente en los bosques de pino - encino (*Pinus – Quercus*). Ramos–Lara y Cervantes (2011) determinaron que los encinos son sus principales sitios de anidación, *Q. candicans* durante la época húmeda y *Q. laurina* durante la época seca. En Pátzcuaro Michoacán, la mayoría de nidos los construyen entre los meses de abril a junio, los elaboran cerca del tallo principal, eligiendo aquellos árboles de mayor grosor y tamaño, sin usar huecos para dicho propósito (Ramos–Lara y Cervantes, 2007).

Éste roedor consume una gran diversidad de semillas que son transportadas hasta donde las almacenan, posteriormente las consumen (Valdés, 2003). Romero–Balderas y colaboradores (2006) determinaron que consume grandes cantidades de maíz en cultivos adyacentes a la selva provocando importantes pérdidas económicas a los agricultores en la Selva Lacandona, Chiapas. A su vez, ésta ardilla sirve como alimento para distintos carnívoros y aves de presa. Aranda y colaboradores (2002) reportaron que *S. aureogaster* es una de las principales presas en la alimentación del gato montés (*Lynx rufus*) de la sierra del Ajusco, al Sur de la cuenca del Valle de México.

Por su alimentación, la ardilla gris puede alterar las tasas de reproducción de algunos árboles. Steele y colaboradores (2001) publicaron que en Pensilvania EUA, la ardilla gris consume primordialmente semillas de Roble rojo (*Quercus*

¹ Hernández–Barboza, Juan. *Elaborado en enero de 2014. Texcoco, Edo. de México.*

rubra), sobre semillas de Roble blanco (*Quercus alba*) por lo que, éste último se ha visto favorecido aumentando su tasa de supervivencia. Xianfeng y colaboradores (2012) encontraron que semillas de la familia *Quercus* de Norteamérica y Asia han modificado sus patrones de desarrollo de plúmula, germinación y disposición de lignina en relación al efecto predatorio de *S. carolinensis*, *S. aureogaster* y *S. niger*.

En México, Hernández–López (*comunicación personal*), determinó en 1980 que la alimentación de la ardilla gris tiene un efecto predatorio en *Pinus ayacahuite* variedad *veitchee* generando poca propagación de éste pino en el Parque Nacional Lagunas de Zempoala, municipio de Huitzilac, Morelos². Pacheco (2011) determinó el mismo efecto en coníferas de *Pinus patula* en Santiago Comaltepec, Oaxaca. Encontró que los meses de mayor consumo fueron entre mayo y agosto asociado a la suavidad, alto contenido de energía y valor nutricional de los conos en ésta temporada.

De la Cruz (2003) detectó los problemas que ocasiona *S. aureogaster* en plantaciones de coco en el municipio de Paraíso, Tabasco. Mayle y colaboradores (2007) describieron las marcas de consumo alimenticio de éste roedor en coníferas y granos de maíz. Por su parte, Schulte–Hostedde y colaboradores (2001) analizaron la condición corporal de ardillas respecto al tipo de semilla que mayormente consumían.

En el 2002, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a través de la Norma Oficial Mexicana NOM–059–ECOL–2001, no incluyó a *S.*

2 Hernández–López, Mario. *Comunicación personal el día 15 de Noviembre de 2013 en Texcoco, Estado de México*. Entrevista sobre su experiencia en el montaje de un vivero con *Pinus ayacahuite* var. *veitchee* en el Parque Nacional Lagunas de Zempoala, Municipio de Huitzilac, Morelos entre los años 1984–1990.

aureogaster en el listado de riesgo o peligro de extinción, por lo que es una especie sin protección ecológica dentro del territorio mexicano. Por su parte, la IUCN (2014) la considera en su lista roja de especies en peligro de extinción, contraponiendo la categoría de la norma mexicana. Por ésta razón, es necesario hacer un estudio ecológico especializado para homologar en qué categoría de riesgo integrar a *S. aureogaster*.

Distribución. La ardilla gris es una especie endémica de México y Suroeste de Guatemala (Thorington y Hoffmann, 2005) sin embargo se ha extendido como especie invasora en Estados Unidos y Europa. Abarca desde las costas del Golfo de México hasta el Océano Pacífico, en los estados de Tamaulipas a Tabasco y de Colima a Chiapas, habitando desde zonas tropicales hasta lugares fríos en las serranías (Ceballos y Arroyo–Cabrales, 2012; Ramos–Lara y Cervantes, 2011). En el Anexo 4 se muestra la distribución de la ardilla gris (*S. aureogaster*) en México.

Se han publicado diversos trabajos sobre la distribución de la ardilla gris en México. Ya en 1952 fue ampliamente reportada su presencia en los estados de Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Chiapas y Oaxaca por Kelson (1952) mediante la captura de 256 especímenes. Mandujano (1997) determinó la presencia de éste roedor mediante recorridos diurnos en la reserva de Chamela, Jalisco.

Sánchez–Cordero y Martínez–Meyer (2000) encontraron presencia de *S. aureogaster* en Veracruz mediante el análisis de especímenes de diferentes museos. Falcón–Ordáz y Lamothe–Argumedo (2006) reportaron su presencia en Tlalnepantla, Morelos. También Monroy–Vilchis y colaboradores (2011) reportaron su presencia mediante foto trampeo en la Sierra de Nanchititla, Edo. de México. Lira–Torres y Briones–Salas (2012) determinaron su presencia mediante el mismo método en la región de Los Chimalapas, Oaxaca. En el Anexo 5 se presentan

registros de *S. aureogaster* en México entre 1952 y 2013.

En el Valle de México, la ardilla gris se ha extendido ampliamente en parques y bosques de la urbe. En un meta análisis de colecciones científicas de 1943–2009, Hortelano–Moncada y colaboradores (2009) encontraron que el primer ejemplar de *S. aureogaster nigrescens* de la Reserva Ecológica de San Ángel corresponde al año 1999, por lo que probablemente es de reciente introducción. En el Anexo 6 se presentan las poblaciones de *S. aureogaster* del Valle de México.

Lima (2005) y Santiago (2003) reportaron presencia de *S. aureogaster* en el Bosque de Chapultepec, y éste último encontró patrones de anidación asociados a la composición del hábitat. Mora–Ascencio y colaboradores (2010) estimaron la densidad de dicho roedor en Viveros de Coyoacán (5.9 a 6.5 individuos/Ha). Martínez (2013) reportó su presencia en 16 parques y áreas verdes de la Ciudad de México con sus respectivos cálculos de densidad por hectárea. También existen poblaciones en el Bosque de Aragón y Parque 18 de Marzo en el Distrito Federal y en los parques municipales de Texcoco y Papalotla, Estado de México (Hernández–Barboza³).

La condición de *S. aureogaster* como especie endémica se convirtió a especie invasora al trasladarse en embarcaciones como mascota e introducirse en Gran Bretaña, Escocia e Italia entre los años 1876 y 1920. Particularmente, fue introducida en la ciudad de Aberdeen en 1970 y desde ahí comenzó a expandirse a toda Escocia a por corredores cercanos a ríos (Tonkin y Mackenzie, 2009).

En Italia, la ardilla gris fue introducida como parte de los festejos de remodelación

3 Hernández–Barboza, Juan. Parques visitados con poblaciones de *S. aureogaster* sin reporte bibliográfico de las mismas. Enero de 2013.

del parque municipal de Trento aproximadamente por 1920. En 1938 dos ardillas fueron introducidas intencionalmente al National Park of Bizcayno, Florida, Estados Unidos donde se establecieron y generalizaron para 1960 (Pernas y Clark, 2011).

En estos países la ardilla gris está provocando graves problemas ecológicos por ser una especie exótica. Descortezza árboles, consume altas cantidades y variedades de semillas y se encuentra desplazando a la ardilla roja (*S. vulgaris*) especie alopátrica, endémica de Europa.

Además *S. aureogaster* es portador sano de un paramixovirus o “virus de las ardillas” que desencadena una viruela mortal en *S. vulgaris* (WCMC, 2010; Tonkin y Mackenzie, 2009; Mayle *et al.*, 2007; Bradley y Altizer, 2006). Interesados por esto, Tompkins (2003) y Rushton (2000) han realizado modelos que describen la pérdida de poblaciones de ardilla roja en competencia con *S. aureogaster* portadora de dicho virus.

La pérdida de poblaciones de ardilla roja alertó a la Unión Europea quien ha elaborado iniciativas de control y erradicación de la ardilla gris a través de campañas permanentes de captura y sacrificio, publicando folletos y anuncios televisivos para la población en general. Para mayo de 2010 el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (ONU) a través del Centro de Control y Monitoreo Mundial (WCMC por sus siglas en inglés), publicó un tratado europeo, que dictamina las maniobras a seguir respecto a esta especie.

En el Reino Unido entre el 2009 y 2011 se reportaron 2 439 capturas como parte de los esfuerzos realizados según Tonkin y Mackenzie (2009). La WCMC (2010) reportó que en Italia existían entre 2 500 y 6 400 individuos y que para el 2039 estará ampliamente distribuida en los bosques franceses. En Estados Unidos, tan

sólo entre septiembre de 2007 y febrero de 2010, el National Park of Bizcayno gastó poco más de \$ 70 000 dólares como parte de los esfuerzos de erradicación de *S. aureogaster* (Pernas y Clark, 2011).

2.5 Justificación

La contaminación atmosférica desencadena patrones de alteración del ADN nuclear, por lo cual es esencial conocer la proporción de daños que desencadena la misma. La ardilla gris (*S. aureogaster*) es un buen modelo de estudio ecotoxicológico por su comportamiento y distribución en la Ciudad de México con la que, es posible determinar las proporciones de micronúcleos, dado que representa un buen indicador de daño genotóxico. Su estimación en ardillas de la misma especie, de diferentes partes de la Ciudad de México podrá ser analizada por citometría de flujo, por lo cual, será posible conocer la frecuencia asociada a la contaminación atmosférica de la Ciudad de México.

3. HIPÓTESIS

La contaminación atmosférica provoca alteraciones a nivel citogenético en la ardilla gris (*S. aureogaster*) de la Ciudad de México. Las ardillas expuestas a altas concentraciones de contaminación atmosférica presentan mayores proporciones de micronúcleos en reticulocitos que aquellas sometidas a bajos niveles de contaminación.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la relación entre los niveles de contaminación atmosférica de la Ciudad de México y la incidencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ardilla gris (*S. aureogaster*).

Objetivos específicos

Evaluar si los parámetros morfométricos de la especie afectan la aparición de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de la ardilla gris (*S. aureogaster*).

Detectar si existen zonas de la Ciudad de México donde las ardillas presenten mayor proporción de micronúcleos en relación a los niveles de contaminación.

Evaluar los contaminantes que contribuyen a la aparición de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de la ardilla gris (*S. aureogaster*).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en cuatro parques de la Ciudad de México, que fueron Bosque de Aragón, el Bosque de Chapultepec, Parque 18 de Marzo y Viveros de Coyoacán. Para obtener los datos de contaminación atmosférica, se calculó la distancia en kilómetros de los cuatro parques mencionados a las estaciones de monitoreo atmosférico del SIMAT, eligiendo las más cercanas.

Los nombres de los parques se redujeron a una clave de tres letras en minúscula, y las estaciones a una clave de tres letras en mayúsculas. La elección de lugares y estaciones quedó de la siguiente forma: 1) Bosque de Aragón “bar” con la estación Merced “MER”, 2) Bosque de Chapultepec “bch” con la estación Camarones “CAM”, 3) Parque 18 de Marzo “pdm” con la estación de la Facultad de Estudios Superiores de Acatlán “FAC” y 4) Viveros de Coyoacán “vco” con la estación Coyoacán “COY”, como se observa en la figura 2.



Figura 2. Estaciones de monitoreo atmosférico y poblaciones de ardillas del Valle de México.

Los contaminantes analizados fueron CO, NO, NO₂, NO_x, O₃, PM₁₀, PM_{2.5} y SO₂. Para obtener sus concentraciones no fue necesario ningún permiso pues están disponibles al público en general ingresando en la página electrónica de la Dirección de Monitoreo Atmosférico del Distrito Federal <http://www.aire.df.gob.mx/default.php>. El promedio de cada contaminante, se obtuvo de los niveles atmosféricos de 64 días anteriores a la fecha de muestreo.

Se realizaron en total 80 capturas, 20 por parque, hechas en cinco visitas, cuatro capturas por visita, entre los meses de marzo a mayo de 2013. Para la captura se usaron 5 trampas tipo tomahawk No. 201 de 41 x 13 x 13 cm respectivamente, con un cebo de crema de cacahuate y avena. El horario fue a partir de las 7:30 hasta 12:00 horas según lo reportado por varios autores (Koprowski y Corse, 2005; Bordignon y Monteiro-Filho, 1997; Brown, 1984).

Las trampas fueron colocadas y retiradas el mismo día de captura. El diseño de trampeo estuvo sujeto en cada caso a la densidad poblacional *intra* parque, a fin de recolectar el número de muestras mencionado. El permiso de captura lo emitió la Dirección General de Vida Silvestre para colecta científica por línea de investigación No. FAUT-0250 a nombre del Dr. Gerardo Suzán Azpiri.

En las hojas de registro se anotó el número de visita, la clave del parque, fecha y horario de captura. Para cada ardilla se anotó hora de captura, color de capa, sexo, se tomó peso, longitud de cuerpo, longitud de cola, longitud de tibia, se colocó un arete de identificación y se tomó una muestra sanguínea.

Para tomar la muestra sanguínea se utilizó un tubo capilar con heparina con la técnica de extracción retrorbital para roedores. Se tomó 1 ml de sangre y se guardó en un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad con EDTA, el cual se agitó ligeramente a fin de integrar adecuadamente el anticoagulante con la sangre,

colocándolo en una gradilla para su refrigeración a 4°C y su posterior conservación en laboratorio.

La detección de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo, se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, a cargo de la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz y con asesoría de la Dra. Edith Cortés Barberena. A continuación se describe la técnica de citometría de flujo para una sola muestra de sangre periférica.

Paso 1. Se tomó una alícuota de 100 µl de sangre periférica de ardilla gris y se diluyeron con 200 µl de solución BBS (a pH 7.5, a temperatura ambiente) –y se le denominó “primera dilución” –. *Paso 2.* De la primera dilución se tomó una alícuota de 100 µl que fue diluida en 2 ml de etanol absoluto (a 0°C), se agitó en vortex y se congeló a menos 70°C durante un mínimo de 24 horas –y se le denominó “segunda dilución” –.

Paso 3. Se descongeló la segunda dilución y se tomó una alícuota de 1 ml, la cual se diluyó en 7 ml de solución BBS (a pH 7.5, a 4°C), se agitó en vortex y se centrifugó a 600 g por 5 min a 4°C –y se le nombró “tubo sedimentado” –. *Paso 4.* Se eliminó por decantación casi el total del líquido sobrenadante del tubo sedimentado, con cuidado de conservar aproximadamente 100 µl del líquido y las células sedimentadas del fondo. Las células sedimentadas se suspendieron nuevamente por pipeteo –y se le nombró “muestra celular” –.

Paso 5. Se utilizaron dos tubos de citometría de flujo, el tubo “A” y “B”. En el tubo “A” se colocaron 500 µl de solución PBS, 80 µl de RNAsa y 40 µl de muestra celular, los cuales se mezclaron por pipeteo y se dejaron reposar durante 30 minutos en completa oscuridad, a temperatura ambiente. Transcurrido el reposo,

se refrigeró el tubo a 4°C durante 90 minutos. Una vez hecha la refrigeración, se agregaron al tubo 2 µl de yoduro de propidio e inmediatamente se realizó el análisis de citometría de flujo.

Nota 1: Toda la metodología del tubo “A” del Paso 5 se repitió en el tubo “B” excepto que, al inicio de la dilución, además del uso de PBS, RNAsa y muestra celular, se agregaron 5 µl de anticuerpo CD71 anti rata. Esto se debió a que, el análisis de citometría de flujo requiere de una base comparativa de fluorescencia. Es decir, con la omisión del anticuerpo CD71 en el tubo “A” se obtuvo una fluorescencia *per se* de la muestra celular, la cual fue usada como base del análisis de micronúcleos.

Con el uso del anticuerpo CD71 en el tubo “B” se obtuvo una fluorescencia mayor que la del tubo “A”. La diferencia de fluorescencias del tubo “A” y “B”, sirvió para determinar un umbral desde el cual se pudiese distinguir aquellas células con micronúcleos y sin micronúcleos. *Nota 2:* el uso del yoduro de propidio es de extremo cuidado, por tanto, es necesario usar siempre guantes, bata y cubre bocas.

Las características del citómetro de flujo y su calibración fueron las siguientes. Citómetro de flujo modelo FACSCalibur, marca Becton Dickinson, equipado con un láser de argón, calibrado a 488 nanómetros de excitación. El citómetro fue programado para realizar un conteo máximo de 500 000 eventos celulares por muestra sanguínea.

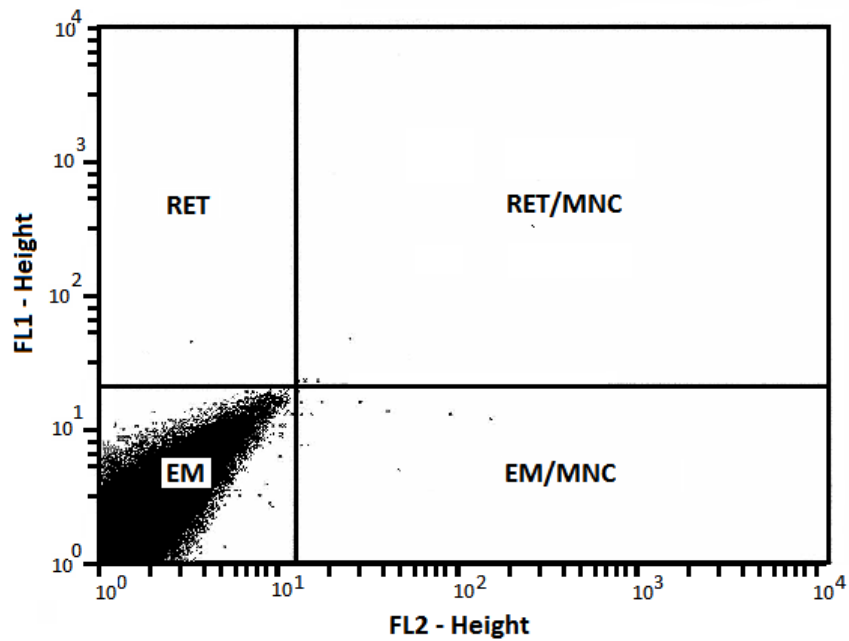
Para la adquisición y análisis de los eventos celulares, se empleó el programa de Cyflogic v1.2.1. El programa graficó los datos de tamaño celular con el parámetro dispersión frontal o “Forward Scatter” (FSC) donde analizó la luz desviada a bajos

ángulos entre 1 y 10 grados. Dicha desviación de luz fue proporcional al tamaño celular. Se graficó la complejidad de la estructura celular o granularidad relativa con el parámetro de dispersión lateral o “Side Scatter” (SSC) analizando la luz dispersada a 90 grados con respecto a al láser.

Para entender la fluorescencia, hay que mencionar que un fluorocromo es una molécula química que absorbe la luz a una determinada longitud de onda y emite a una longitud superior. El fluorocromo usado fue yoduro de propidio que interaccionó con la luz de excitación procedente del láser ajustado a 488 nm. Además, se utilizó el anticuerpo policlonal CD71 anti rata, el cual se unió a secuencias no específicas de ADN. La cantidad de fluorescencia con la cual se tiñó cada célula fue proporcional a la cantidad de sitios de unión o de ADN y se graficó con los parámetros FL1 y FL2.

Con el programa Cyflogic v1.2.1 se graficó los parámetros FSC y SSC. Se detectaron y eliminaron las regiones de agregados y *debris* celulares, dejando la región celular de 5 a 10 μm de diámetro en la que se encuentran los eritrocitos (EM) y reticulocitos (RET).

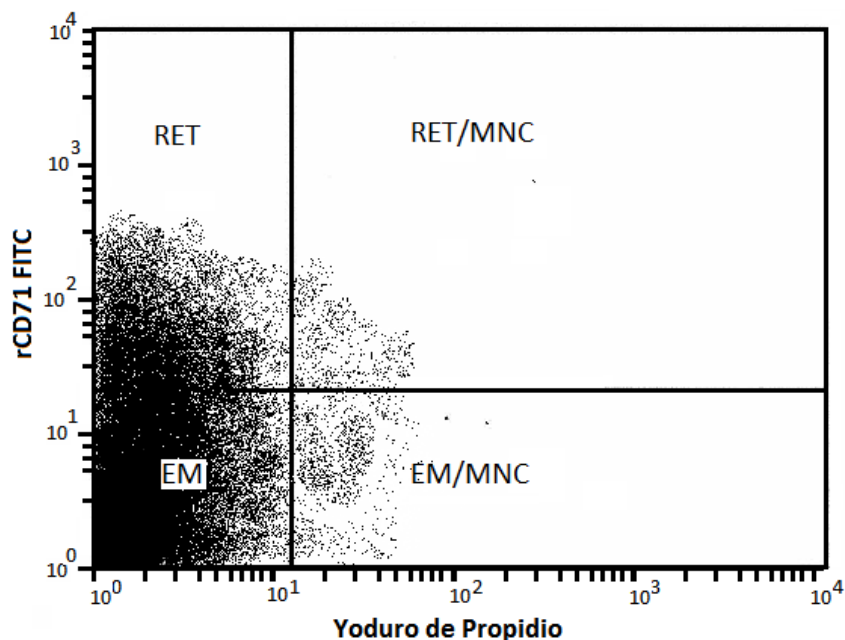
Los datos celulares restantes, fueron graficados con FL1 y FL2 como se ejemplifica en la Figura 3, la cual se asemeja al tipo de fluorescencia que arrojó la muestra celular del tubo “A”. A partir de ésta muestra se logró identificar la fluorescencia celular *per se* y se definió los umbrales de tamaño y fluorescencia base.



RET: reticulocitos, EM: eritrocitos, MNC: células micronucleadas

Figura 3. Regiones de análisis celular.

Una vez hecho lo anterior, se corrieron los datos celulares del tubo “B” donde se usó el anticuerpo CD71 anti rata. La gráfica resultante (Figura 4) presentó mayor fluorescencia gracias al uso del anticuerpo CD71. En los cuadrantes superiores se identificaron los reticulocitos (RET), en los inferiores los eritrocitos maduros (EM), a la izquierda se encontraron las células sin micronúcleos, mientras que a la derecha aquellas micronucleadas (MNC).



RET: reticulocitos, EM: eritrocitos, MNC: células micronucleadas

Figura 4. Zonas celulares del análisis de micronúcleos.

Análisis estadístico. Como el número de micronúcleos es influenciado por el número de reticulocitos contabilizados, fue necesario hacer una estandarización. Por ésta razón, se reportó la Citotoxicidad sumando el número de Eritrocitos policromáticos (EPC) y el número de Eritrocitos Normocromáticos (ENC) y determinando el porcentaje de EPC. Para evaluar Genotoxicidad se reportó el número de Eritrocitos Normocromáticos Micronucleados (ENCMN) más el número de Eritrocitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos (ENC + EPC).

Los datos morfométricos y celulares de cada ardilla, se parearon con los respectivos promedios atmosféricos de cada contaminante, se correlacionaron y se les hizo un ANOVA multifactorial para determinar su significancia estadística.

Análisis de varianza. La técnica fundamental del ANOVA consistió en la separación

de la suma de cuadrados en componentes relativos a los factores contemplados en el modelo.

$$SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Error}} + SS_{\text{Factores}}$$

El número de grados de libertad se realizó de forma similar y correspondió con la forma en que la distribución chi-cuadrado (χ^2 o Ji-cuadrada) describió la suma de cuadrados asociada.

$$gl_{\text{Total}} = gl_{\text{Error}} + gl_{\text{Factores}}$$

Una vez que se calcularon las sumas de cuadrados, las medias cuadráticas, los grados de libertad y la F, se elaboró un cuadro que reunió la información del ANOVA con el método de Fisher.

Por último se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales de tipo matricial (ACP) para generar tres escenarios de genotoxicidad encontrados en *S. aureogaster*. Es decir, se utilizó el ACP para conocer que contaminantes y/o zonas de la Ciudad de México tuvieron mayor asociación a la presencia de micronúcleos en *S. aureogaster*.

Las variables medidas en el presente estudio comprendieron un total de quince, pero para llevar a cabo el ACP fueron reducidas a nueve porque algunas de éstas aportaron información redundante en la explicación del efecto genotóxico de la contaminación atmosférica.

Las medidas de peso y longitud de tibia se simplificaron se usaron para calcular un *índice de masa corporal* (IMC) dividiendo el peso en gramos entre la longitud de

tibia en milímetros según lo reportado por Wirsing y colaboradores (2002). El IMC aportó un dato estandarizado de mejor explicación. La longitud de cola como la longitud corporal se eliminaron ya que aportaron información redundante para el ACP.

Únicamente para recordar, se entendió por *citotoxicidad* al porcentaje de eritrocitos policromáticos (%EPC) de cada mil eritrocitos, normocromáticos y policromáticos. Así mismo, se entendió por *genotoxicidad* al número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) de cada mil eritrocitos policromáticos (EPC).

A pesar de la reducción de quince a nueve variables, no es posible hacer una gráfica donde se observe el efecto genotóxico de todas las mediciones de manera simultánea. Por ésta razón, se utilizó el ACP, el cual puede minimizar los datos en una gráfica de dos y hasta tres dimensiones para visualizar, en este caso, el efecto genotóxico de la contaminación atmosférica de la Ciudad de México en *S. aureogaster*.

Para el realizar el ACP basado en una matriz de correlaciones, se tomó en cuenta que el valor de cada una de las m variables aleatorias F_j . Para cada uno de los n individuos se tomó el valor de éstas variables y se escribió el conjunto de datos en forma de matriz:

$$(F_j^\beta)_{j=1, \dots, m}^{\beta=1, \dots, n}$$

Hay que resaltar que cada conjunto:

$$\mathcal{M}_j = \{F_j^\beta | \beta = 1, \dots, n\}$$

pudo considerarse una muestra aleatoria para la variable F_j . A partir de los $m \times n$ datos correspondientes a las m variables aleatorias, pudo construirse la matriz de correlación muestral, que fue definida por

$$\mathbf{R} = [r_{ij}] \in M_{m \times m} \quad \text{donde} \quad r_{ij} = \frac{\text{cov}(F_i, F_j)}{\sqrt{\text{var}(F_i)\text{var}(F_j)}}$$

Puesto que la matriz de correlaciones es simétrica entonces resulta diagonalizable y sus valores propios de λ_i verifican:

$$\sum_{i=1}^m \lambda_i = 1$$

Debido a la propiedad anterior estos m valores propios reciben el nombre de pesos de cada uno de los m componentes principales. Los factores principales identificados matemáticamente se representan por la base de vectores propios de la matriz \mathbf{R} . Está claro que cada una de las variables pudo ser expresada como combinación lineal de los vectores propios o componentes principales.

6. RESULTADOS

Del cuidado de los animales estudiados. La detección de micronúcleos en sangre periférica arroja un mayor conteo celular en menor tiempo con respecto al análisis de células de bazo o de médula, donde es necesario sacrificar al animal (Witt *et al.*, 2008). Por eso, la SEMARNAT (2014) recomienda que para estudios de vida libre, es indispensable cuidar a los individuos evitando en lo más posible su sacrificio.

Para cumplir con la recomendación de la SEMARNAT (2014), fue necesaria la aceptación del protocolo de manejo animal de la presente investigación, por parte del Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En la evaluación del CICUAE se determinó que el manejo propuesto para *S. aureogaster*, causaría un estrés o dolor leve de corta duración, por lo cual, fue categorizado en el nivel B de la escala de daño animal, según la NOM-032-ZOO-1999. Acto seguido, dicho comité otorgó el permiso institucional de investigación.

Se llevaron a cabo 80 capturas, 20 por parque, conforme a lo propuesto en el calendario de trabajo y diseño experimental. Del total de especímenes, 32 fueron hembras (38.3%) y 48 machos (61.7%).

Morfometría agrupada por género. En el Cuadro 1 se presentan los promedios de la morfometría de *S. aureogaster*, general y dividida por género. Para tener una mejor estimación de la condición corporal de los especímenes, fue calculado un índice de masa corporal (IMC) dividiendo el peso (en gramos) entre la longitud de la tibia (en milímetros) de cada individuo.

Se encontró que el peso promedio de todos los especímenes ($n = 80$) fue de 508 gramos. Las hembras ($n = 32$) promediaron 528.0 g, mientras los machos ($n = 48$) 495.6 g respectivamente (Figura 3). La longitud corporal se mantuvo en un promedio de 26.0 cm para hembras y machos. La longitud de la cola promedió 22.6 cm en general. La longitud de la tibia mantuvo un promedio de 70.8 mm para ambos grupos. El IMC presentó un promedio de 7.2 unidades para ambos grupos (Cuadro 1).

Los parámetros morfométricos agrupados por género (Cuadro 1) no presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo que ecológicamente se denomina como “ausencia de dimorfismo”. Los únicos indicadores de dimorfismo fueron las estructuras anatómicas sexuales.

Morfometría agrupada por parque. En el Cuadro 2 se presentan los promedios de las variables morfométricas de *S. aureogaster* agrupadas por hábitat. Las longitudes de cuerpo, cola y tibia no presentaron diferencias significativas entre parques (Cuadro 2).

Para la variable de peso, el Bosque de Aragón fue el sitio con los individuos más ligeros, con 28.5 g debajo de la media. Los parques 18 de Marzo y Viveros de Coyoacán presentaron mayor uniformidad en sus pesos con tan sólo 4.0 g y 9.4 g por encima de la media. Por último, el Bosque de Chapultepec tuvo ardillas más pesadas con 16.5 g por encima del promedio general.

El IMC de los especímenes del Bosque de Aragón fue más ligero, desviándose 0.4 unidades por debajo de la media general. El parque 18 de Marzo presentó un IMC igual a la media. Chapultepec y Viveros de Coyoacán presentaron sólo 0.2 unidades por encima del promedio general, como se observa en el Cuadro 2 y en la Figura 4.

La prueba de medias determinó que las variables morfométricas de *S. aureogaster*, no presentaron diferencias significativas entre los hábitat. Es decir, no hubo un efecto significativo del hábitat en la morfometría de los individuos usados para el análisis toxicológico (n = 80).

Daño citotóxico por parque. En el Cuadro 3 se presentan los promedios de daño citotóxico de *S. aureogaster* agrupados por parque. El Bosque de Chapultepec y el Bosque de Aragón fueron los dos sitios con mayores proporciones de daño citotóxico (68.5 y 63.3%). El Parque 18 de Marzo y Viveros de Coyoacán presentaron menores índices respectivamente (56.9 y 53.8%).

En la Figura 5 se presentan los promedios de citotoxicidad de los cuatro parques estudiados. Se observa claramente cómo aquellos parques con mayor citotoxicidad, presenta entre 7 y 15 % más daño que aquellos con menor daño citotóxico.

La prueba de medias determinó que *S. aureogaster* presentó diferencias significativas de daño citotóxico entre hábitats ($p < 0.0001$) es decir, existe evidencia estadística que sugiere que el hábitat afecta significativamente el daño citotóxico observado en la ardilla gris.

Daño genotóxico por parque. En el Cuadro 3 se presentan los promedios de daño genotóxico de *S. aureogaster* agrupados por parque. Se observa que el Bosque de Aragón y Viveros de Coyoacán presentaron mayor daño genotóxico promedio con 7.87 y 6.40 unidades. El Bosque de Chapultepec y el Parque 18 de Marzo presentaron 4.94 y 4.53 unidades respectivamente.

Aquí, hay que mencionar que el daño genotóxico encontrado en *S. aureogaster*, se analizó comparando sus valores con la literatura, por esta razón, en la Figura 6,

se presentan los promedios de genotoxicidad de los hábitats en cuestión, además de un quinto valor tomado de literatura. Dicho valor, reporta el daño genotóxico basal de *S. aureogaster* en condiciones de laboratorio según Zúñiga y colaboradores (2001a y 2001b).

La prueba de medias para daño genotóxico determinó que no existieron diferencias significativas entre hábitats ($p < 0.0001$), sin embargo, esto no quiere decir que no existió daño genotóxico significativo en los hábitat. Sugiere que todos los hábitat en donde se encontraban las ardillas en estudio tuvieron un cierto nivel de daño genotóxico cercano entre sí. Esto se comprueba con el daño encontrado en condiciones de laboratorio, pues es aproximadamente entre 2 y 3 veces menor según lo reportó Zúñiga y colaboradores (2001a y 2001b).

Matriz de correlaciones. En el Cuadro 4 se presenta una matriz de correlaciones las variables medidas. El índice de masa corporal (IMC) se usó como descriptor de la condición corporal en *S. aureogaster*. Los valores de citotoxicidad y genotoxicidad resumieron las condiciones de daño celular. Las concentraciones atmosféricas de cada uno de los contaminantes, fueron usadas para el análisis. Las demás variables no fueron incluidas porque aportaron información redundante. Las correlaciones aparecen en color negro, la significancia estadística en gris.

Citotoxicidad asociada a las variables de la matriz. La citotoxicidad tuvo una correlación significativa con el parque ($r = - 0.26$, $p = 0.022$). En otras palabras, el parámetro de citotoxicidad de *S. aureogaster*, fue influido significativamente por las condiciones atmosféricas del parque en el que fue tomada la muestra sanguínea (Cuadro 4).

El sexo y el IMC no se correlacionaron significativamente con el daño citotóxico de

S. aureogaster. Así mismo la citotoxicidad no presentó una correlación significativa con el parámetro de genotoxicidad. Es decir, las variables que provocaron un daño citotóxico significativo no necesariamente provocaron daño genotóxico en la ardilla gris (Cuadro 4).

Los contaminantes CO, NO, O₃, PM_{2.5} y SO₂ no tuvieron una correlación significativa con el daño citotóxico encontrado en *S. aureogaster*. En cambio, los contaminantes NO₂, NOx y PM₁₀ si presentaron una correlación estadísticamente significativa con el daño citotóxico (Cuadro 4).

Dicha correlación positiva, (NO₂ r = 0.27, p = 0.015; NOx r = 0.24, p = 0.031; PM₁₀ r = 0.21, p = 0.049) indicó que a mayor concentración atmosférica de dichos contaminantes, se encontró mayor citotoxicidad en *S. aureogaster* como se observa en las Figuras 7, 8 y 9.

Genotoxicidad asociada a las variables de la matriz. La genotoxicidad no tuvo una correlación significativa con el parque, es decir, el parámetro de genotoxicidad de *S. aureogaster*, no fue influido significativamente por las condiciones del parque en el que fue tomada la muestra sanguínea (Cuadro 4).

El sexo y el IMC no tuvieron una correlación significativa con la genotoxicidad de encontrada en *S. aureogaster* como se observa en el Cuadro 4. Ningún contaminante presentó una correlación estadísticamente significativa con la genotoxicidad en *S. aureogaster*, únicamente el ozono (r = 0.26, p = 0.02) como se observa en el Cuadro 4.

La correlación positiva del ozono con el parámetro de genotoxicidad indicó que, ante un aumento de su concentración atmosférica, la cantidad de micronúcleos en reticulocitos policromáticos (EPCMN) de *S. aureogaster* incrementó

significativamente Figura 10.

Análisis de componentes principales (ACP). Para el análisis de componentes principales se usó como base la matriz de correlaciones del Cuadro 4. Así, los componentes fueron *eigenvectors* o autovectores de la matriz de correlaciones, los cuales se analizaron asignando una importancia equitativa a todas las variables originales (Cuadro 5).

A partir de la matriz de correlaciones, se obtuvo un cuadro de *eigenvalues* o autovalores acumulativos. Con las primeras dos filas se mostró que al hacer una gráfica de dos dimensiones, el ACP explicaría un 46.7% de la variación de la citotoxicidad y genotoxicidad encontrada en *S. aureogaster*, asociada a la los niveles contaminación atmosférica de la Ciudad de México, el 63.3% restante se debió a otras causas independientes de la contaminación atmosférica (Cuadro 6).

En la Figura 11 se muestra el gráfico resultante del ACP, donde cada asterisco simboliza a un individuo, con su número de identificación, mientras que los colores representan el nivel de daño citotóxico y genotóxico encontrado en *S. aureogaster* asociado al nivel de contaminación atmosférica. En color rojo se observan los individuos con mayor daño genotóxico asociado a altas concentraciones de los contaminantes atmosféricos. En color azul y negro aquellos individuos con daño genotóxico intermedio. En color café aquellos con daño genotóxico mínimo asociados a bajas concentraciones de contaminación atmosférica.

En el Cuadro 7, se presentan los promedios de la contaminación atmosférica y de daño celular encontrado en *S. aureogaster* en los cuatro escenarios de genotoxicidad del gráfico resultante del ACP. La *n* y los promedios de cada escenario se obtuvieron de los cuatro grupos coloreados de la gráfica del ACP de la Figura 11.

Cuadro 1. Parámetros medidos en hembras y machos de ardilla gris (*S. aureogaster*) de cuatro parques de la Ciudad de México.

Variable	Hembras		Machos		General	
	<i>(n = 32)</i>		<i>(n = 48)</i>		<i>(n = 80)</i>	
	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
PESO	(gr)	528.0 ± 51.0	495.6 ± 63.5	508.4 ± 60.6		
CUERPO	(cm)	26.1 ± 1.0	26.0 ± 1.4	26.0 ± 1.2		
COLA	(cm)	23.5 ± 2.0	22.1 ± 2.0	22.6 ± 2.1		
TIBIA	(mm)	70.7 ± 2.0	70.9 ± 2.6	70.8 ± 2.3		
IMC**		7.5 ± 0.6	7.0 ± 0.8	7.2 ± 0.8		

** Índice de Masa Corporal (Peso en gramos/Longitud tibia en milímetros)

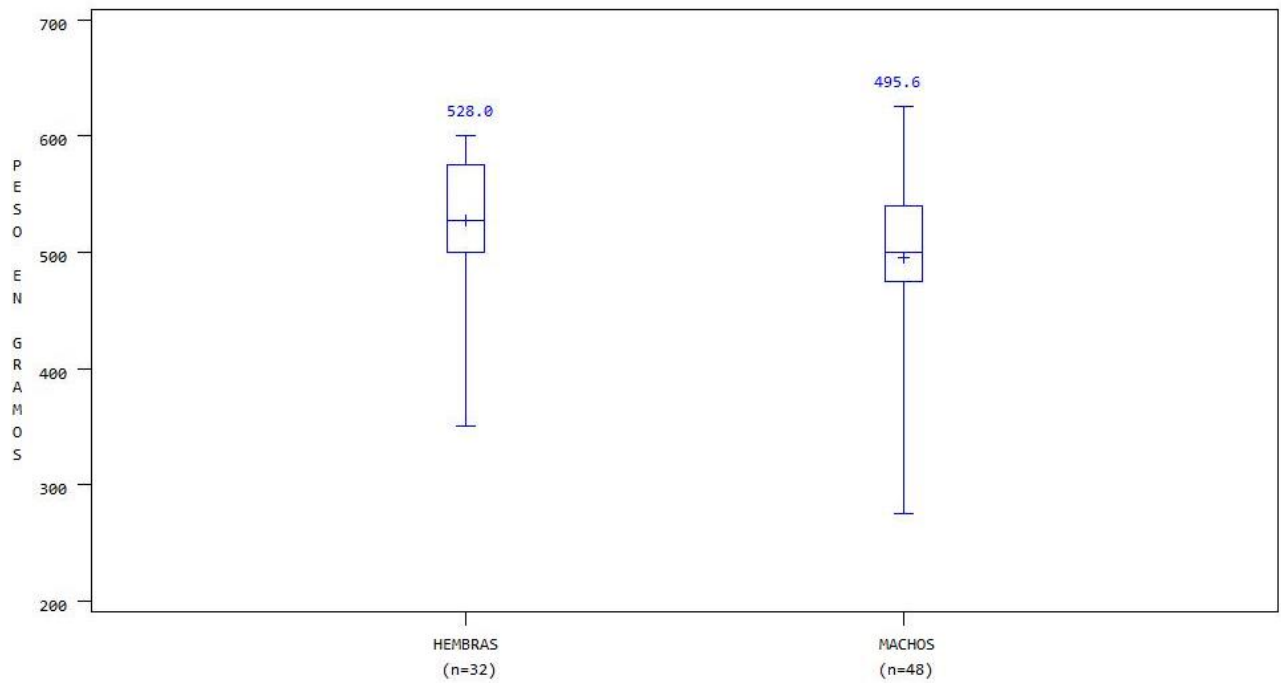


Figura 5. Distribución de pesos *S. aureogaster* agrupados por género.

Cuadro 2. Morfometría de la ardilla gris (*S. aureogaster*) de cuatro parques de la Ciudad de México.

Variable	Aragón		Chapultepec		18 de Marzo		Viveros		General	
	<i>(n = 20)</i>		<i>(n = 20)</i>		<i>(n = 20)</i>		<i>(n = 20)</i>		<i>(n = 80)</i>	
	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>	<i>Promedio</i>	<i>DS</i>
PESO (gr)	479.5 ± 68.9		524.5 ± 42.0		512.0 ± 46.3		517.8 ± 73.1		508.4 ± 60.6	
CUERPO (cm)	25.6 ± 1.3		26.4 ± 1.2		25.9 ± 0.8		26.1 ± 1.5		26.0 ± 1.2	
COLA (cm)	22.4 ± 2.0		22.5 ± 1.9		22.6 ± 2.7		23.0 ± 1.9		22.6 ± 2.1	
TIBIA (mm)	70.7 ± 3.1		71.1 ± 2.1		71.4 ± 1.6		70.3 ± 2.4		70.8 ± 2.3	
IMC*	6.8 ± 0.8		7.4 ± 0.5		7.2 ± 0.6		7.4 ± 1.0		7.2 ± 0.8	

* Índice de Masa Corporal (Peso en gramos/Longitud tibia en milímetros)

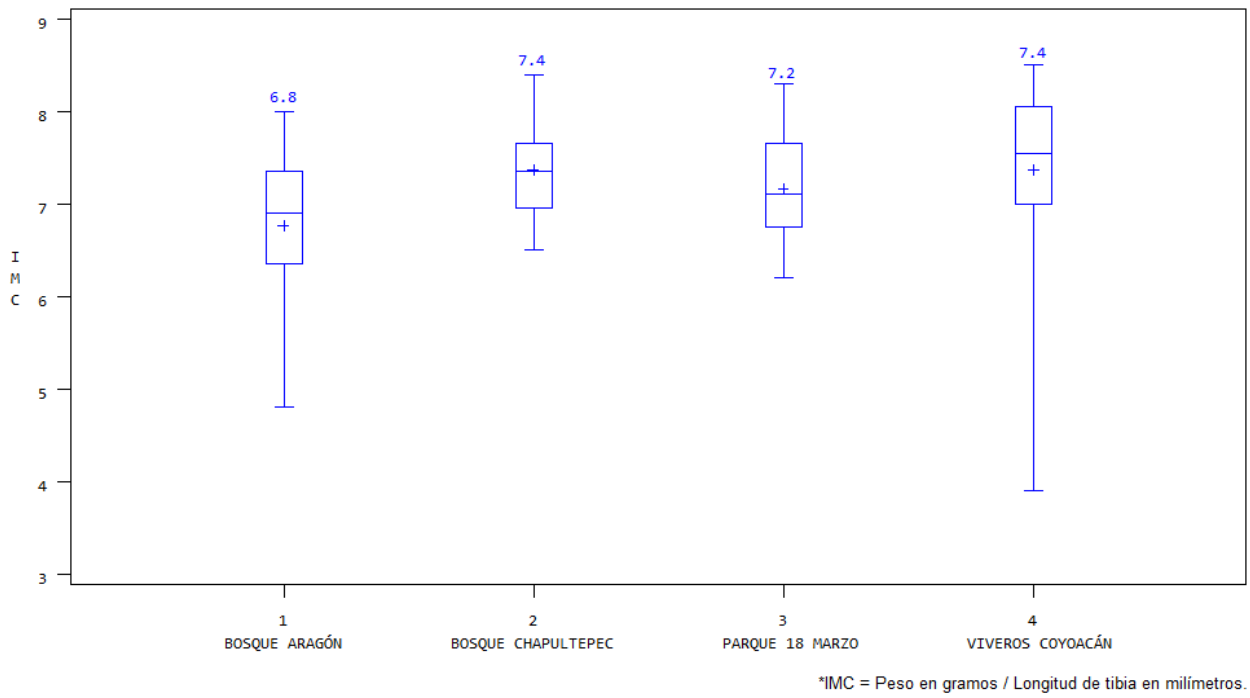


Figura 6. Distribución de IMC* de *S. aureogaster* de cuatro parques de la Ciudad de México.

Cuadro 3. Promedios celulares y de daño genotóxico de *S. aureogaster* de cuatro parques de la Ciudad de México.

Variable	Aragón (n = 20)	Chapultepec (n = 20)	18 de Marzo (n = 20)	Viveros (n = 20)	General (n = 80)
	<i>Promedio DS</i>	<i>Promedio DS</i>	<i>Promedio DS</i>	<i>Promedio DS</i>	<i>Promedio DS</i>
%EPC	62.9 ± 15.9	68.2 ± 13.3	56.7 ± 15.9	53.6 ± 20.2	60.3 ± 17.2
MN/1000**	6.6 ± 8.5	4.1 ± 4.2	3.1 ± 3.8	4.8 ± 6.7	4.6 ± 6.1

**Número de micronúcleos por cada mil eritrocitos en sangre periférica.

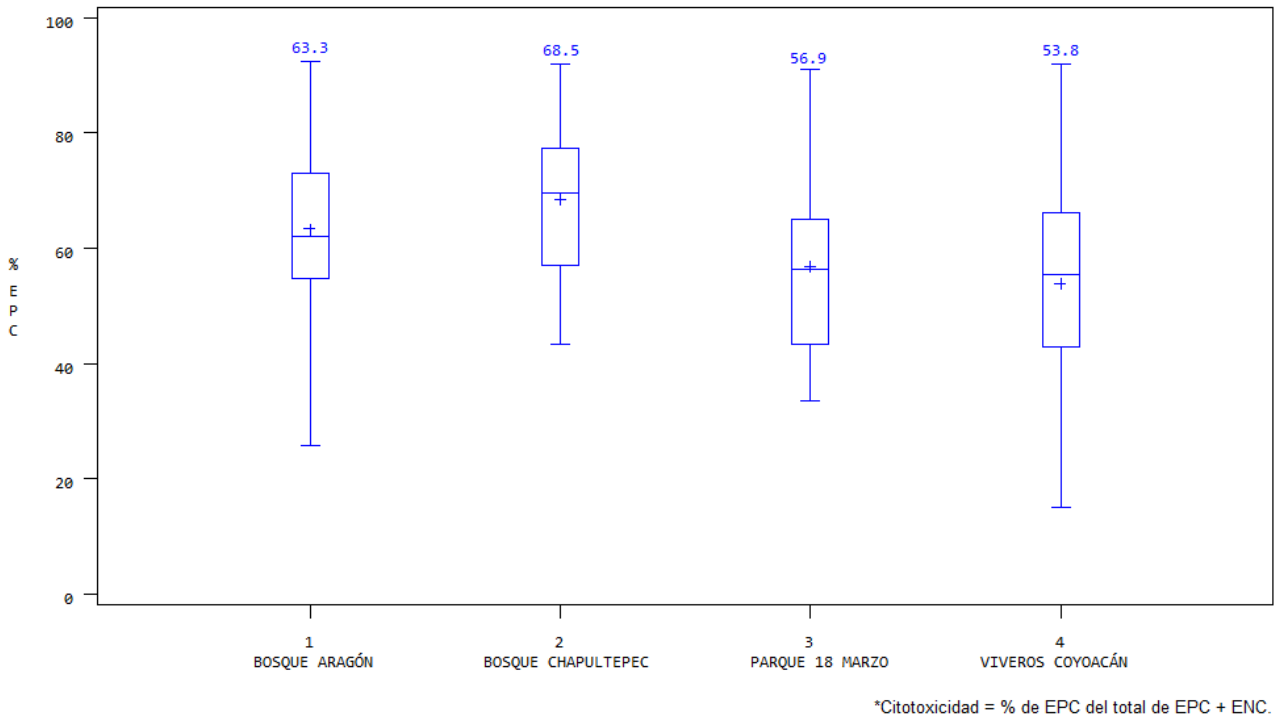


Figura 7. Índice de citotoxicidad en *S. aureogaster* de cuatro parques de la Ciudad de México.

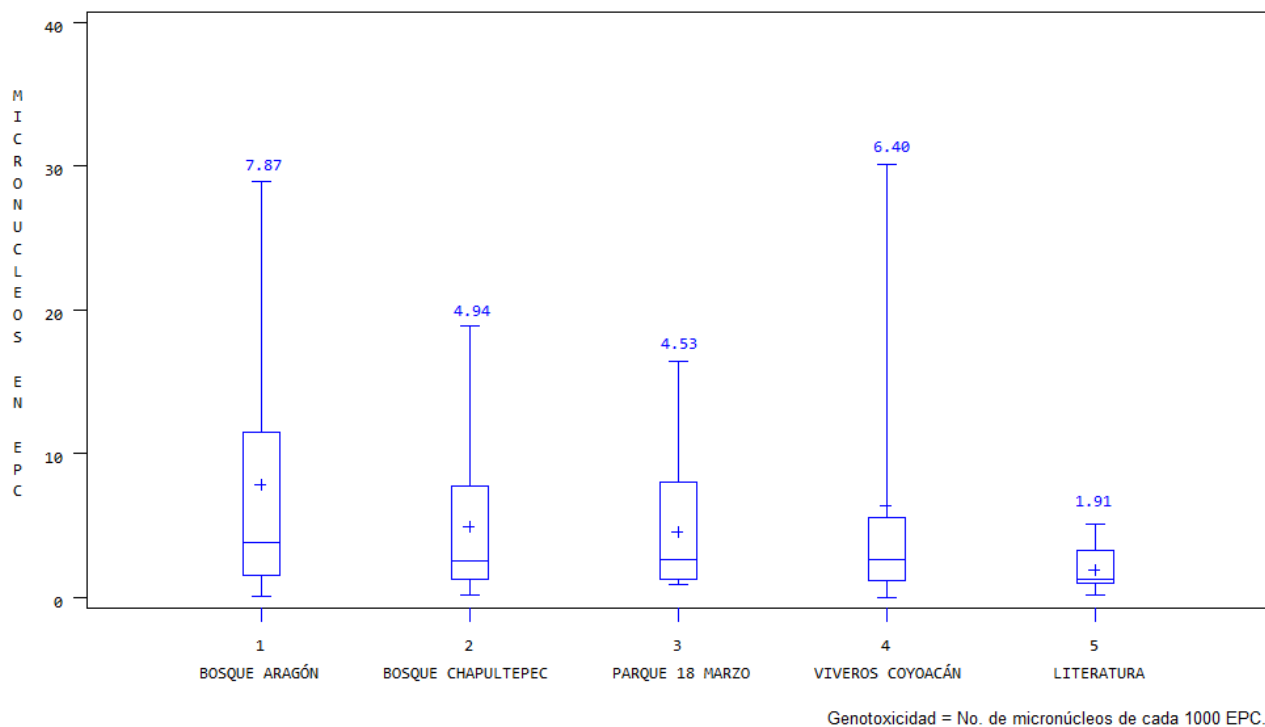


Figura 8. Índice de genotoxicidad en *S. aureogaster* de cuatro parques de la Ciudad de México.

Cuadro 4. Matriz de correlaciones para las variables medidas.

	PARQUE	SEXO	IMC	CITO	GENO	CO	NO	NO2	NOx	O3	PM10	PM25
PARQUE												
SEXO	0.02											
	0.84											
IMC	0.23	-0.31										
	0.04	0.01										
CITO	-0.26	0.22	-0.03									
	0.02	0.06	0.80									
GENO	-0.12	-0.10	0.15	0.18								
	0.29	0.39	0.19	0.11								
CO	-0.02	-0.08	-0.09	0.15	0.18							
	0.86	0.49	0.41	0.19	0.12							
NO	0.09	0.00	0.04	0.18	-0.01	0.63						
	0.43	0.97	0.75	0.10	0.95	<.0001						
NO2	-0.48	0.21	-0.14	0.27	-0.01	0.41	0.33					
	<.0001	0.06	0.22	0.01	0.94	0.00	0.00					
NOx	0.06	0.06	0.04	0.24	0.00	0.65	0.90	0.49				
	0.59	0.61	0.69	0.03	0.97	<.0001	<.0001	<.0001				
O3	0.09	-0.08	0.06	-0.04	0.26	-0.29	-0.54	-0.56	-0.45			
	0.41	0.48	0.58	0.71	0.02	0.01	<.0001	<.0001	<.0001			
PM10	-0.23	0.15	-0.18	0.21	0.18	0.66	0.19	0.68	0.43	-0.14		
	0.04	0.20	0.12	0.05	0.11	<.0001	0.09	<.0001	<.0001	0.21		
PM25	-0.12	0.25	-0.19	0.03	0.00	0.27	0.14	0.63	0.28	-0.35	0.53	
	0.29	0.03	0.10	0.80	0.98	0.02	0.23	<.0001	0.01	0.00	<.0001	
SO2	-0.13	0.05	-0.18	0.11	-0.02	0.51	0.42	0.26	0.49	-0.10	0.43	0.17
	0.26	0.67	0.11	0.34	0.89	<.0001	0.00	0.02	<.0001	0.36	<.0001	0.14

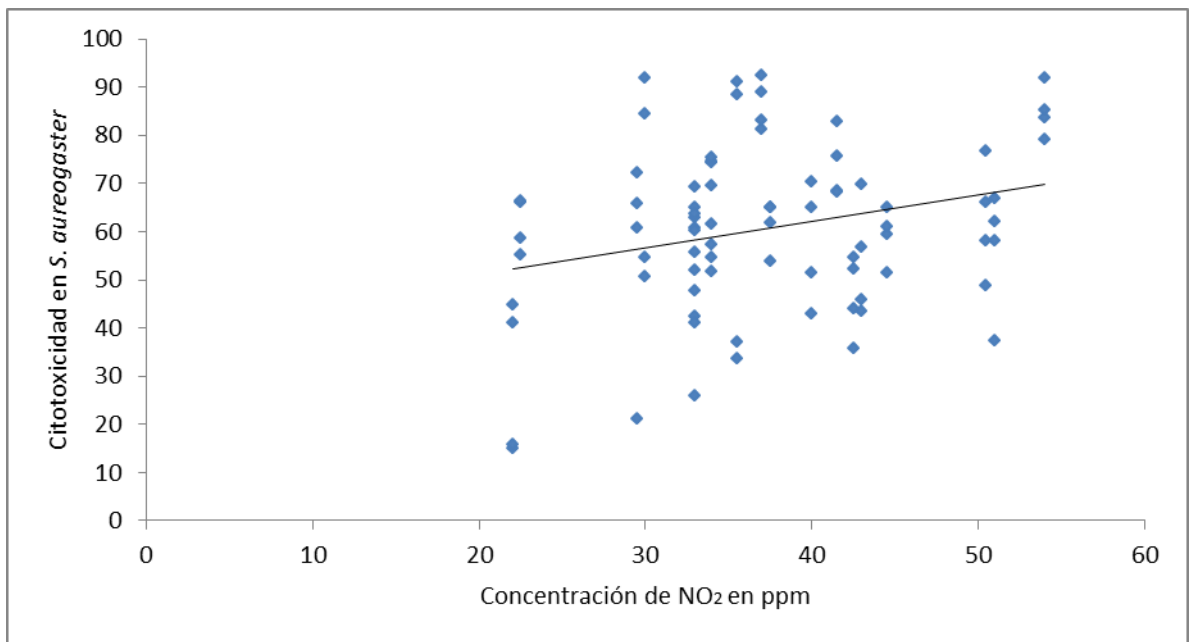


Figura 9. Niveles de NO₂ versus Citotoxicidad en *S. aureogaster* (r = 0.27, p = 0.015).

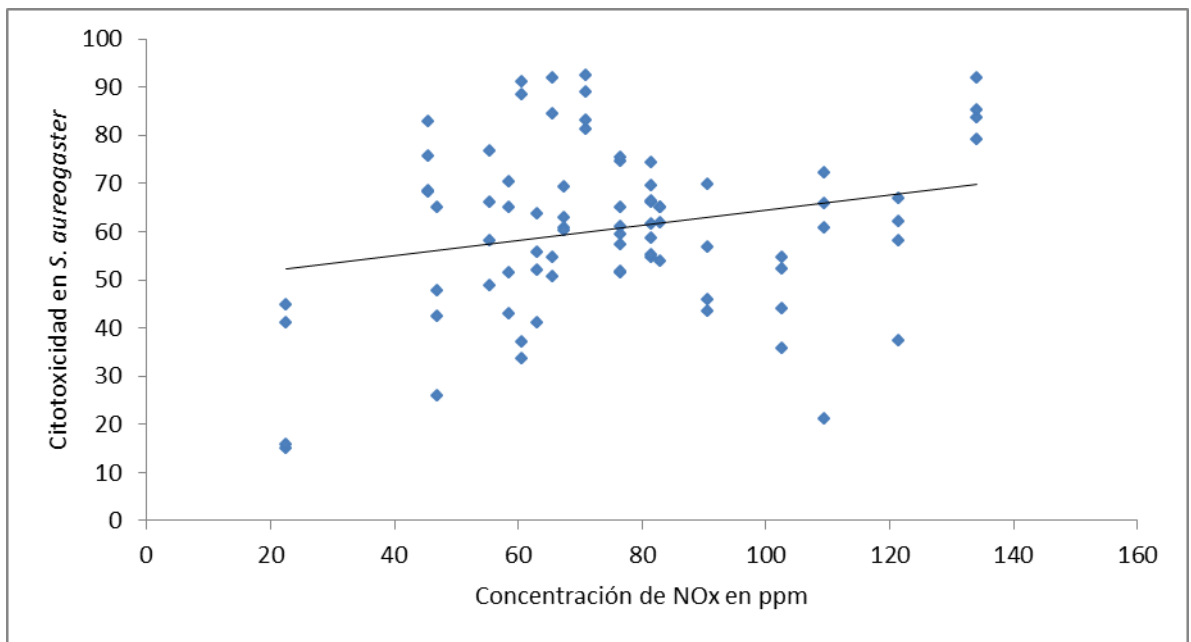


Figura 10. Niveles de NOx *versus* Citotoxicidad en *S. aureogaster* ($r = 0.24$, $p = 0.031$).

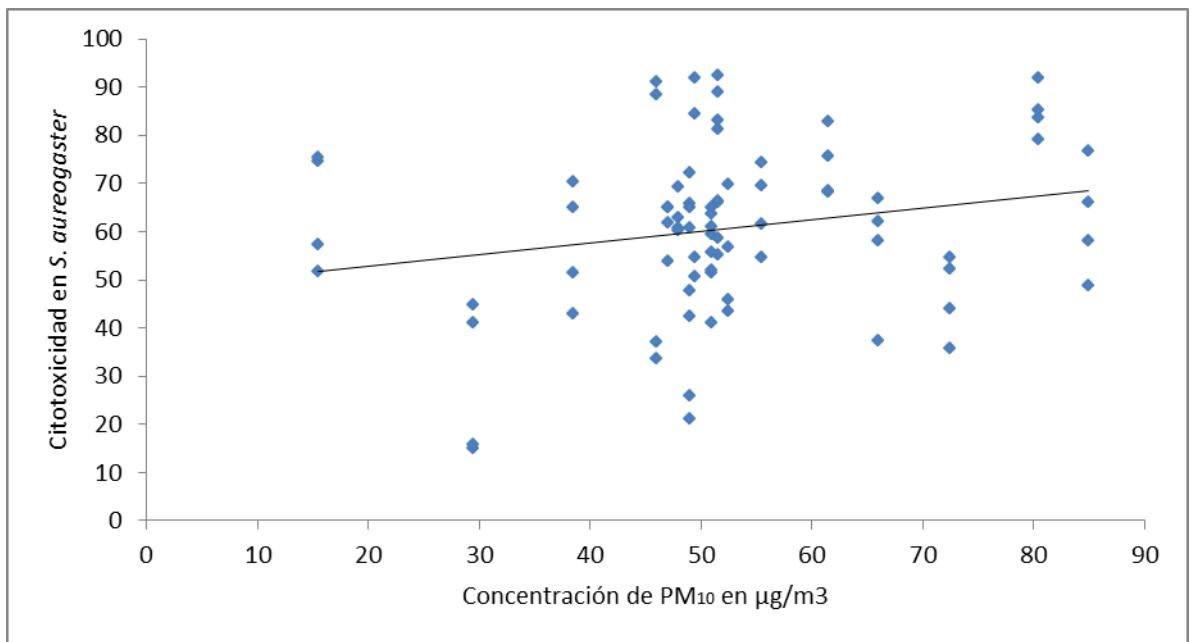


Figura 11. Niveles de PM₁₀ *versus* Citotoxicidad en *S. aureogaster* ($r = 0.22$, $p = 0.049$).

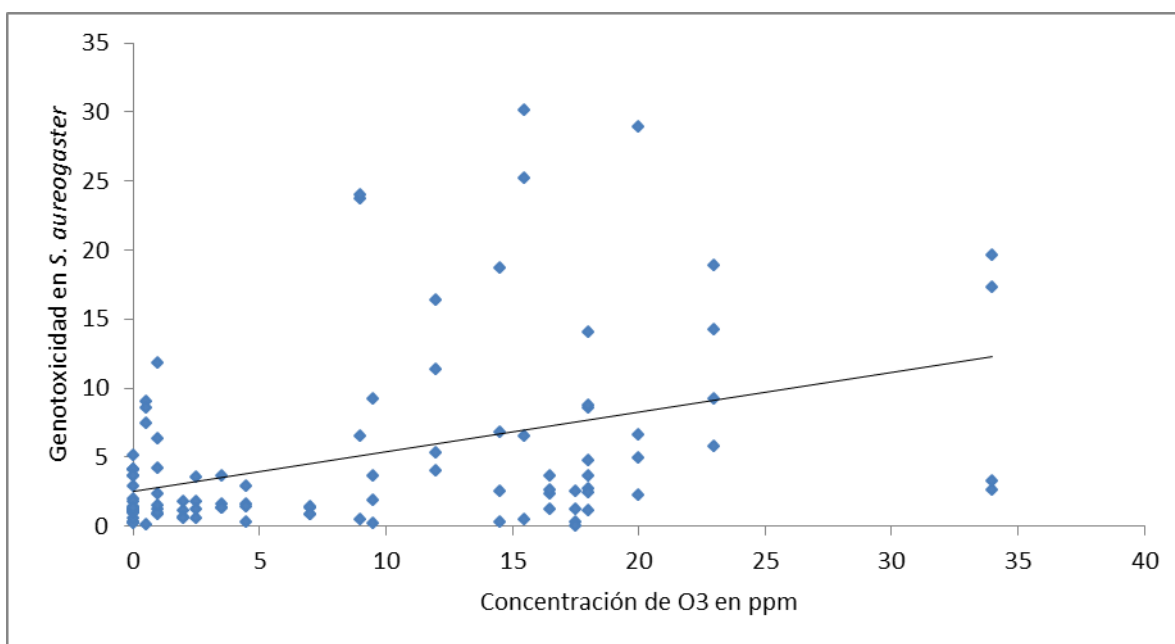


Figura 12. Niveles de O₃ versus Genotoxicidad en *S. aureogaster* (r = 0.26 y p = 0.018).

Cuadro 5. Eigenvectores o vectores propios del ACP.

	Prin1*	Prin2*	Prin3	Prin4	Prin5	Prin6	Prin7	Prin8	Prin9	Prin10	Prin11	Prin12	Prin13
PARQUE	-0.117	0.403	-0.292	0.359	-0.242	0.463	0.101	-0.240	0.135	-0.267	-0.339	0.237	0.088
SEXO	0.093	-0.355	-0.244	0.466	0.210	0.428	-0.257	0.328	-0.385	0.012	0.194	-0.017	-0.028
IMC	-0.096	0.385	0.081	-0.483	0.097	0.469	0.326	0.423	-0.189	-0.053	0.217	-0.047	0.015
CITO	0.156	-0.132	0.163	0.038	0.767	0.198	0.233	-0.292	0.331	-0.231	0.007	0.008	0.000
GENO	-0.036	0.113	0.628	-0.057	-0.033	0.247	-0.674	0.064	0.097	-0.179	-0.157	0.017	-0.034
CO	0.373	0.231	0.210	0.121	-0.153	-0.045	0.034	-0.380	-0.301	-0.146	0.584	0.306	-0.175
NO	0.349	0.408	-0.160	0.038	0.190	-0.083	-0.267	0.006	0.066	0.271	0.105	-0.135	0.681
NO2	0.389	-0.282	-0.014	-0.333	-0.015	0.062	0.028	0.078	-0.157	0.079	-0.370	0.668	0.180
NOx	0.400	0.318	-0.077	0.057	0.125	0.059	-0.045	0.060	0.065	0.466	-0.273	-0.100	-0.631
OZONO	-0.286	-0.029	0.457	0.348	-0.023	0.132	0.283	0.009	0.072	0.625	0.067	0.247	0.168
PM10	0.357	-0.178	0.299	0.053	-0.252	0.187	0.300	-0.193	-0.312	-0.041	-0.299	-0.547	0.187
PM25	0.282	-0.294	-0.100	-0.127	-0.394	0.340	-0.014	0.045	0.637	0.098	0.339	-0.071	-0.007
SO2	0.285	0.118	0.210	0.382	-0.063	-0.314	0.250	0.610	0.218	-0.347	-0.052	0.081	0.023

* Valores utilizados para analizar la asociación de la citotoxicidad y genotoxicidad con la contaminación atmosférica.

Cuadro 6. Autovalores acumulativos del ACP.

No.	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	4.213	2.350	0.324	0.324
2	1.863	0.348	0.143	0.467*
3	1.516	0.378	0.117	0.584
4	1.138	0.044	0.088	0.672
5	1.095	0.146	0.084	0.756
6	0.949	0.312	0.073	0.829
7	0.637	0.091	0.049	0.878
8	0.546	0.145	0.042	0.920
9	0.401	0.090	0.031	0.951
10	0.311	0.105	0.024	0.975
11	0.206	0.119	0.016	0.990
12	0.087	0.047	0.007	0.997
13	0.039	0.003		1.000

El ACP explicó un 46.7 % de la variabilidad en genotoxicidad.

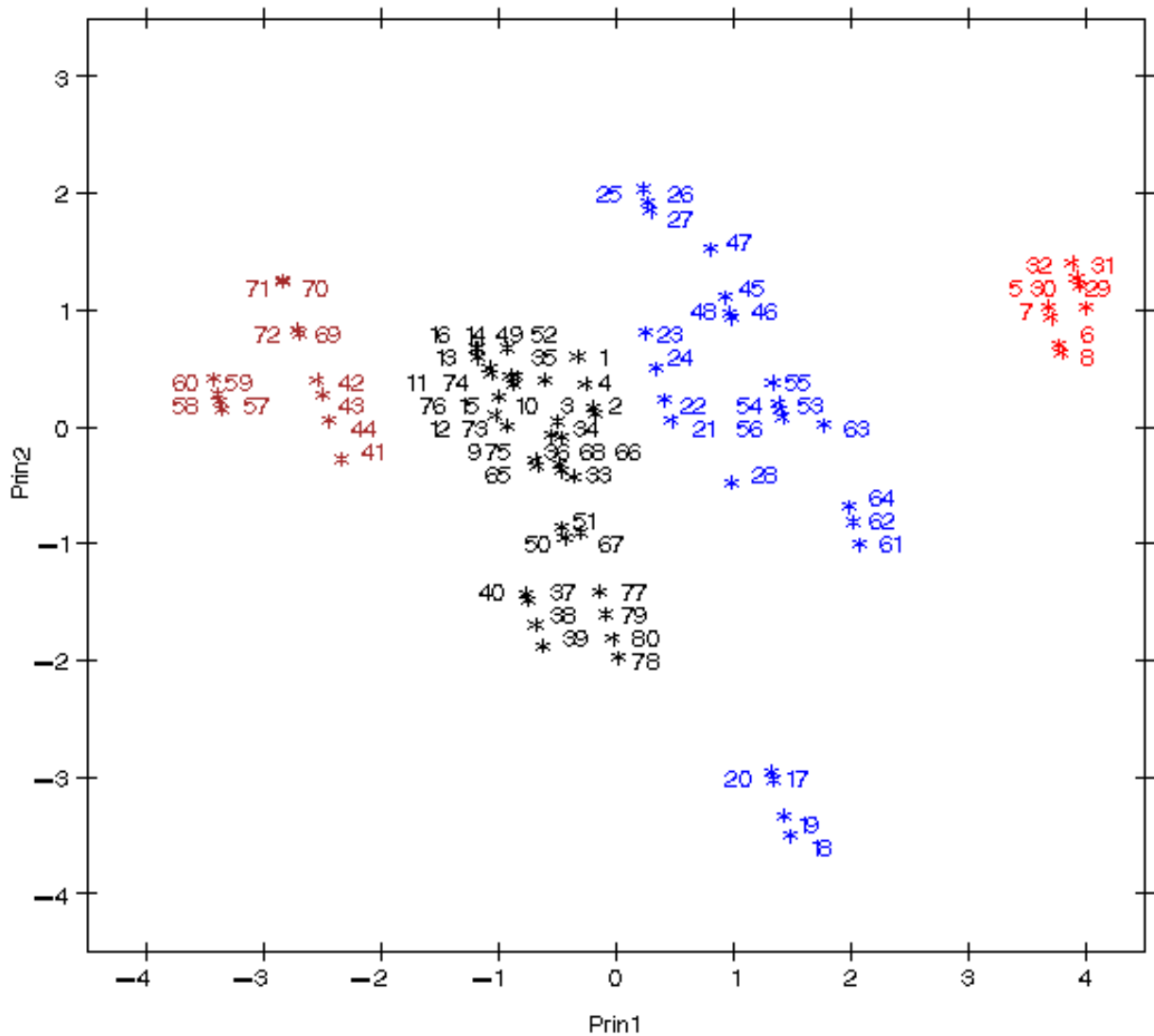


Figura 13. Análisis de componentes principales para daño celular en *S. aureogaster* y contaminación atmosférica de cuatro parques de la Ciudad de México.

Cuadro 7. Promedios de contaminación atmosférica, IMC y daño genotóxico de *S. aureogaster* en tres escenarios de genotoxicidad.

Variable	Marrón		Negro		Azul		Rojo	
	(n = 12)		(n = 25)		(n = 35)		(n = 8)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
Citotoxicidad †	7.65 ± 0.48		7.04 ± 0.77		7.18 ± 0.95		7.05 ± 0.31	
Genotoxicidad **	51.64 ± 19.89		63.17 ± 17.38		57.12 ± 12.98		70.37 ± 17.78	
IMC	5.38 ± 6.21		6.31 ± 6.93		6.41 ± 8.93		3.64 ± 3.80	
CO (ppm)	0.52 ± 0.28		0.83 ± 0.34		1.34 ± 0.24		1.70 ± 0.16	
NO (ppm)	19.83 ± 18.08		26.28 ± 9.63		46.25 ± 22.63		75.75 ± 5.08	
NO2 * (ppm)	26.17 ± 5.79		36.39 ± 4.55		39.50 ± 6.93		52.50 ± 1.60	
Nox * (ppm)	60.17 ± 27.90		61.67 ± 9.83		87.08 ± 17.68		127.75 ± 6.68	
O3 * (ppm)	22.83 ± 8.27		11.61 ± 6.93		9.08 ± 7.09		1.00 ± 0.00	
PM10 (mg/m3)	32.17 ± 15.48		49.56 ± 5.74		60.25 ± 14.13		73.25 ± 7.75	
PM2.5 (mg/m3)	19.83 ± 2.19		26.67 ± 6.83		34.17 ± 4.83		31.25 ± 1.34	
SO2 (ppm)	2.50 ± 2.26		2.83 ± 1.41		3.50 ± 1.22		6.75 ± 0.27	

* Variables con un efecto significativo ($p < 0.05$) de daño celular.

** Micronúcleos por cada mil EPC

† % de EPC de (EPC + ENC)

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se analizó el efecto citotóxico de la contaminación atmosférica de la Ciudad de México, medido en el porcentaje de eritrocitos policromáticos (% EPC), así como el daño genotóxico medido por la cantidad de micronúcleos por cada mil eritrocitos policromáticos (EPCMN) de *S. aureogaster* de cuatro diferentes sitios. A continuación, se discutirán los resultados obtenidos.

Del método de detección de micronúcleos. Para iniciar la discusión hay que subrayar que se realizó una comparación de métodos de detección de micronúcleos, utilizando microscopía con tinción de “Wright” y citometría de flujo. Con la primera se hizo un conteo de 100,000 eritrocitos (EPC y ENC), logrando analizar 100 muestras, de 1000 células cada una, en dos meses aproximadamente. Mediante la citometría de flujo se obtuvo un conteo de 500,000 eventos celulares en cuestión de horas, pudiendo analizar hasta un total de 10 muestras en un solo día.

Después dicho análisis de laboratorio, se optó por utilizar la técnica de citometría de flujo porque la evaluación por microscopía con tinción de “Wright”, implicó un enorme esfuerzo y tiempo invertido. Además, la citometría de flujo es un análisis el citométrico con mayor sensibilidad y más rápido. Ésta decisión, también se sustenta con el estudio de Witt y colaboradores (2008) quienes mencionan que debido al gran número de células que pueden ser analizadas, la citometría de flujo tiene un mayor poder de detección con respecto a los métodos tradicionales basados en microscopía.

Hallazgos asociados a la especie S. aureogaster. Ieradi y colaboradores (1996) mencionan que los roedores usados como bio-indicadores, son de gran ayuda para la detección de genotoxicidad asociada a la contaminación atmosférica local. Debido a las cantidades de micronúcleos encontradas en *S. aureogaster*, Zúñiga-González y colaboradores (2001a) sugieren que esta especie es un buen modelo de análisis citogenético. Con los datos celulares obtenidos en este trabajo, se confirma que la ardilla gris es un buen modelo de análisis citogenético.

A continuación se mencionan algunas especies de roedores usadas para el análisis de micronúcleos de cada 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) en vida libre. *A. flavicollis* (2.5), *M. arvalis* (1.5), *Mus domesticus* (0.97), *Sciurus aureogaster* (0.91), *Mus spretus* (0.26), *Spermophilus mexicanus* (0.13), *Coendou mexicanus* (0.10), *Spermophilus annulatus* (0.06) y *Spermophilus variegatus* (0.05), (Mitkovska *et al.*, 2012; Zúñiga-González *et al.*, 2000; Ieradi *et al.*, 1998; Ieradi *et al.*, 1996). Como se observa, *S. aureogaster* se encuentra entre los primeros cuatro roedores con mayor presencia de micronúcleos espontáneos.

En este trabajo se encontró que el género del animal no estuvo relacionado significativamente con variaciones en la citotoxicidad y genotoxicidad de *S. aureogaster*. De aquí se interpreta que hembras y machos presentan una respuesta celular muy similar en condiciones ambientales propicias para el de daño citotóxico y genotóxico (Cuadro 1).

Con base en los resultados de laboratorio, Zúñiga-González y colaboradores (2001a) encontraron que la edad en *S. aureogaster*, estimada mediante morfometría, afecta al número de micronúcleos en sangre periférica. Reportaron

que individuos juveniles presentaron mayor número de eritrocitos policromáticos micronucleados que aquellos en fase adulta ($r = -0.552$, $p < 0.0001$).

En este estudio no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre dichas variables (Cuadro 4), sin embargo, existe una explicación a dicho fenómeno. Todos los individuos usados para la presente investigación, fueron capturados al azar en distintos parques, por lo que, cada uno de ellos estuvo sujeto a distintas condiciones medioambientales potencialmente citotóxicas y genotóxicas.

Adicionalmente, los especímenes evaluados por Zúñiga-González y colaboradores (2001a) estaban en fase de crecimiento, puesto que tuvieron un peso inicial promedio de 125 ± 33.8 g y finalizaron con 342 ± 87.7 g. Los individuos utilizados en ésta investigación se encontraban en su fase adulta, ya que promediaron un peso de 508.4 ± 60.56 g.

Desde ese punto de vista, se concluye que la no significancia aquí encontrada, es resultado únicamente de las condiciones y objetivos particulares del presente estudio y se toma como más acertados los resultados de Zúñiga-González y colaboradores (2001a) donde la edad si influyó la tasa de micronúcleos eritrocitarios de *S aureogaster* en fase de crecimiento y en condiciones de laboratorio.

Así mismo, se ha encontrado que la nutrición es un factor que influye en la proporción de micronúcleos eritrocitarios. Cervantes (2006) encontró que la desnutrición tiene un efecto genotóxico significativo en individuos juveniles.

En este trabajo el índice de masa corporal (IMC) de *S. aureogaster*, no tuvo asociación significativa con la citotoxicidad y genotoxicidad de *S. aureogaster* (Cuadro 4). Dicho resultado es relativo, puesto que no hubo variación importante del IMC entre los individuos estudiados (Figura 4).

Es muy probable encontrar una asociación estadísticamente significativa entre el IMC y el número de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de *S. aureogaster*, pero en condiciones controladas para dicho propósito.

De la citotoxicidad asociada a la contaminación. De acuerdo al Cuadro 4, los contaminantes NO₂, NO_x y PM₁₀ presentaron un efecto significativo en el parámetro de citotoxicidad de *S. aureogaster*. La correlación positiva de NO₂ (r = 0.27, p = 0.01) NO_x (r = 0.24, p = 0.03) y PM₁₀ (r = 0.21, p = 0.05) indicó que a mayor concentración atmosférica de dichos contaminantes, las ardillas presentaron mayor daño citotóxico (Figuras 7, 8 y 9).

Mitkovska y colaboradores (2012) apoyan éste resultado pues encontraron un aumento significativo de micronúcleos en *A. flavicollis* y *M. arvalis* asociado a un sitio con gran contaminación NO₂ y SO₂, aunque no precisan las concentraciones. en ese ambiente..

Al igual que los resultados encontrados en *S. aureogaster*, Osornio–Vargas y colaboradores (2003) encontraron que las PM₁₀ del Norte y Sur de la Ciudad de México provocaron citotoxicidad *in vitro*.

Los contaminantes CO, NO, O₃, PM_{2.5} y SO₂ no presentaron un efecto significativo

sobre las cantidades de reticulocitos de sangre periférica de *S. aureogaster*. Con esto, se podría interpretar que dichos contaminantes no tienen un efecto de citotoxicidad, sin embargo, es probable que durante el estudio, las cantidades promedio de dichos contaminantes no fueron lo suficientemente altas para provocar un efecto celular significativo.

De la genotoxicidad asociada a la contaminación. Ninguno de los contaminantes presentó un efecto significativo en las cantidades eritrocitos policromáticos micronucleados de *S. aureogaster*, excepto el ozono. De acuerdo al Cuadro 4, la correlación positiva del ozono ($r = 0.26$, $p = 0.02$), muestra que a mayor concentración atmosférica de éste contaminante, la ardilla gris presentó un aumento de micronúcleos en sangre (Figuras 10, 11 y 12).

Hasta aquí, las correlaciones presentadas en este trabajo indican que los contaminantes no tuvieron un efecto significativo en la aparición de micronúcleos en las poblaciones de ardillas en estudio. Cabe mencionar que es muy probable encontrar variaciones de genotoxicidad asociadas a la contaminación atmosférica en concentraciones de exposición de contaminantes mayores a las de aquí tenidas.

El NO de la Ciudad de México según Madronich (2006), experimenta una rápida inestabilidad como tal ya que este se disocia por acción de los rayos rolares en otros compuestos nitro–aromáticos encontrándolo en concentración relativa baja.

Debido a que NOx es el resultado de sumar a los contaminantes NO y NO₂, se observa que el daño genotóxico provocado por NO₂ ($r = 0.27$), disminuye poco

cuando se presenta en la forma de NO_x ($r = 0.24$). Esto se debe a que, el NO₂ presentó menor concentración que el NO.

La no significancia de la correlación de PM₁₀ con la genotoxicidad, se apoya en lo publicado por Valle–Hernández y colaboradores (2010), quienes determinaron que el promedio de PM₁₀ para la Ciudad de México durante la época seca, entre los años 2006 y 2007 fue de 73 µg/m³. Durante el presente estudio el promedio de PM₁₀ fue de 56.9 µg/m³ para el Bosque de Aragón, 53.1 µg/m³ en el Bosque de Chapultepec, 54.0 µg/m³ para el Parque 18 de Marzo y 46.1 µg/m³ en Viveros de Coyoacán, es decir, en promedio 20 µg/m³ por debajo de las concentraciones encontradas por Valle–Hernández y colaboradores (2010).

Asimismo, Valle–Hernández y colaboradores (2010) determinaron que el promedio de PM_{2.5} para toda la Ciudad de México fue de 47.2 µg/m³, mientras que durante la presente investigación el Bosque de Aragón obtuvo 27.6 µg/m³, el Bosque de Chapultepec 29.2 µg/m³, el Parque 18 de Marzo 32.7 µg/m³ y Viveros de Coyoacán 23.9 µg/m³.

Osornio–Vargas y colaboradores (2003) encontraron que las PM₁₀ y PM_{2.5} del Norte de la Ciudad de México provocaron mayor genotoxicidad *in vitro*, ya que estuvieron compuestas de mayor cantidad de metales.

Todos estos resultados de genotoxicidad *versus* concentración atmosférica por contaminante llevan a evaluar el efecto encontrado según el hábitat, ya que cada parque presentó distintos niveles de concentración atmosférica.

Del daño genotóxico asociado al hábitat. El hábitat tuvo un efecto significativo en

las cantidades celulares de reticulocitos y micronúcleos ya que las cantidades encontradas en *S. aureogaster* fueron muy distintas entre los cuatro sitios.

El Bosque de Aragón y el Bosque de Chapultepec, presentaron mayores porcentajes de EPC, lo que indica que las ardillas tuvieron una tasa de renovación celular más acelerada con respecto a las ardillas de los parques Viveros de Coyoacán y Parque 18 de Marzo (Figura 5).

En Viveros de Coyoacán se observó un daño genotóxico menor con respecto a los demás parques. Sin embargo al comparar el nivel de daño en la población de dicho parque con lo reportado en literatura, se encontró que Viveros de Coyoacán presenta un nivel de daño tres veces superior al encontrado en condiciones de laboratorio (Cuadro 3 y Figura 6).

con lo publicado por Roubiceka y colaboradores (2007) quienes encontraron que los contaminantes atmosféricos del Norte de la Ciudad de México tuvieron mayor efecto genotóxico celular, atribuible a una mayor presencia de la industria en esta zona de la urbe mexicana. Asimismo, Osornio–Vargas y colaboradores (2003) encontraron que las PM_{10} y $PM_{2.5}$ del Norte tuvieron mayor citotoxicidad que las del Sur, sin embargo todas tuvieron un cierto grado de genotoxicidad.

Análisis de componentes principales. En la Figura 11 se puede observar claramente cuatro asociaciones de daño genotóxico, cada uno con niveles de contaminantes atmosféricos variables. En color rojo se presentaron los individuos con mayor daño genotóxico, seguidos de aquellos en color azul, negro y café. Aquellos individuos de mayor daño genotóxico (color rojo) fueron del Bosque de

Chapultepec y Parque 18 de Marzo. De igual forma, la moda en la zona de color azul estuvo constituida por animales de estos dos parques. Por su parte, la zona con un daño genotóxico intermedio (color negro) estuvo constituida principalmente por animales del Bosque de Aragón y Viveros de Coyoacán. Por último, la zona de daño mínimo, estuvo constituida por animales en su mayoría de Viveros de Coyoacán y Bosque de Chapultepec (Figura 11).

8. CONCLUSIÓN

- La contaminación atmosférica de la Ciudad de México, se asocia con el aumento de daño citotóxico en la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), independiente de la zona de estudio.
- Los contaminantes correlacionados con la citotoxicidad fueron NO₂, NO_x y PM₁₀ respectivamente.
- La contaminación atmosférica de la Ciudad de México, se asocia con el aumento en el daño genotóxico en la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*), con diferencias importantes por zona de estudio.
- Las ardillas del Bosque de Aragón y Viveros de Coyoacán presentaron mayor genotoxicidad asociada a la contaminación atmosférica.
- El O₃ fue el contaminante que tuvo una correlación significativa con el daño genotóxico en *S. aureogaster*.

9. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

Nombre extenso	Sigla
Ácido Etilendiaminotetracético	EDTA
Análisis de Varianza	ANOVA
Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad	CONABIO
Demographia World Urban Areas	DWUA
Dirección General de Gestión Ambiental de Aire	DGGAA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	FMVZ
Gobierno del Distrito Federal (México)	GDF
Índice Metropolitano de Calidad del Aire	IMECA
Instituto de Biología UNAM	IBIUNAM
Instituto Nacional de Estadística y Geografía	INEGI
Integrated Taxonomic Information System	ITIS
International Union for Conservation of Nature	IUCN
National Center for Biotechnology Information	NCBI
Norma Oficial Mexicana	NOM
Organización de las Naciones Unidas	ONU
Procuraduría Federal de Protección al Ambiente	PROFEPA
Secretaría de Desarrollo Social	SEDESOL
Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales	SEMARNAT
Secretaría de Salud	SSA
Sistema de Información Geográfica	SIG
Sistema de Monitoreo Atmosférico	SIMAT
Sistema de Posicionamiento Global	GPS
Sistema Nacional de Información Ambiental y Recursos Naturales	SNIARN
Solución amortiguadora de boratos	BBS
Solución amortiguadora de fosfatos	PBS
Universidad Autónoma Chapingo	UACH
Universidad Autónoma Metropolitana	UAM
Universidad Nacional Autónoma de México	UNAM
World Center for Monitoring and Control	WCMC

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akimoto H., 2003. Global air quality and pollution. *Science* 302, 1716 – 1719.
- Alfaro–Moreno E., Ponce de León Rosales S., Osornio–Vargas A. R., Martínez L., García–Cuellar C., Rosas I., Bonner J. C., Clifford M. J., 2002. Biologic effects induced *in vitro* by PM₁₀ from three different zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives* 110, 715 – 720.
- Aranda M., Rosas O., De Jesús Ríos J. y García N. 2002. Análisis comparativo de la alimentación del gato montés (*Lynx rufus*) en dos diferentes ambientes de México. *Acta Zoológica Mexicana* 87, 99 – 109.
- Arriaga–Colina J. L., West J. J., Sosa G., Escalona S.S., 2004. Measurements of VOCs in Mexico City (1992–2001) and evaluation of VOCs and CO in the emissions inventory. *Atmospheric Environment* 38, 2523 – 2533.
- Bell M. L., Davis D. L., Gouveia N., Borja–Aburto V. H. y Cifuentes L. A., 2006. The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environmental Research* 100, 431 – 440.
- Ben–Sholomo R., Shanas U., 2011. Genetic ecotoxicology of asbestos pollution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*). *Environmental Science of Pollutants* 18, 1264 – 1269.
- Best T. L., 1995. *S. oculatus*. *Mammalian species* 498, 1 – 3.
- Bickham J. W., Sandhu S. S., Hebert P. D. N., Chikhi L., Athwal R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463, 33 – 51.
- Borja–Aburto V., Loomis D., Bangdiwala S., Shy C., Rascón R., 1997. Ozone, suspended particles, and daily mortality in Mexico City. *American Journal of Epidemiology* 145, 258 – 268.
- Borja–Aburto V., Castillejos D. R., Gold S. B., Loomis D., 1998. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993–1995. *Environmental Health Perspectives*

106, 849 – 855.

- Bradley A. C., Alitzer S., 2006. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 95 – 101.
- Brown D. E., 1984. Arizona's tree squirrels. Arizona Game and Fish Department, 39 – 61.
- Brunekreef B. y Holgate S. T., 2002. Air pollution and health. *The Lancet* 360, 1233 – 1242.
- Buschini A., Martino A., Gustavino B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi C., Santoro M., Dörr A. J. M. y Rizzoni M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed *in situ* to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research* 557, 119 – 129.
- Calderón–Ezquerro C., Guerrero–Guerra C., Sansores–Martínez R., Calderón–Segura M. E., Villalobos–Pietrini R., Amador–Muñoz O. y Gómez–Arroyo S., 2010. Genotoxicity in lymphocytes of smokers living in México City. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 26, 47 – 63.
- Calderón–Garcidueñas L., Gambling T. M., Acuna H., Garcia R., Osnaya N., Monroy S., Villarreal–Calderón A., Carson J., Koren H. S., y Devlin R. B., 2001. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: Part 2. Cardiac pathology. *Toxicological Sciences* 61, 356 – 367.
- Calderón–Garcidueñas L., Marronpot R. R., Torres–Jardon R., Calderón–Ayala L., Villarreal–Calderón A., Henríquez–Roldan C., Choonhoven R., Acuna–Ayala H., Nakamura J., Fernando R., Reed W., Azzarelli B. y Swenberg J. A., 2003. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicologic Pathology* 31, 524 – 538.
- Calderón–Garcidueñas L., Osorno–Velázquez H., Bravo–Álvarez R., Delgado–Chávez A., Barrios–Márquez R., 1992. Histopathologic changes of the nasal mucosa in southwest metropolitan Mexico City inhabitants. *Environmental Health Perspectives* 100, 225 – 232.
- Camargo R., Lichtenfels A., Soares S. R., Macchione M., Nascimento P. H., Dolhnikoff M.,

2006. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environmental Research* 101, 356 – 361.
- Camerer Z., Elhajouji A., Suter W., 2007. *In vivo* micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutation Research* 626, 26 – 33.
- Campos–Trujillo A., 2006. Evaluación de partículas atmosféricas PST Y PM₁₀ en la Ciudad de Chihuahua, México: niveles de concentración, composición elemental e identificación de fuentes emisoras. (Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia). Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.
- Carranza–López L. P., 2011. Cuantificación de micronúcleos en células de sangre periférica de mototaxistas que trabajan en la ciudad de Cartagena de Indias (Tesis Magister en Toxicología. Facultad de Medicina). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Carvalho–Oliveira R., Pozo R. M. K., Lobo D. J. A., Lichtenfels A. J. F. C., Martins–Junior H. A., Bustilho J. O. W. V., Saiki M., Sato I. M., y Saldiva P. H. N., 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil. *Environmental Research* 97, 1 – 7.
- Ceballos G., Arroyo–Cabral J., 2012. Lista actualizada de los mamíferos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva Época* 2, 27 – 80.
- Cervantes E. R., 2006. Evaluación de la presencia de micronúcleos en eritrocitos de niños con desnutrición moderada y grave. (Tesis Maestría en Ciencias Biológicas y de la Salud.). Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México DF.
- Chow J. C., Watson J. G., Edgerton S. A., Vega E., 2002. Chemical composition of PM_{2.5} y PM₁₀ in Mexico City during winter 1997. *Science Total Environment* 287, 177 – 201.
- Churg A., Brauer M., Ávila–Casado M. C., Fortoul T., Wright J., 2003. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environmental Health Perspectives* 111, 714 – 719.
- Cislaghi C., Nimis P. L., 1997. Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature* 387, 463 – 464.

- Clerbaux C., Edwards D. P., Deeter M., Emmons L., Lamarque J. F., Tie X. X., Massie S.T., y Gille J., 2008. Carbon monoxide pollution from cities and urban areas observed by the Terra/MOPITT mission. *Geophysical Research Letters* 35, 1 – 6.
- Coronasa M. V., Pereira T. S., Rocha J. A. V., Lemos A.T., Fachel J. M. G., Salvador D. M. F., Vargasa V. M. F., 2009. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International* 35, 1023 – 1029.
- Crebelli R., Carere A., Leopardi, P., Conti L., Fassio F., Raiteri F., Barone D., Ciliutti P., Cinelli S. y Vericat J.A., 1999. Evaluation of 10 aliphatic halogenated hydrocarbons in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutagenesis* 14, 207 – 215.
- Cristaldi M., D'Arcangelo E., Ieradi L. A., Mascanzoni D., Matte P. T. y Van Axel C. P., 1990. Cs Determination and mutagenicity tests in wild *Mus musculus domesticus* before and after the Chernobyl accident. *Environmental Pollution* 64, 1 – 9.
- Crouse J. D., DeCarlo P. F., Weinheimer A. J., McCabe D. C., Yokelson R. J., Jimenez J. L. y Wennberg P. O., Blake D. R., Emmons L. K. , Campos T. L., Apel E. C., Clarke A. D., 2009. Biomass burning and urban air pollution over the Central Mexican Plateau. *Atmospheric Chemistry and Physics* 9, 4929 – 4944.
- Dasgupta S., Hettige H., Wheeler D., 1997. What improves environmental performance? evidence from mexican industry. *Development Research Group for World Bank* 1 – 28.
- De Foy B., Varela J. R., Molina L. T., Molina M. J., 2006. Rapid ventilation of the Mexico City basin and regional fate of the urban plume. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 2321 – 2335.
- De la Cruz A. V., 2003. Diagnóstico de la problemática relacionada con la ardilla (*S. aureogaster*), en las plantaciones de coco en El Paraíso, Tabasco y propuestas de solución (Tesis Licenciatura en Biología). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México.
- Dertinger S. D., Torous D. K., Hayashi M., MacGregor J. T., 2011. Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic

- damage. *Mutagenesis* 26, 139 – 145.
- DGGAA Dirección General de Gestión Ambiental de Aire, 2005. Evaluación de la exposición de la población de la zona metropolitana del Valle de México a Ozono y Partículas Menores a 10 micrómetros. Gobierno del Distrito Federal 1 – 44.
- DGGAA Dirección General de Gestión Ambiental de Aire, 2006. Resultados de la medición de PM_{2.5} y PM₁₀ en personal en las taquillas Taxqueña y Zócalo. Gobierno del Distrito Federal 1 – 5.
- Díaz R. V., Domínguez E. R., 2009. Health risk by inhalation of PM_{2.5} in the metropolitan zone of the City of Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 866 – 871.
- DOF Diario Oficial de la Federación 1993. NOM–021–SSA1–1993 Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al Monóxido de carbono (CO). Valor permisible para la concentración de Monóxido de carbono (CO) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población.
- DOF Diario Oficial de la Federación 1993. NOM–023–SSA1–1993 Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al Bióxido de nitrógeno (NO₂). Valor normado para la concentración de Bióxido de nitrógeno (NO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población.
- DOF Diario Oficial de la Federación 2011. NOM–085–SEMARNAT–2011 Contaminación atmosférica - niveles máximos permisibles de emisión de los equipos de combustión de calentamiento indirecto y su medición.
- DOF Diario Oficial de la Federación 2014. NOM-020-SSA1-2014 Valor límite permisible para la concentración de ozono (O₃) en el aire ambiente y criterios para su evaluación.
- DOF Diario Oficial de la Federación 2014. NOM-025-SSA1-2014 Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM₁₀ y PM_{2.5} en el aire ambiente y criterios para su evaluación.
- Dutra P. V. M. S., Da Silva J. M., Nepomuceno J. C., Pavanin L. A., 2013. *In situ* assessment of the Paraguay river water, in brazilian pantanal, by means of micronucleus assay with fish and chemical analysis. *Environmental Contamination*

- Toxicology Bulletin 90, 427 – 433.
- DWUA, Demographia World Urban Areas, 2014. Demographia world urban areas (World Agglomerations) 10th Edition 1 – 129.
- Echeverri–Londono C. A., Maya–Vasco G. J., 2008. Relación entre las partículas finas (PM_{2.5}) y respirables (PM₁₀) en la Ciudad de Medellín. Revista Ingenierías Universidad de Medellín 7, 23 – 42.
- Edgerton S. A., Arriaga J. L., Archuleta J., Bian X., Bossert J. E., Chow J. C., Coulter R. L., Doran J. C., Doskey P. V., Elliot S., Fast J. D., Gaffney J. S., Guzman F., Hubbe J. M., Lee J. T., Malone E. L., Marley N. A., McNair L. A., Neff W., Ortiz E., Petty R., Ruiz M., Shaw W. J., Sosa G., Vega E., Watson J. G., Whiteman D. C. y Zhong S., 1998. Particulate air pollution in Mexico City : A collaborative research project. Pacific Northwest National Laboratory, s/n, 1 – 25.
- Falcón–Ordáz J., Lamothe–Argumedo R., 2006. A new species of sciurodendrium (Nematoda: *heligmonellidae*) in *S. aureogaster* (rodentia: *sciuridae*) from Morelos, Mexico. Journal of Parasitology 92, 600 – 605.
- Fast J. D., De Foy B., Rosas F. A., 2007. A meteorological overview of the MILAGRO field campaigns. Atmospheric Chemistry and Physics 7, 2233 – 2257.
- Fenech M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research 455, 81 – 95.
- Fiedler R. D., Weiner S. K., Schuler M., 2010. Evaluation of a modified CD71 MicroFlow® method for the flow cytometric analysis of micronuclei in rat bone marrow erythrocytes. Mutation Research 703, 122 – 129.
- FMVZ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia–UNAM, 2001. Manual para la elaboración de tesis de grado y de artículos científicos en las ciencias de la producción y de la salud animal. FMVZ–UNAM. México DF, 1 – 16.
- Fuzinatto C. F., Flohr L., Melegari S. P., Matias W. G., 2013. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. Ecotoxicology and Environmental Safety 98, 103 – 109.
- Gauderman J. W., Avol E., Gilliland F., Vora H., Thomas D., Berhane K., McConnell R., Kuenzli N., Lurmann F., Rappaport E., Margolis H., Bates D., y Peters J., 2004. The

- effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *The New England Journal of Medicine* 351, 1057 – 1067.
- GODF Gaceta Oficial del Distrito Federal, 2013. Acuerdo por el que se emite resolución que determina el importe de la tarifa aplicable al Sistema de Transporte Colectivo (Metro). México DF. 1 – 8.
- Gómez–Peráles J. E., Colvile R. N., Nieuwenhuijsen M. J., Fernández–Bremauntz A., Gutiérrez–Avedoy V. J., Páramo–Figuroa V. H., Blanco–Jiménez S., Bueno–López E., Mandujano F., Bernabe–Cabanillas R., y Ortiz–Segovia E., 2003. Commuters' exposure to PM_{2.5}, CO, and benzene in public transport in the metropolitan area of Mexico City. *Elsevier* 11, 1219 – 1230.
- Grawe J., Zetterberg G., Amneus H., 1992. Flow–Cytometry enumeration fo micronucleated polychromatyc erythrocytes in mouse peripheral blood. *Cytometry* 13, 750 – 758.
- Guzmán–Morales J., Morton–Bermea O., Hernández–Álvarez E., Rodríguez–Salazar M., García–Alveolar M., Tasia–Cruz V., 2011. Assessment of urban area metal pollution in the rban area of Mexico City, using *Ficus benjamina* as biomonitor. *Environmental Contamination Toxicology Bulletin* 86, 495 – 500.
- Hansen C. A., Barnett A. G., Pritchard G., 2008. The effect of ambient air pollution during early pregnancy on fetal ultrasonic measurements during mid–pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 116, 362 – 369.
- Hayashi M., MacGregor J. T., Gatehouse D. G., Blakey D. H., Dertinger S. D., Abramsson–Zetterberg L., Krishna G., Morita T., Russo A., Asano N., Suzuki H., Ohyama W. y Gibson D., 2007. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non–hematopoietic target cells and a single dose–level limit test. *Mutation Research* 627, 10 – 30.
- Holguín F., Téllez–Rojo M., Hernández M., Cortez M., Chow J., Watson J., Mannino D., Romiew I., 2003. Air pollution and heart rate variability among the elderly in Mexico City. *Epidemiology* 14, 521 – 527.

- Hortelano–Moncada Y., Cervantes F., Trejo–Ortiz A., 2009. Mamíferos silvestres de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel en Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80, 507 – 520.
- Ieradi L. A., Cristaldi D., Mascanzoni E., Cardarelli E., Grossi R., Campanella L., 1996. Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environmental Pollution* 92, 323 – 328.
- Ieradi L. A., Moreno S., Boloavar J. P., Cappai A., DiBenedetto A., Cristaldi M., 1998. Free–living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. *Environmental Pollution* 102, 265 – 268.
- INECC, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático 2014. Página electrónica disponible en <http://www.inecc.gob.mx/>
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2013. México en cifras. Página electrónica disponible en <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>
- ITIS Integrated Taxonomic Information System 2013. Página electrónica disponible en <http://www.itis.gov/>
- IUCN International Union for Conservation of Nature 2013. Página electrónica disponible en <http://www.iucn.org/>
- Jiang M., Marr L. C., Dunela E. J., Herdon S. C., Jayne J. T., Kolb C. E., Knighton W. B., Rogers T. M., Zavala M., Molina L. T., y Molina M. J., 2005. Vehicle fleet emissions of black carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons, and other pollutants measured by a mobile laboratory in Mexico City. *Atmospheric Chemistry and Physics* 5, 3377 – 3387.
- Jorge E. M., 2008. Evaluación de micronucleogenicidad del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en un modelo *in vivo* de ratón. (Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia). Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.
- Kato T., Totsuka Y., Hasei T., Watanabe T., Wakabayashi K., Kinae N., y Masuda S., 2011. *In vivo* examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant,

- 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. *Environmental Toxicology* 10, 588 – 594.
- Kelson, 1952. The Subspecies of the Mexican Red-bellied Squirrel, *S. aureogaster*. University of Kansas Publications Museum of Natural History 5, 243 – 250.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Lorge E., Norppa H., Surralle J., Von der Hude H., y Wakata A., 2000. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 167 – 172.
- Kissling G. E., Dertinger S. D., Hayashi M., MacGregor J. T., 2007. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability. *Mutation Research* 364, 235 – 240.
- Koprowski J. L., Corse M. C., 2005. Time budgets, activity periods, and behavior of Mexican fox Squirrels. *Journal of Mammalogy* 86, 947 – 952.
- Kunzli N., Jerrett M., García-Esteban R., Basagana X., Beckermann B., Gilliland F., Medina M., Peters J., Hodis H. N., Mack W. J., 2010. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. *Plos One* 5, 1 – 10.
- Kurmar A., Kesari V. P., Khan P. K., 2013. Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals* 26, 337 – 346.
- Lima R. H., 2005. Estudio histológico de las gónadas de *S. aureogaster* del Bosque de Chapultepec durante un ciclo anual (Tesis Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas). Instituto Politécnico Nacional, México DF.
- Lira-Torres I., Briones-Salas M., 2012. Abundancia relativa y patrones de actividad de los mamíferos de los Chimalapas, Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana* 28, 566 – 585.
- Madronich S., 2006. Chemical evolution of gaseous air pollutants down-wind of tropical megacities: Mexico City case study. *Atmospheric Environment* 40, 6012 – 6018.
- Mandujano S., 1997. Densidad poblacional de la ardilla gris del pacífico (*S. colliae*) en un bosque tropical caducifolio de Jalisco. *Revista Mexicana de Mastozoología* 2, 90 –

96.

- Martínez P., 2013. Influencia de actividades antropogénicas y características del paisaje en la seroprevalencia de *orthopoxvirus* en poblaciones de ardilla gris (*S. aureogaster*) del Distrito Federal (Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF.
- Mayle B., Ferryman M., Pepper H., 2007. Controlling grey squirrel damage to woodlands. Forestry Commission, Edinburgh, England, s/n, 1 – 16.
- Mayor of London, 2002. 50 years on the struggle for air quality in London since the great smog of December 1952. Greater London Authority, ISBN 1 85261 428 5, 1–40.
- Mckinley G., Mortenho H., Ávalos M., González I., Iniestra R., Laguna I., Martínez M., Osnaya P., Reynales L., Valdés R. Martínez J., 2005. Quantification of local and global benefits from air pollution control in Mexico City. Environmental Science Technology 39, 1954 – 1961.
- Meier J. R., Wernsing P., Torsella J., 1999. Feasibility of micronucleus methods for monitoring genetic damage in two feral species of small mammals. Environmental and Molecular Mutagenesis 33, 219 – 225.
- Meza L. M., Quintero M., Garcia R., Ramírez J., 2009. Estimación de factores de emisión de PM₁₀ y PM_{2.5}, en vías urbanas en Mexicali, Baja California, México. Información Tecnológica 21, 45 – 56.
- MHNM Museo de Historia Natural de México (2013). Página electrónica disponible en: www.sma.df.gob.mx/mhn
- Mitkovska V., Chassovnikarova T., Atanassov N., Dimitrov H., 2012. Environmental genotoxicity evaluation using a micronucleus test and frequency of chromosome aberrations in free-living small rodents. Journal of Bioscience Biotechnology 1, 67 – 71.
- Molina M., Molina L. T., 2004. Megacities and atmospheric pollution. Journal of Air and Waste Manage Association 54, 644 – 680.
- Monroy-Vilchis O., Zarco-González M.M., Rodríguez-Soto C., Soria-Díaz L., Urios .V.,

2011. Foto trapeo de mamíferos en la Sierra Nanchititla, México: abundancia relativa y patrón de actividad. *Revista de Biología Tropical* 59, 373 – 383.
- Mora–Ascencio P., Mendoza–Durán A., Chávez C., 2010. Densidad poblacional y daños ocasionados por la ardilla *S. aureogaster*: implicaciones para la conservación de los Viveros de Coyoacán, México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 14, 7 – 22.
- O’Neill M. S., Hajat S., Zanobetti A., Ramírez–Aguilar M., Schwartz J., 2005. Impact of control for air pollution and respiratory epidemics on the estimated associations of temperature and daily mortality. *International Journal of Biometeorology* 50, 121 – 129.
- Osornio–Vargas A. R., 2009. Estudio sobre la variabilidad estacional de la composición y toxicidad de partículas finas en el Valle de México. Instituto Nacional de Ecología e Instituto Nacional de Cancerología, México DF., s/n, 1 – 14.
- Osornio–Vargas A. R., Bonner J., Alfaro–Moreno E., Martínez L., García–Cuellar C., Ponce–de–León Rosales S., Miranda J., Rosas I., 2003. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter *in vitro* are dependent on particle size and composition. *Environmental Health Perspectives* 111, 1289 – 1296.
- Pacheco A. E., 2011. Depredación de conos de *Pinus patula schl. et cham*, por la ardilla gris (*S. aureogaster*) en el área forestal de Santiago Comaltepec, Oaxaca, México (Tesis Licenciatura. Facultad de Ingeniería Forestal). Universidad de la Sierra Juárez Oaxaca, Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México.
- Palhares D., y Koppe G. C., 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology* 25, 281 – 284.
- Pernas A. J., Clark D. W., 2011. A summary of the current progress toward eradication of the Mexican gray squirrel (*S. aureogaster* F. Cuvier, 1829) from Biscayne National Park, Florida, USA. *US Fish and Wildlife Service* 222 – 224.
- Porto I. R. J., Araujo C. S. O., Feldberg E., 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental*

Research 97, 287 – 292.

- Ramos–Lara N., Cervantes F., 2007. Nest–site selection by the mexican red–bellied squirrel (*S. aureogaster*) in Michoacán, México. *Journal of Mammalogy* 88, 495 – 501.
- Ramos–Lara N., Cervantes F., 2011. Ecology of the Mexican red–bellied squirrel (*S. aureogaster*) in Michoacán, México. *The Southwestern Naturalist* 56, 400 – 403.
- Rattner B. A., 2009. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18, 773 – 783.
- Rodríguez G. S., Pimentel T. H., Weinstein L. H., 1997. Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 325 – 359.
- Romanelli F. A., Knakievicz T., Bittencourt P. M. A., Pens G. D., Dal–Pizzol F., Rodríguez F. C. E., De Almeida de S. A. A., Bunselmeyer F. H., Fonseca M. J. C., 2006. Ultra high frequency–electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring. *Life Sciences* doi:10.1016/j.lfs.2006.08.018., 1 – 8.
- Romero–Balderas K. G., Naranjo E. J., Morales H. H., Nigh R. B., 2006. Daños ocasionados por vertebrados silvestres al cultivo de maíz en la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Interciencia* 31, 276 – 283.
- Romieu I., Castro–Giner F., Kunzil N., Sunyer J., 2008. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *European Respiratory Journal* 31, 179 – 196.
- Rosales–Castillo J. A., Torres–Meza V. M., Olaiz–Fernández G., Borja–Aburto V. H., 2001. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública México* 43, 544 – 555.
- Rosas I., McCartney H. A., Payne R. W., Calderón C., Lacey J., Chapela R., Ruíz–Velazco S., 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, 394 – 401.
- Roubiceka D. A., Guitiérrez–Castillo E., Sordoia M., Cebrián–García M. E., Ostrosky–Wegman P., 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico

- City. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 631, 9 – 15.
- Rushton S.P., 2000. Modeling the spatial dynamics of parapoxvirus disease in red and grey squirrels: a possible cause of the decline in the red squirrel in the United Kingdom?. Journal of Applied Ecology 37, 1 – 18.
- Salazar A. M., Mendlovic F., Cruz–Rivera M., Chávez–Talavera O., Sordo M., Avila G., Flisser A., Ostrosky–Wegman P. 2013. Genotoxicity induced by *Taenia solium* and its reduction immunization with Calreticulin in a hamster model of Taeniosis. Environmental and Molecular Mutagenesis 54, 347 – 353.
- Saldarriaga–Molina J. C., Echeverri–Londono C. A., Molina–Pérez F. J., 2004. Partículas suspendidas (PST) y partículas respirables (PM₁₀) en el Valle de Aburrá, Colombia. Revista Facultad de Medicina 32, 7 – 16.
- Sánchez–Cordero V., Martínez–Meyer E., 2000. Museum specimen data predict crop damage by tropical rodents. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 7074 – 7077.
- Santiago L. R., 2003. Distribución y hábitat de la ardilla *S. aureogaster* en el bosque de Chapultepec (Tesis Licenciatura en Biología). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México DF.
- Schlegel R., MacGregor J. T., Everson R. B., 1986. Assesment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. Cancer Research 46, 3717 – 3721.
- Schulte–Hostedde A. I., Millar J. S., Hickling G. J., 2001. Evaluating body condition in small mammals. Canadian Journal of Zoology 79, 1021 – 1029.
- Selvi M., Cavas T., Karasu B. A. C., Kocan M. B., Cinkilic N., Sepici D. A., Vatan O., Yilmaz D., Sarikaya R., Zorlu T., y Erkoc F., 2011. Sublethal toxicity of esbiothrin relationship with total antioxidant status and *in vivo* genotoxicity assessment in fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) using the micronucleus test and comet assay. Environmental Toxicology 10, 644 – 651.
- Shirley T. R., Brune W. H., Ren X., Mao J., Leshner R., Cárdenas B., Volkamer R., Molina L. T., Molina M. J., Lamb B., Velasco E., Jobson T., y Alexander M., 2006.

- Atmospheric oxidation in the Mexico City Metropolitan Area (MCMA) during April 2003. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 2753 – 2765.
- SIMAT Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (2013). Página electrónica disponible en <http://www.calidadaire.df.gob.mx/calidadaire/index.php>
- Sisenando H. A., Batistuzoo S. R., Saldiva P. H. N., Artaxo P., Hacon S. S., 2011. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian legal Amazon by *Tradescantia micronucleus* bioassay: a toxicity assessment study. *Environment Health* 41, 1 – 9.
- Slama R., Morgenstern V., Cyrus J., Zutavern A., Herbarth O., Wichmann H. E., Heinrich J., y el LISA Study Group, 2007. Traffic-related atmospheric pollutants levels during pregnancy and offspring's term birth weight: a study relying on a land-use regression exposure model. *Environmental Health Perspectives* 115, 1283 – 1292.
- Smith D. F., MacGregor J.T., Hiatt R. A., Hooper N. K., Wehr C. M., Peters B. Goldman L. R. Yuan L. A., Smith P. A., Becker C. E., 1990. Micronucleated erythrocytes as an index of cytogenetic damage in humans: demographic and dietary factors associated with micronucleated erythrocytes in splenectomized subjects. *Cancer Research* 50, 5049 – 5054.
- Soares S.R.C., Bueno-Guimara H.M., Ferreira C.M., Rivero D.H.R.F., De Castro I., García M.L.B., Saldiva P.H.N., 2003. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice *in vivo*. *Environmental Research* 92, 191 – 196.
- Steele M., Turner G., Smallwood P., Wolff J., 2001. Cache management by small mammals: experimental evidence for the significance of acorn-embryo excision. *Journal of Mammalogy* 82, 35 – 42.
- Stephens S., Madronich S., Wu F., Olson J. B., Ramos R., Retama A., Muñoz R., 2008. Weekly patterns of Mexico City's surface concentrations of CO, NO_x, PM₁₀ and O₃ during 1986–2007. *Atmospheric Chemistry and Physics* 8, 5313 – 5325.
- Thorington R. W. Jr., Hoffmann R. S., 2005. Family *Sciuridae*. In: Wilson, Don E. and Reeder, D. M., *Mammal Species of the World, A taxonomic and geographic reference*. Third edition. Johns Hopkins University Press, 754 – 818.

- Tijerino R., 2014. Renueva Ciencias de la Atmósfera su laboratorio móvil. En: Órgano Informativo de la Universidad Nacional Autónoma de México. Periódico Gaceta UNAM., Ciudad Universitaria, México DF., 4 – 5.
- Tometsko A. M., Torus D. K., Dertinger S. D., 1993. Analysis of micronucleated cells by flow cytometry 3. Advanced technology for detecting clastogenic activity. *Mutation Research* 292, 145 – 153.
- Tompkins D. M., 2003. Ecological replacement of native red squirrels by invasive greys driven by disease. *Ecology Letters* 6, 189 – 196.
- Tonkin M., Mackenzie I., 2009. The evaluation of grey squirrel control in the saving Scotland's red squirrels partnership project. Scottish Wildlife Trust and Forestry Commission, Edinburgh, England, s/n, 1 – 51.
- Torres–Dosal A., Pérez–Maldonado I. N., Jasso–Pineda Y., Martínez–Salinas R. I., Alegría–Torres J. A., Díaz–Barriga F., 2008. Indoor air pollution in a mexican indigenous community: evaluation of risk reduction program using biomarkers of exposure and effect. *Science Total Environment*, 390, 362 – 368.
- UACH, Universidad Autónoma Chapingo, 2006. Normas para la presentación de originales., Sección de Edición. Departamento de Publicaciones, Texcoco, Estado de México, México, s/n, 1 – 15.
- Valdés A. M., 2003. Las ardillas de México. Unidos para la conservación A. C. y Agrupación Sierra Madre S. C. 51, 1 – 5.
- Valle–Hernández B.L., Mugica–Álvarez V., Salinas–Talavera E., Amador–Muñoz O., Murillo–Tovar M. A., Villalobos–Pietrini R., Vizcaya–Ruíz A., 2010. Temporal variation of nitro–polycyclic aromatic hydrocarbons in PM₁₀ and PM_{2.5} collected in northern Mexico City. *Science Total Environment* 408, 5429 – 5438.
- Villalobos–Pietrini R., Amador–Muñoz O., Valle–Hernández B. L., Gómez–Arroyo S., Waliszewski S., Jazcilevich A. D., 2011. Organic compounds in airborne particles and their genotoxic effects in Mexico City. *Air Quality Monitoring, Assessment and Management* s/n, 345 – 379.
- WCMC World Center for Monitoring and Control, 2010. Review of the grey squirrel S.

- carolinensis*. Directorate General E–Environment, Cambridge, England, s/n, 1–21.
- Wirsing A., Steury T. D. y Murray D. L. 2002. Relationship between body condition and vulnerability to predation in red squirrels and snowshoe hares. *Journal of Mammalogy* 83, 707 – 715.
- Witt K. L., Livanos E., Kissling G. E., Torous D. K., Caspary W., Tice R. R., Recio L., 2008. Comparison of flow cytometry–and microscopy–based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutation Research* 649, 101 – 113.
- Xianfeng Y., Yueqin Y., Curtis R., Bartlow A., Agosta S. J., Steele M. A., 2012. Alternative strategies of seed predator escape by early–germinating oaks in Asia and North America. *Ecology and Evolution*, s/n, 497 – 492.
- Zabalza J., Santamaría J. M., Alastuey A., Querol X., 2002. Diagnóstico de contribución de fuentes en PM₁₀ en la zona urbana de Altsasu / Alsasua: niveles y composición de PM₁₀. Departamento de Química y Edafología, Universidad de Navarra. España. sn, 1 – 28.
- Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A., 2005. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28, 227 – 236.
- Zhong B. Z., Gu Z. W., Stewart J., Ong T., 1995. Micronucleus formation induced by three polycyclic aromatic hydrocarbons in rat bone marrow and spleen erythrocytes following intratracheal instillation. *Mutation Research* 326, 147.
- Zúñiga–González G., Torres–Bugarín O., Luna–Aguirre E., González–Rodríguez E., Zamora–Perez A., Gómez–Meda B. C., Ventura–Aguilar A. J., Ramos–Ibarra M. L., Ramos–Mora A., Ortíz G. G., Gallegos–Arreola M. P. 2000. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research* 467, 99 – 103.
- Zúñiga–González G., Torres–Bugarín O., Ramos–Ibarra M. L., Zamora–Perez A., Gómez–Meda B. C., Ventura–Aguilar A. J., Ramos–Mora A., Ortíz G. G., Álvarez–Moya C., González–Rodríguez A., Luna–Aguirre J., Gallegos–Arreola M. P., 2001a. Variation

of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of Colchicine. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37, 173 – 177.

Zúñiga–González G., Torres–Bugarín O., Zamora–Perez A., Gómez–Meda B. C., Ramos–Ibarra M. L., Martínez–González S., González–Rodríguez A., Luna–Aguirre J., Ramos–Mora A., Ontiveros–Lira D., Gallegos–Arreola M. P., 2001b. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research* 494, 161 – 167.

Anexo 2. Taxonomía y subespecies de *S. aureogaster*.

Taxonomía		Subespecies
Reino	Animalia	<i>S. aureogaster aureogaster</i>
Phyllum	Chordata	<i>S. aureogaster chiapensis</i>
Clase	Mamalia	<i>S. aureogaster effugius</i>
Orden	Rodentia	<i>S. aureogaster hirtus</i>
Suborden	Sciurognathi	<i>S. aureogaster hypopyrrhus</i>
Familia	Sciuridae	<i>S. aureogaster nemoralis</i>
Subfamilia	Sciurinae	<i>S. aureogaster nigrescens</i>
Género	<i>Sciurus</i>	<i>S. aureogaster poliopus</i>
Especie	<i>aureogaster</i>	<i>S. aureogaster socialis</i>

(IUCN,2013; ITIS,2013)

(NCBI, 2013)

Anexo 3. Traducciones de la palabra “ardilla” en diferentes idiomas.

Por Idioma		Lenguas autóctonas	
Alemán	Grauhörnchen	Amuzgo	Tyotzó
Checo	Veverka popelavá	Ch'ol	Chuch
Danés	Grå egern	Chuj	Nok'
Español	Ardilla gris	Huasteco	Ot'el
Estonio	Hallorav	Huave	Ngwiün
Finlandés	Harmaaorava	K'iche'	Kuk
Francés	Écureuil gris	Kickapoo	Anikwa
Holandés	Grijze eekhoorn	Kiliwa	Jmáal
Húngaro	Szürke mókus	Lacandón	Kuuk
Inglés	Cat squirrel	Mam	Ku'K
Inglés	Eastern gray squirrel	Maya	Ku'uk
Inglés	Grey Squirrel	Mazahua	Mijñi
Inglés	Migratroy squirrel	Mixteco	Kuéñu
Islandés	Gráikorni	Náhuatl	Techálotl
Italiano	Scoiattolo grigio	Otomí	Minza
Noruego	Gråekorn	Pame	Gaming
Polaco	Wiewiórka szara	Tarahumara	Chipawí
Portugués	Esquilo-cinzento	Tarasco	Kuaraki
Sueco	Grå ekorre	Tepehua	Tiikolh
	(ONU, 2010)	Triqui	Xaá
		Tzotzil	Chuch
		Yaqui	Teku
		Zapoteco	Chisa
		Zoque	Choquilla

(obs. Prop.)

Anexo 4. Distribución de *S. aureogaster* en México
(IUCN, 2013; Ceballos y Arroyo–Cabrales, 2012).



**Anexo 5. Registros de la ardilla gris (*S. aureogaster*) en México entre los años
1952 – 2013.**

Estado	Municipio	Localidad (es)	Autor (es)
Aguascalientes			
Baja California			
Baja California Sur			
Campeche			
Chiapas			
	Mapastepec	Finca Prusia, y Finca La Esperanza	(IBIUNAM, 1944)
	No especificado	Selva Lacandona	(Romero-Balderas <i>et al.</i> , 2006)
	Ocosingo	Estación Chajul, Montes Azules	(IBIUNAM, 1986)
	Tonalá	Tonalá	(IBIUNAM, 1960)
	Tumbalá	Cacahuatal	(IBIUNAM, 2003)
		Guichovi	(Kelson, 1952)
Chihuahua			
	No especificado	No Especificado	(Valdés, 2003)
Coahuila			
Colima			
	Villa de Álvarez	Villa de Álvarez	(IBIUNAM, 1962)
Distrito Federal			
	Álvaro Obregón	Jardín la Bombilla, Parque Ecológico el Batán y Parque Tagle.	(Martínez, 2013)
	Benito Juárez	Parque Francisco Lira, Parque Luis G. Urbina y Parque San Lorenzo.	(Martínez, 2013)
	Coyoacán	Jardín Botánico UNAM, Jardín Hidalgo, Museo de las Intervenciones, Parque de la conchita, Parque Margarit, Parque Mashayoshi Ohira, Parque Xicotencatl, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y Viveros de Coyoacán	(Martínez, 2013; Mora-Ascencio <i>et al.</i> , 2010; Hortelano-Moncada <i>et al.</i> , 2009;
	Gustavo A. Madero	Bosque de Aragón	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Miguel Hidalgo	Bosque de Chapultepec, Glorieta América, Parque Lincoln y Parque 18 de Marzo	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013; Martínez, 2013; Lima, 2005; Santiago, 2003)
	Tlalpan	Parque Nal. Cumbres del Ajusco Bosque de Tlalpan.	(Aranda <i>et al.</i> , 2002) (Martínez, 2013)
Durango			
	No Especificado	No Especificado	(Valdés, 2003)
Estado de México			
	Papalotla	Parque Central de Papalotla	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Texcoco	Parque Central de Texcoco	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Toluca	Sierra de Nanchititla	(Monroy-Vilchis <i>et al.</i> , 2011)

Estado	Municipio	Localidad (es)	Autor (es)
Guanajuato			
Guerrero			
	Acapulco	Acapulco	(IBIUNAM, 1972)
	Chilpancingo	El ocotito	(IBIUNAM, 1954)
		Llanos de Tepoztepec	(IBIUNAM, 1936)
	Iguala	Iguala	(IBIUNAM, 1948)
	Tecpan de Galeana	Tecpan de Galeana	(IBIUNAM, 1971)
	Zihuatanejo de Azueta	Ixtapa y La Salitrera	(IBIUNAM, 2003)
Hidalgo			
	Zimapán	Sierra Encarnación	(Kelson, 1952)
Jalisco			
	La Huerta	Estación de investigación biológica Chamela, UNAM.	(Mandujano, 1997)
	Zapopan	Zoológico de Guadalajara	(Zúñiga-González <i>et al.</i> , 2000)
Michoacán			
	Pátzcuaro	Pátzcuaro	(Ramos-Lara y Cervantes, 2011; Ramos-Lara y Cervantes, 2007; IBIUNAM, 2002)
Morelos			
	Hutzilac	Parque Nal. Lagunas de Zempoala	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013; IBIUNAM, 1953)
	Tlalnepantla	Tlalnepantla	(Falcón-Ordáz y Lamothe-Argumedo, 2006)
Nayarit			
Nuevo León			
Oaxaca			
	Asunción Nochixtlán	El Marqués	(IBIUNAM, 1972)
	Huajuapán de León	Universidad Tec. de la Mixteca	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Matías Romero	Mazahuito	(IBIUNAM, 1965)
	Tehuantepec	Cuevas del convento	(IBIUNAM, 1965)
	Salina Cruz	Rancho Aguacaliente, Salina Cruz	(IBIUNAM, 1981)
	Santa Ma. Chimalapa	La Fortaleza	(Lira - Torres y Briones - Salas, 2012)
	Santiago Comaltepec	Santiago Comaltepec	(Aparicio, 2011)
	Sola de Vega	San Miguel Suchixtepec	(IBIUNAM, 2003)
Oaxaca			
	San Pedro Tapanatepec	San Pedro Tapanatepec	(IBIUNAM, 1956)
	Santo Domingo Zanatepec	Rancho sol y Luna	(IBIUNAM, 1961)
		Montañas de Sto. Domingo	(Kelson, 1952)
	Tututepec	Lagunas de Chacahua	(IBIUNAM, 2003)
Puebla			
	Cuetzalan	Ejidos de Tosepan Titataniske	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Francisco Z. Mena	Metaltloyuca	(Kelson, 1952)
	San Felipe Teotlalcingo	San Felipe Teotlalcingo	(IBIUNAM, 1976)
	San Martín Texmelucan	San Juan Tetla	(IBIUNAM, 1974)
	Tlahuapán	Tlahuapán	(IBIUNAM, 1973)

Continuación

Estado	Municipio	Localidad (es)	Autor (es)
Querétaro			
	Pinal de Amoles	Pinal de Amoles	(Kelson, 1952)
Quintana Roo			
San Luis Potosí			
	Axtla de Terrazas	Axtla de Terrazas	(Kelson, 1952)
	Ciudad del Maíz	Rancho el Estribo	(IBIUNAM, 2005)
	Ciudad Valles	Ciudad Valles	(Kelson, 1952)
Sinaloa			
Sonora			
	No Especificado	No Especificado	(Valdés, 2003)
Tabasco			
	Emiliano Zapata	Montecristo	(Kelson, 1952)
	Huimanguillo	La Venta	(Kelson, 1952)
	Ixtacomitán	Ixtacomitán	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Paraíso	Paraíso	(De la cruz, 2003)
	Teapa	Teapa	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013; Kelson, 1952)
Tamaulipas			
	Altamira	Altamira	(Kelson, 1952)
	Llera	Capitán Emilio Carranza (Forlón)	
	Victoria	Ciudad Victoria	
Tlaxcala			
Veracruz			
	Atoyac	Potrero Nuevo	(Kelson, 1952)
	Catemaco	Agua de Obispo	(IBIUNAM, 2004)
	Coatzacoalcos	Coatzacoalcos	(Kelson, 1952)
	Emiliano Zapata	Plan del Río	(Kelson, 1952)
	Hidalgotitlán	San Carlos	(Kelson, 1952)
	Huatusco	Huatusco	(Hernández-B. <i>obs. per.</i> 2013)
	Jalapa	Jalapa	(Kelson, 1952)
	No Especificado	No Especificado	(Sánchez-Cordero y Martínez-Meyer, 2000)
	Orizaba	Orizaba	(Kelson, 1952)
	Otatitlán	Otatitlán	(Kelson, 1952)
	San Andrés Tuxtla	San Andrés Tuxtla	(Kelson, 1952)
	Tlalixcoyan	Piedras Negras	(Kelson, 1952)
	Xico	San Marcos, Xico	(Kelson, 1952)
Yucatán			
Zacatecas			

Anexo 6. Poblaciones de ardilla gris (*S. aureogaster*) en el Valle de México.

Entidad	Delegación	Zona	Parque	Clave	Área*	Latitud N	Longitud O
DISTRITO	GUSTAVO A. MADERO	NE	BOSQUE DE ARAGÓN	bar	154.3	19°27'32.28"	99° 4'24.44"
DISTRITO	MIGUEL HIDALGO	NO	BOSQUE DE CHAPULTEPEC 1A SECCION	bch	146.3	19°25'21.40"	99°11'6.93"
DISTRITO	MIGUEL HIDALGO	SO	BOSQUE DE TLÁHUAC	btl	114.7	19°16'55.30"	99° 2'50.43"
DISTRITO	TLÁHUAC	SE	JARDÍN BOTÁNICO UNAM	jbu	63.4	19°18'51.78"	99°11'35.84"
DISTRITO	MILPA ALTA	SE	JARDÍN PAPALOTLA	jpa	0.6	19°33'47.34"	98°51'28.32"
DISTRITO	COYOACÁN	SO	JARDÍN TEXCOCO	jtx	0.6	19°30'52.45"	98°52'57.87"
EDO. MEX.	PAPALOTLA	NE	PARQUE 18 DE MARZO	pdm	0.6	19°28'17.60"	99° 11'42.9"
DISTRITO	BENITO JUÁREZ	SO	PARQUE FRANCISCO VILLA (DE LOS VENADOS)	pfv	0.6	19°22'18.98"	99° 9'19.98"
DISTRITO	ALVARO OBREGÓN	SO	PARQUE LUIS G. URBINA (HUNDIDO)	phu	0.6	19°22'42.12"	99°10'44.07"
DISTRITO	TLALPAN	SO	PARQUE LA BOMBILLA	plb	4.1	19°20'50.60"	99° 11'12.8"
DISTRITO	BENITO JUÁREZ	SO	VIVEROS DE COYOACÁN	vco	41.8	19°21'15.47"	99°10'17.44"

* Hectáreas

Anexo 7. Técnica estandarizada de conteo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ardilla gris (*S. aureogaster*) por citometría de flujo.

El método de conteo de micronúcleos mediante citometría de flujo lleva cuatro prácticas previas a su implementación.

- a)** Preparación de solución amortiguadora a pH 7.5 (BBS)
- b)** Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
- c)** Preparación de solución de RNAsa a [1 mg/ ml]
- d)** Fijación de sangre en alcohol a -70°C
- e)** Conteo de micronúcleos por citometría de flujo

Por tal motivo, se describirán estas prácticas previas a la citometría de flujo. Es de resaltar que dichas prácticas están planteadas para trabajar con micronúcleos de sangre periférica de ardilla gris (*S. aureogaster*), por lo tanto, si se desea contabilizar micronúcleos en cualquier otra especie, es esencial investigar qué tipo de anticuerpo es el más indicado para trabajar.

a) Preparación de solución amortiguadora a pH 7.5 (BBS)

Materiales:	Cloruro de sodio (NaCl)
Agitador con imán	Filtro Millex®
Agua bidestilada	Frasco de 100 ml
Balanza analítica	Jeringa de 10 ml
Bata y guantes	Hoja de aluminio
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Potenciómetro electrónico
Calculadora	Probeta graduada de 100 ml
Vaso de precipitado de 120 ml	

Planteamiento: se requieren 100 ml de solución BBS con 0.9% de NaCl y 5.3 mM de NaHCO₃ (PM: 84.01 gr) a 7.5 de pH. Entonces calculará:

Si se requiere un volumen final de 100 ml a una concentración de 0.9% de NaCl, entonces 100 ml es igual a 100%. ¿Cuántos gramos de NaCl se necesitan para obtener una solución al 0.9%?

	Volumen	Concentración	Resultado
Solución	100 ml =	100 %	
NaCl	x gr =	0.9 %	X = 0.9 gr

Por otra parte, se requieren 100 ml de solución de NaHCO₃ a una concentración de 5.3 milimolar (mM) y se sabe que dicha molécula tiene un peso molecular (PM) de 84.01. Con este último dato sabemos que si se diluyeran 84.01 gr de NaHCO₃ en un litro de agua destilada, tendríamos 1000 ml de solución de NaHCO₃ a una

concentración de 1000 mM. Entonces, se pesarán 0.9 gr de NaCl y 44.52 mg de NaHCO₃ en la balanza granataria que serán diluidos en 100 ml de agua destilada para obtener la solución BBS. A continuación se explica el procedimiento.

Coloque 50 ml de agua bidestilada en el vaso de precipitado y disuelva el NaHCO₃ y NaCl con un agitador de imán a temperatura ambiente. Después, mida el pH de la solución y estabilice a 7.5 agregando solución de hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) del potenciómetro, según sea el caso. Afore la solución estabilizada a 100 ml en la probeta graduada y hágala pasar por un filtro Millex® para jeringa. Almacene la solución filtrada en un frasco totalmente limpio y estéril e identifique el mismo con una etiqueta. Por último, envuelva el frasco con aluminio y almacene en refrigeración a 4°C.

b) Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Materiales:

Balanza analítica

Hoja de aluminio

Matraz Erlenmeyer de 2.5 litros

Agua destilada

Polvo PBS Dulbecco sin Ca^{+2} – mg^{+2}
(Microlab, México).

Bata y guantes

Planteamiento: se requiere elaborar 2 litros de solución PBS para usar el citómetro de flujo.

Se pesa 19.1 gr de polvo PBS en la balanza analítica con una hoja aluminio previamente tarado. Coloque el polvo en un matraz Erlenmeyer y diluya en 2 litros de agua destilada. Vierta la dilución en el recipiente interno del citómetro. Nota: Vacíe siempre el recipiente de desecho del citómetro antes utilizarlo.

c) Preparación de RNAsa a [1 mg/ ml]

Materiales:	Hoja de aluminio
Agitador de imán	Polvo de RNAsa
Balanza analítica	Puntas para 200 μ l
Bata y guantes	Solución PBS
Calculadora	Tubos Eppendorf de 600 μ l
Marcador indeleble	Vaso de precipitado de 5 ml
Micropipeta de 200 μ l	

Planteamiento: se requiere elaborar alícuotas de RNAsa con una concentración de [1 mg/ ml] para citometría de flujo.

En la balanza analítica coloque una hoja de aluminio y tare. Coloque un volumen aprox. de 2 mg de RNAsa en polvo sobre el aluminio. Nota: No regrese nada del polvo de RNAsa al frasco. Si por ejemplo usted toma 1.8 mg de RNAsa, entonces utilizará 1.8 ml de solución PBS para diluir a una concentración de [1 mg/ ml]. Diluya la RNAsa en un vaso de precipitado con ayuda del agitador de imán a temperatura ambiente. Haga alícuotas de 200 μ l en tubos Eppendorf de 600 μ l de capacidad. Identifique las alícuotas con el marcador indeleble y guárdelas en el ultracongelador a -70°C hasta que las vaya a usar.

d) Fijación de sangre en alcohol a -70°C

Materiales:	Micropipeta de 100 μl
Agitador vortex	Micropipeta de 200 μl
Crioviales	Muestra de sangre
Metanol a -70°C	Pipeta de 5 ml
Diurex	Puntas de 100 μl
Gradilla para tubos	Puntas de 200 μl
Marcador indeleble	Solución BBS
Metanol absoluto	Tubos para citometría

Planteamiento: fijar las muestras de sangre periférica de ardilla gris (*S. aureogaster*) en metanol absoluto para conteo de micronúcleos por citometría de flujo. Nota: Para una mejor comprensión de éste procedimiento, se explicará la fijación celular para una muestra de sangre únicamente.

En un tubo de citometría de flujo, coloque 200 μl de solución BBS con una micro pipeta, a continuación vierta 100 μl de sangre de ardilla y diluya mediante pipeteo. Tome dos crioviales y vierta a cada uno, 2 ml de metanol absoluto a -70°C y 100 μl de sangre diluida con BBS y agítelos en vortex por 10 segundos. Identifique los crioviales con número y letra consecutivos (1A y 1B) y coloque un diurex sobre la marca para evitar que el metanol borre su identificación. Guarde inmediatamente los crioviales en ultra congelación a -70°C mínimo de 24 horas antes de realizar la citometría de flujo. Nota. De cada muestra de sangre se guarda un duplicado por si llegan a existir errores o dudas durante la citometría.

e) Conteo de micronúcleos por citometría de flujo.

Materiales:	Pipeta de 10 ml
Sangre en metanol	Puntas de 20 μ l
Solución BBS	Puntas de 100 μ l
Agitador vortex	Tubos de citometría
Centrífuga	RNAasa a [1 mg/ ml]
Gradilla	Anticuerpo CD71 anti-rata
Micropipeta de 20 μ l	Con el fluorocromo
Micropipeta de 100 μ l	Yoduro de Propidio
Pipeta de 1 ml	

Planteamiento: se realizará el conteo de micronúcleos de las muestras de sangre de ardilla gris (*S. aureogaster*) previamente preparadas en metanol y con un mínimo de 24 horas de almacenaje a -70°C . Nota 1: La elección del anticuerpo usado para identificar a los reticulocitos, se basó en una estandarización previa. Nota 2: por motivos de precisión, se hará la explicación del procedimiento para analizar una muestra con su duplicado, es decir únicamente dos tubos.

En un tubo de citometría de flujo coloque 1 ml de muestra de sangre diluida en metanol y 7 ml de solución BBS y agítelo en vortex durante 10 segundos. A continuación, centrifugue a 600 g x 5 min a 4°C (equivalente a 1898 rpm x 5 min). Retire el sobrenadante del tubo por decantación y resuspenda la pastilla de células en el líquido sobrante con ayuda de la micro pipeta. Tome dos tubos (tubo A y B) de citometría de flujo y coloque a cada uno 20 μ l de muestra resuspendida y 80 μ l de RNAasa a [1 mg/ ml]. En el tubo A no se colocará nada, mientras que en el tubo B verterá 5 μ l de anticuerpo CD71 anti rata.

Proceda a realizar la citometría de flujo primero con el tubo A (sin anticuerpo) para

obtener la fluorescencia *per se* de la muestra sanguínea. Después analice el tubo B, que tiene el anticuerpo DC71 para detectar los micronúcleos. Nota: cuide que los tubos se encuentren a resguardo de la luz mientras esperan el procedimiento de la citometría de flujo.

Las muestras en esta investigación, fueron analizadas con un citómetro de flujo modelo FACSCalibur, marca Becton Dickinson, equipado con un láser de argón a 488 nanómetros de excitación. Se evaluó la incidencia de micronúcleos en un conteo de 500 000 eventos celulares en sangre periférica por muestra. Nota: Evento celular no es lo mismo que reticulocitos, por lo que, una vez hecha la citometría de flujo es necesario analizar los resultados para diferenciar eritrocitos maduros de reticulocitos y analizar los reticulocitos con y sin micronúcleos. Por último, en este trabajo se empleó el programa de Cell Quest para la adquisición y análisis de las muestras después de la citometría.