



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**BIOMONITOREO *IN SITU* DE LA GENOTOXICIDAD
Y LA EXPRESIÓN DE micro-RNAs INDUCIDOS POR
LOS CONTAMINANTES DEL AIRE EN UN
AMBIENTE RURAL Y URBANO USANDO DOS
ESPECIES VEGETALES SILVESTRES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAOLA LOZA GÓMEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Loza
Gómez
Paola
52869662
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307218216
2. Datos del tutor
Dra
Josefina
Cortés
Eslava
3. Datos del sinodal 1
Dr
Luis Felipe
Jiménez
García
4. Datos del sinodal 2
Dra
Sandra Luz
Gómez
Arroyo
5. Datos del sinodal 3
Dr
Pedro Rafael
Valencia
Quintana
6. Datos del sinodal 4
Dra
María Elena
Calderón
Segura
7. Datos del trabajo escrito
Biomonitoreo *in situ* de la genotoxicidad y la expresión de micro-RNAs inducidos por los contaminantes del aire en un ambiente rural y uno urbano usando dos especies vegetales silvestres.
85 p.
2016

Dedicatoria

A mi papá,

No tengo las palabras necesarias para agradecerte todo lo que has hecho por mí durante todo este tiempo. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, siempre pendiente de todo, absolutamente todo lo que necesitaba. Por apoyarme en mis locuras, festejar mis logros y alentarme a superar los obstáculos que se fueron presentando. Poca gente puede presumir a un papá como tú.

No hubiera podido lograr nada de esto sin ti, eres lo máximo.

Te quiero muchísimo.

Agradecimientos

Sin duda alguna puedo decir que este es uno de los logros más importantes de mi vida y me gustaría mencionar a todas las personas que me permitieron realizar este sueño ya que sin ellos no hubiera sido posible.

Dra. Josefina Cortés Eslava

Gracias por apoyarme con este proyecto, invirtiendo su tiempo, paciencia y conocimientos en mí y dándome la confianza y recursos para realizar este trabajo de investigación.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por brindarme su apoyo desde que llegué al laboratorio y aceptarme con los brazos abiertos en su grupo de trabajo, permitiéndome aprender y conocer todas las técnicas que se trabajan y poder realizar mis actividades extracurriculares sin ninguna limitación.

Al Dr. Francisco Arenas Huertero, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Rafael Valencia Quintana, la M en C Ana Rosa Flores Márquez y Dra. María Elena Calderón Segura por invertir tiempo en sus revisiones y sugerencias permitiendo fortalecer y mejorar este estudio.

Agradezco a mi hermana **MÍA** y mi **MAMÁ** por apoyarme siempre y estar pendiente de mis locuras, dándome todo lo que estuviera en sus manos, buenos consejos y brindándome todo el cariño y tiempo que necesito para ser una mejor hermana, hija y ser humano. Nunca olviden que las quiero mucho y son muy importantes para mí.

Para **ADRIANA BERIBERI**, no tengo las palabras suficientes para agradecerte todo lo que me has enseñado y que hemos aprendido juntas, los días largos en el laboratorio realizando experimentos, las risas y momentos difíciles, las aventuras y locuras, pero lo mejor es que todo ha valido la pena. Te adoro.

A las ridículas **ZELTZ, JULY, YUN, GABY, DENISSE, XIME y MARU** que sin todas sus locuras, momentos de risa, consejos y apoyo no hubiera logrado terminar este proyecto tan importante en mi vida profesional. Nunca dejen de ser así y espero seguir contando siempre con su amistad.

A mi familia que cada uno a su manera ha estado al pendiente de mí y me han ayudado sin importar la situación y a Baghera y Rashka que no me han dejado sola en las noches de desvelo.

A **VICKY** que sin ella nada hubiera sido posible, eres una gran persona, amiga y ser humano, fue un gusto poder colaborar contigo en el laboratorio. Muchísimas gracias por todo!

A mis alumnos que me alientan a ser mejor cada día permitiéndome mostrarles mi pasión por el maravilloso mundo de la biología.

Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo otorgado al proyecto IN-225114, al Grupo del Dr. Michel Grutter de la Mora y al Parque Nacional Izta-Popo por el apoyo prestado para el trabajo.

Y por último me gustaría agradecerle a la máxima casa de estudios, la UNAM, por brindarme lo necesario para poder crecer como profesionista y alentarme a ser mejor cada día en lo que más me gusta.

INDICE

RESUMEN	- 8 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 10 -
2. ANTECEDENTES.....	- 12 -
2.1 La atmósfera y sus contaminantes	- 12 -
2.2 Daños a la salud por contaminantes atmosféricos	- 13 -
2.2.1 Monóxido de carbono (CO)	- 14 -
2.2.2 Bióxido de nitrógeno (NO ₂).....	- 15 -
2.2.3 Bióxido de azufre (SO ₂)	- 16 -
2.2.4 Ozono (O ₃)	- 17 -
2.2.5 Material particulado (PM _{2.5} y PM ₁₀)	- 17 -
2.2.6 Compuestos orgánicos volátiles (COV).....	- 19 -
2.2.7 Metales pesados	- 19 -
2.3 Efectos de los contaminantes atmosféricos en plantas y sus mecanismos de defensa.....	- 20 -
2.4 Especies vegetales como sistemas biológicos de prueba para biomonitoreo ambiental	- 23 -
2.4.1 <i>Taraxacum officinale</i> (G.H. Weber ex Wigg.)	- 25 -
2.4.2 <i>Robinsonecio gerberifolius</i> (T.M. Barkley y Janovec).....	- 26 -
2.5 Ensayos para evaluar contaminantes ambientales	- 27 -
2.5.1 Electroforesis unicelular alcalina.....	- 27 -
2.5.2 Expresión de micro-RNAs.....	- 29 -
2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	- 31 -
3. JUSTIFICACIÓN	- 34 -
4. OBJETIVO GENERAL.....	- 35 -
5. OBJETIVOS PARTICULARES	- 35 -
6. HIPÓTESIS	- 35 -
7. MATERIALES Y MÉTODOS	- 36 -
7.1 Germinación y crecimiento de diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>) ..	- 36 -
7.2 Recolección de planta nativa (<i>Robinsonecio gerberifolius</i>).....	- 36 -
7.3 Exposición de las plantas	- 36 -
7.4 Electroforesis unicelular o ensayo cometa.....	- 37 -
7.4.1 Aislamiento de núcleos.....	- 37 -

7.4.2	Electroforesis	- 38 -
7.4.3	Tinción	- 38 -
7.4.4	Registro de cometas.....	- 38 -
7.5	Análisis del miR398	- 39 -
7.5.1	Extracción de RNA	- 39 -
7.5.2	Cuantificación de RNA	- 39 -
7.5.3	Síntesis de cDNA.....	- 39 -
7.5.4	PCR de punto final	- 40 -
7.5.5	Electroforesis en geles de poliacrilamida	- 40 -
7.6	Análisis estadístico	- 41 -
8.	RESULTADOS.....	- 42 -
8.1	Ensayo cometa	- 42 -
8.2	Expresión de micro-RNAs.....	- 43 -
9.	DISCUSIÓN.....	- 44 -
10.	CONCLUSIONES.....	- 51 -
11.	REFERENCIAS.....	- 52 -
12.	FIGURAS Y TABLAS	- 72 -

Resumen

La contaminación atmosférica es un tema de vital importancia para los organismos que están expuestos cotidianamente a una mezcla compleja de gases que pueden afectar la salud de diversas formas. Se han descrito casos de enfermedades cardiovasculares, respiratorias e incluso cáncer en distintas poblaciones. Los organismos centinela son modelos biológicos que permiten evaluar entre otros, el daño genotóxico causado por distintas sustancias que contaminan el ambiente.

El presente trabajo evaluó la genotoxicidad de los contaminantes del aire en dos especies de plantas (*Taraxacum officinale* y *Robinsonia gerberifolia*) en dos sitios distintos dentro de la Zona Metropolitana del Valle de México; uno en el Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México (CCA-UNAM) y el otro en la estación meteorológica Altzomoni localizada dentro del Parque Nacional Izta-Popo, con tiempos diferentes de exposición (0, 2, 4 y 6 semanas) y en las temporadas de secas (marzo-mayo 2015) y lluvias (septiembre-noviembre 2015).

Las hojas de cada una de las plantas expuestas fueron empleadas para evaluar el daño genotóxico mediante la prueba de electroforesis unicelular o ensayo cometa adaptada para células vegetales logrando el aislamiento de los núcleos de forma mecánica. Las muestras se tiñeron con bromuro de etidio se observaron en el microscopio de fluorescencia y mediante el analizador de imágenes "Comet Assay IV", se determinó el momento de la cauda como indicador de daño genotóxico. Otra parte de las muestras se procesó para realizar la extracción del RNA por la técnica fenol-cloroformo y se corrió una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final para obtener la expresión del microRNA398 (miR398).

Los resultados obtenidos con la prueba del ensayo cometa mostraron un mayor daño en las plantas expuestas a la atmósfera CCA-UNAM, con relación al

observado en Altzomoni y en los testigos dentro de la cámara de crecimiento, siendo más sensible al cambio Robinsonecio gerberifolius. Se detectaron diferencias significativas mediante la prueba ANOVA de dos vías entre la temporada de secas y lluvias 2015, resultando más dañina la época de lluvias. Respecto a la expresión del miR398 se notó una mayor manifestación en la especie nativa *Robinsonecio gerberifolius* en comparación con *Taraxacum officinale* en ambas temporadas, indicando que es una buena especie biomonitora para contaminantes atmosféricos.

1. Introducción

Se ha considerado a la mezcla de contaminantes del aire como una de las principales causas del daño al DNA de los organismos vivos. Debido a la actividad antropogénica, anualmente se liberan al aire millones de toneladas de contaminantes. La mezcla compleja que contamina el aire incluye compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos y distintos agentes biológicos. Existen numerosos estudios que relacionan estos contaminantes con daños a la salud y daño al DNA (Ceretti *et al.*, 2015).

Entre los principales compuestos contaminantes registrados por la Red de Monitoreo Atmosférico (REMA) en la Ciudad de México, están los de fase gaseosa como ozono, monóxido de carbono, bióxido de nitrógeno, óxidos de azufre, etc. En ciudades europeas y de los Estados Unidos de América, se han realizado numerosos estudios sobre el riesgo que implica la exposición constante a los contaminantes atmosféricos, en contraste con la Ciudad de México este tipo de análisis y determinaciones recibe poca importancia, particularmente en organismos vegetales. Tomando en cuenta la orografía del valle de México, así como su amplia densidad poblacional y el alto tráfico vehicular, el estudio del riesgo de daño que puede implicar al material genético resulta relevante.

Dada la gran abundancia de plantas en la biosfera y su papel vital en la cadena trófica, es importante establecer protocolos de análisis de la calidad del aire usando bioensayos vegetales como indicadores de contaminación del mismo (Piraino *et al.*, 2006). Las plantas superiores presentan características que las favorecen como modelos para evaluar contaminantes ambientales, como es su sensibilidad para detectar mutágenos, requerir de tiempos menores de exposición y recursos más sencillos para evaluar el daño que los modelos animales, así como la posibilidad de revelar alteraciones genéticas múltiples en diferentes tejidos (Grant 1994; Pereira *et al.*, 2013).

Se eligieron las plantas *Taraxacum officinale* y *Robinsonecio gerberifolius*, ya que presentan características importantes para establecerse como biomonitores de la calidad del aire del área de estudio mediante la evaluación de genotoxicidad y la expresión de micro-RNAs asociados con la presencia de gases y contaminantes de depósito atmosférico.

Entre las pruebas para evaluar el efecto genotóxico, se ha descrito la electroforesis unicelular que detecta directamente el daño al DNA provocado por diversos agentes físicos y químicos. Es rápida, sensible y con gran reproducibilidad para evidenciar los rompimientos en la cadena del DNA en células individuales, en los sitios alcalinos lábiles o sensibles, en los entrecruzamientos proteína-DNA y eventos de reparación incompleta por escisión constituyendo un método adecuado para localizar contaminantes ambientales (Singh *et al.*, 1988; Anderson 1988).

Los micro-RNAs (miRNAs) son transcritos pequeños no codificantes que regulan la expresión génica. En plantas algunos miRNAs están involucrados en diferentes respuestas a estrés biótico y abiótico, entre éste último está el de distintos contaminantes ambientales (Kumar, 2014). La expresión del miR398 se ha relacionado con estrés abiótico en *Medicago trunculata* (Trindade *et al.*, 2010; Kantar *et al.*, 2011; Jovanovic *et al.*, 2014).

2. Antecedentes

2.1 La atmósfera y sus contaminantes

La atmósfera es una mezcla compleja de gases compuesta principalmente por nitrógeno (78%), oxígeno (21%) y otros en pequeñas cantidades (1%), la mayoría de éstos están en contacto constante con diversos contaminantes primarios (CO, SO_x, NO_x), así como con la radiación solar y son sometidos a cambios de temperatura lo que provoca la generación de nuevos grupos de contaminantes denominados secundarios (O₃, PM_{2.5}, PM₁₀) (Sriussadaporn *et al.*, 2003; Piraino *et al.*, 2006; Health Effects Institute, 2010; SEDEMA, 2012; DeMarini, 2013).

Desde 1990, la Ciudad de México es uno de los sitios más contaminados en América Latina. Su atmósfera ha sido modificada con diversos agentes químicos y polvo provenientes de distintas fuentes fijas (industrias de petróleo y petroquímica, química, metalúrgica y siderúrgica, automotriz, papelera, vidrio, alimentos, bebidas, entre otras), naturales (compuestos orgánicos provenientes del suelo y óxidos de nitrógeno producidos por actividad microbiana), de área (combustión agrícola y doméstica, artes gráficas, asfaltado, lavado en seco, uso de disolventes, pinturas y recubrimientos, gasolina, diésel, petróleo, asados al carbón, incendios forestales, quemas agrícolas, etc.) y móviles (autos particulares y comerciales, transporte público, tracto-camiones, motocicletas, aviones, embarcaciones y locomotoras, entre otras); todas estas fuentes son usadas de forma desmedida (PROAIRE, 2007; SEMARNAT, 2012).

La calidad del aire en México se determina considerando todos los factores de presión (crecimiento poblacional, vehicular y de consumo de energía) y la capacidad de la atmósfera en la zona, para eliminar o reducir la gran cantidad de contaminantes introducidos en ella. Se debe tomar en cuenta la altitud, el relieve orográfico que no permite la fácil dispersión de contaminantes y la alta radiación solar debido a la latitud en la que se encuentra (SEDEMA, 2012). El clima en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es templado semiseco en la región

noreste y en el centro es templado subhúmedo. El viento presenta una entrada principal en la zona noreste, llevando los contaminantes en dirección a las zonas pobladas del suroeste (INEGI, 2007).

En 2005, la mayoría de las emisiones generadas por el hombre fueron por el uso de vehículos automotores (61%), seguidas por fuentes naturales (22%), fuentes de área (9%), fuentes fijas (7%) y fuentes móviles no carreteras (1%) (Fig. 1). Si se considera solo los contaminantes generados por causas antropogénicas es posible observar principalmente la emisión de CO (76%), COV (9%), SO₂ (6%) y NO_x (5%) (Fig. 2). Asimismo, analizando las emisiones por fuentes móviles, a la mayor parte de los contaminantes los representa el CO, seguido por los NO_x y los Compuestos Orgánicos Volátiles con un 59.3% (Fig. 3) (SEMARNAT, 2012).

2.2 Daños a la salud por contaminantes atmosféricos

La contaminación del aire es causante del alto riesgo de afectaciones a la salud humana (WHO, 2003; Chen *et al.*, 2008; ERS, 2010; Silva *et al.*, 2013). Se ha descrito que trabajar o vivir cerca de carreteras está asociado a numerosos efectos en la salud incluyendo asma, baja función pulmonar y respiratoria, cáncer, alergias y enfermedades cardiovasculares (HEI, 2000; Pope y Dockery, 2006; Schwarze *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2013; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó recientemente la contaminación ambiental como carcinogénica para los seres humanos (Grupo 1) (Straif *et al.*, 2013), existen estudios y evidencias suficientes de que la exposición a la contaminación ambiental es causa de cáncer de pulmón (Loomis *et al.*, 2013).

2.2.1 Monóxido de carbono (CO)

El monóxido de carbono es un gas inodoro e incoloro formado en la naturaleza por la oxidación de metano (CH₄), es liberado al ambiente al descomponerse la materia orgánica o por procesos como incendios forestales. Su origen por causas antropogénicas está relacionado con la quema incompleta de combustibles en ausencia de oxígeno. Proviendo así la mayor parte de las emisiones de CO de los motores vehiculares (Fig. 4), así como del humo del cigarro, chimeneas, estufas, calentadores u otros equipos de gas, carbón o leña mal ventilados (INE, 2007).

El CO se ha relacionado con diversos efectos tóxicos en distintos organismos, debido a que provoca disminución importante de oxígeno en órganos y tejidos. Una vez en los pulmones, el monóxido de carbono interactúa con la hemoglobina (Hb), que es la proteína encargada de transportar el oxígeno de los pulmones a los órganos y tejidos, el problema es que la afinidad de la Hb hacia esta molécula es 200 veces mayor que hacia el oxígeno; lo que provoca una reducción en el transporte de este último resultando en hipoxia tisular (EPA, 1991).

La exposición a monóxido de carbono se ha relacionado a enfermedades de diversos tipos, existe asociación entre el incremento de su concentración y el aumento de cardiopatías en ancianos (Schwartz y Morris, 1995; Burnett *et al.*, 1997; Morris y Naumova, 1998), afectaciones cardiovasculares (Yang, 1998; Schwartz, 1999) y enfermedades respiratorias (Sheppard *et al.*, 1999). Sin embargo aún no se ha podido demostrar su asociación con mortalidad (Ito y Thurston, 1996; Kelsall *et al.*, 1997).

Se reconoce al CO como un indicador de otros contaminantes, sobre todo los relacionados con la quema de combustibles y vehículos automotores. El aumento en la concentración de este contaminante en la atmósfera genera daños en pulmón, corazón y vasos sanguíneos, no obstante, no es posible distinguir los efectos del monóxido de carbono con los de los demás contaminantes de la mezcla

de gases. Personas sanas no deberían presentar impactos en la salud al ser expuestas a las concentraciones existentes en la atmósfera, aunque debe tomarse en cuenta el tiempo de exposición y de la actividad física durante ésta (EPA, 2000). En México el límite máximo permisible es de 11 ppm en un lapso de 8 horas (NOM-021-SSA1-1993).

2.2.2 Bióxido de nitrógeno (NO₂)

Es un gas perteneciente a los óxidos de nitrógeno (NO_x), los cuales presentan gran reactividad. Las fuentes principales de los NO_x son los vehículos automotores debido a los procesos de combustión (Fig. 5) y de forma natural se obtienen por actividad volcánica, incendios forestales y relámpagos (INE, 2007). En México, alrededor del 30% de las emisiones de estos gases son generados por los vehículos de transporte y el 18% provienen de la generación de energía eléctrica (INE-SEMRNAAT, 2006).

Existen diversos estudios que relacionan la exposición al dióxido de nitrógeno con agravamiento de problemas respiratorios como asma (Boezen *et al.*, 1999; McConnell *et al.*, 1999; Shima y Adachi, 2000; Pattenden *et al.*, 2006), daño a defensas pulmonares (Linaker *et al.*, 2000; Chauhan *et al.*, 2003), asociación a bronquitis (McConnell *et al.*, 2003) y mortalidad cardiovascular y respiratoria (Samoli *et al.*, 2006). Hay estudios que indican que al estar en contacto con altas concentraciones de NO₂ en tiempos largos muestra efectos tanto en la estructura como en la función de los pulmones (WHO, 2005).

El bióxido de nitrógeno es utilizado como indicador de otros contaminantes más nocivos para la salud, la mayor parte del NO₂ atmosférico se emite en forma de NO, que se oxida rápidamente a NO₂ por acción del ozono. Debido a su interacción con hidrocarburos y luz ultravioleta es la principal fuente de ozono troposférico y de aerosoles de nitratos, constituyentes importantes de las PM_{2.5} del aire atmosférico (OMS, 2006); por esto los óxidos de nitrógeno y sus derivados pueden no ser responsables directos de los daños epidemiológicos encontrados en

diversos estudios (AIRNET Work Group 2, 2004). En México existen normas que imponen los límites máximos permisibles para los distintos contaminantes de la atmósfera y en el caso del NO₂ es de 0.21 ppm en el lapso de 1 hora (NOM-023-SSA1-1993).

2.2.3 Bióxido de azufre (SO₂)

Es un gas incoloro perteneciente a los óxidos de azufre (SO_x) que son miscibles en agua y se forman al quemarse el azufre. Las fuentes naturales como los volcanes o la descomposición de las plantas son las principales productoras de este gas, pero también se obtienen por quema de combustibles ricos en azufre como el combustóleo y carbón, la generación de energía eléctrica y procesos industriales (INE, 2007).

Se han realizado diversos estudios epidemiológicos en relación a la exposición de SO₂ y distintas enfermedades. Se le ha asociado con complicaciones respiratorias y cardiovasculares (Anderson *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2002) e incluso mortalidad a corto plazo (Katsouyanni *et al.*, 1997; HEI, 2000; Lee *et al.*, 2000; Venners *et al.*, 2003). Por otro lado, existen trabajos que proponen que las afecciones a la salud son causadas por el CO, el NO₂ y las PM₁₀; lo que dificulta la capacidad de distinguir a un contaminante específico responsable de los daños observados (Sunyer *et al.*, 2003).

Debido a los conflictos relacionados con la evidencia toxicológica de este gas es importante remarcar que es altamente soluble en agua y por lo tanto, alrededor del 95% del SO₂ inhalado es retenido en nariz y garganta. Por esto aproximadamente de un 12 a 15% del gas absorbido por las mucosas de membrana es exhalado intacto y el resto se convierte a iones que penetran en la circulación sanguínea (ATSDR, 1998). Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve límites permisibles de este gas, siendo en México el límite de 0.025 ppm anual, 0.110 ppm en 24 horas, y de 0.200 ppm por cada 8 horas promedio (NOM-022-SSA1-2010).

2.2.4 Ozono (O₃)

Es una especie reactiva de oxígeno, un importante constituyente de la atmósfera, principal contaminante del aire y gas de efecto invernadero, el cual eleva la concentración del CO₂ en la tropósfera (IPCC, 2007). Es un producto secundario generado por contaminantes primarios como los óxidos de nitrógeno (NO_x), los compuestos orgánicos volátiles y los hidrocarburos. En presencia de luz solar el NO₂ se divide en NO + O y permite la formación del O₃ (O₂ + O) (Restivo *et al.*, 2002). Su tiempo de vida en la atmósfera depende de la presencia y abundancia de sus precursores y de las condiciones climáticas adecuadas, por esto presenta concentraciones más altas durante el día. Los límites máximos permisibles en el país se establecen menor o igual a 0.095 ppm en 1 hora y menor o igual a 0.070 ppm en 8 horas (NOM-020-SSA1-2014).

La exposición aguda al gas por inhalación puede producir inflamación pulmonar y daño al epitelio de la cavidad nasal, a los bronquios, bronquiolos y alvéolos; provocando hiperreactividad bronquial y la inducción y agravamiento de la crisis del asma (Gustafsson y Cotgreave, 1996).

2.2.5 Material particulado (PM_{2.5} y PM₁₀)

Es una mezcla compleja de sustancias tanto de estado líquido como sólido que permanece en la atmósfera en lapsos de tiempo variables. Existen partículas primarias, es decir, producidas de forma directa por una fuente de contaminación, o secundarias generadas por su interacción con la atmósfera. Se clasifican en tres clases de acuerdo a su tamaño: PM₁₀, con un diámetro igual o menor a 10 µm; PM_{2.5}, con un diámetro igual o menor a 2.5 µm y PM_{0.1}, partículas ultra finas con un diámetro menor o igual a 0.1 µm (INE, 2007). Las principales fuentes de formación de PM son las vialidades pavimentadas y sin pavimentar, debido a que hay desprendimiento del polvo por el tráfico vehicular, así como las industrias o la erosión eólica (Figs. 6 y 7) (SEDEMA, 2012).

El tamaño de las partículas es importante ya que su transporte en la atmósfera y la manera en que pueden afectar a los seres vivos dependen de ello. Mientras más pequeña sea la partícula, mayor facilidad de acceso al organismo presenta y por ende puede dañar vías respiratorias, pulmones e incluso tejidos y células (INE, 2007). Existen diversos estudios relacionados con el daño a la salud de estos contaminantes, pero se ha encontrado que las partículas formadas por la combustión interna de los vehículos automotores son las más peligrosas para la salud (Laden, 2000; Katsouyanni *et al.*, 2001; Clancy *et al.*, 2002; Hoek *et al.*, 2002); asimismo existen estudios recientes que indican que las partículas de origen geológico también tienen componentes tóxicos dañinos (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002).

Las PM₁₀ son respirables y están formadas de distintos compuestos, como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) y diversos volátiles. Algunos de estos pueden causar daño genético (Binková *et al.*, 2003; Belpomme *et al.*, 2007; Claxton y Woodall, 2007; Lewtas, 2007; Valavanidis *et al.*, 2008), también se han relacionado con el incremento en la incidencia de cáncer de pulmón y muerte por problemas cardiopulmonares (Samet *et al.*, 2000; Schwarze *et al.*, 2006; Valavanidis *et al.*, 2008; Janssen *et al.*, 2013; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013).

Las partículas han causado más de 3.1 millones de muertes como resultado de enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón en adultos y enfermedades respiratorias en niños (Lim *et al.*, 2012). La Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC) declaró que la exposición al material particulado presenta relación con el desarrollo de cáncer, por lo que está catalogado como carcinógeno del Grupo 1. Los límites máximos permisibles en las PM₁₀ son de 75 µg/m³ durante 24 horas y de 40 µg/m³ como promedio anual, Asimismo, para las PM_{2.5} es de 45 µg/m³ para 24 horas y de 12 µg/m³ como promedio anual (NOM-025-SSA1-2014).

2.2.6 Compuestos orgánicos volátiles (COV)

Presentan una presión de vapor de 0.01 kPa o más a 293.15 °K. Se pueden clasificar en oxigenados (alcoholes, cetonas, ésteres y éteres), hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) y halogenados (clorados) (Coava y Tovar, 2009).

A diferencia de otros contaminantes, los COV se generan por distintas fuentes, siendo la principal los autos particulares, la industria química y la quema de gas LP; aportando casi el 30% de las miles de toneladas generadas anualmente (Fig. 8) (SEDEMA, 2012). Debido a que los COV son precursores del ozono es importante controlar sus emisiones y encontrar su relación con distintas afecciones a la salud en diferentes organismos.

2.2.7 Metales pesados

Se define como elementos con densidad mayor a 5g/cm³ o número atómico superior a 20, sin considerar a metales alcalinos y alcalino-térreos. Son conocidos como metales traza ya que se encuentran en la corteza terrestre a menos del 0.01% (Scheiner *et al.*, 1989). Todos los organismos vivos necesitan de los metales a bajas concentraciones para realizar diversas funciones biológicas, sin embargo si se encuentran elevados estos son tóxicos y se consideran como contaminantes ambientales.

La Asociación Oficial del Control de Alimentos de los Estados Unidos (AAFCO, 1996) afirma que los metales tóxicos son: aluminio (Al), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo hexavalente (Cr⁺⁶), hierro (Fe), manganeso (Mn), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (V) y zinc (Zn). La acumulación de éstos es una de las principales fuentes de contaminación en la mayoría de los países industrializados (Georgieva *et al.*, 2011). Las fuentes primarias de producción son la quema de combustibles fósiles, la industria minera, los tiraderos municipales, fertilizantes y plaguicidas (Kabata-Pendias y Pendias, 1989) y las fuentes naturales: los volcanes, las tormentas de arena en los desiertos, las tolvánicas e incendios forestales (García, 2007), se ha encontrado

que los metales localizados en las partículas suspendidas totales debido al tráfico vehicular son Pb, Cu, Ni, Cr, Cd, Zn y Fe, mientras que el Al y Pb se asocian a los procesos industriales (Fernández *et al.*, 2000; Sternbeck *et al.*, 2002).

Los efectos de metales pesados en diversos organismos pueden provocar cambios en su morfología, fisiología, bioquímica, endocrinología y conducta o reproducción (Bryan, 1976). A nivel molecular y celular se ha encontrado la interacción con grupos sulfhidrilo de las proteínas (Smith *et al.*, 1987; Kone *et al.*, 1990), daño en gradientes iónicos y generación de radicales libres (Simpson *et al.*, 1988; Schlüter *et al.*, 1995), así como alteraciones a mitocondrias, membrana plasmática y citoesqueleto (Díaz-Barriga *et al.*, 1989; Nieminen *et al.*, 1990; Kone *et al.*, 1990). Se ha relacionado la genotoxicidad de los metales pesados con inducción de daño oxidante al DNA e inhibición de diversos procesos de reparación del mismo (Hartwig, 1995).

Los metales pesados causan diversos efectos en la salud, en México el mercurio, plomo y cadmio son los de mayor preocupación debido a su alta toxicidad y su disponibilidad para la población (INECC, 2011). Las consecuencias de la exposición a estos metales disminuyen y alteran las funciones mentales y del sistema nervioso central, provoca daños en sangre, pulmón, hígado, riñón, entre otros órganos. Se ha encontrado que la exposición por periodos prolongados genera procesos degenerativos como Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular o esclerosis múltiple. Si ésta es larga y/o repetida puede causar cáncer (International Labour Organization, 1999).

2.3 Efectos de los contaminantes atmosféricos en plantas y sus mecanismos de defensa

Los efectos de distintos contaminantes en los organismos vivos se pueden observar a diferentes niveles de organización desde el molecular hasta el de ecosistema (Krupa, 1999). Gran variedad de contaminantes atmosféricos generan diversos tipos de daño a las plantas dependiendo de las características de la

especie, de la tolerancia o de las condiciones ambientales, si la humedad relativa del ambiente es adecuada puede favorecer la absorción de los contaminantes gaseosos ya que propicia la apertura de los estomas (CEAM, 2007).

Los efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales en plantas son importantes, ya que las plantas conforman gran parte de la biomasa y juegan un papel muy importante en la cadena alimenticia (Grant, 1998; Rajput y Agrawal, 2005).

Entre los daños ocasionados por los distintos contaminantes pueden mencionarse los siguientes:

- El ozono se considera genotóxico (Victorin, 1992; Boorman *et al.*, 1995; Sills *et al.*, 1995), su vía de acceso a los tejidos es a través de los estomas e induce la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) que pueden ser radicales hidroxilo, superóxidos, oxígenos libres y peróxido de hidrógeno (Sharma *et al.*, 1996; Restivo *et al.*, 2002; Kangasjarvi *et al.*, 2005).
- El bióxido de azufre a bajas concentraciones se considera nutriente pero en dosis altas se vuelve tóxico para los vegetales. Se deposita por vía seca en la cutícula o se difunde por los estomas, al tener contacto con el agua se transforma en bisulfito (HSO_3) y/o sulfito (SO_3^-) que son radicales libres que se convertirán finalmente en sulfato (SO_4^{2-}) acumulándose en las vacuolas y generando daños crónicos e incluso muerte celular (CEAM, 2007).
- Los óxidos de nitrógeno (NO_x) causan diversas lesiones en las plantas al ingresar vía estomática, sin embargo no se sabe si los efectos son directamente provocados por los NO_x o por los contaminantes secundarios derivados de éstos. Pueden generar manchas en las hojas, disminución de la tasa fotosintética y muerte celular de tipo necrosis (Carciner, 2007).

- Los metales pesados se transfieren a la atmósfera por volatilización y pueden ser absorbidos por las plantas, en los cuales son incorporados a la cadena trófica. La exposición a metales puede inducir una variedad de efectos fitotóxicos tanto directos como indirectos (Silva *et al.*, 2010). Son muy peligrosos para las plantas ya que se bioacumulan y el organismo no tiene la capacidad de excretarlos manteniendo concentraciones internas altas. Éstos se unen fácilmente a moléculas orgánicas propiciando inhibición de actividades celulares, generando un metabolismo deficiente o produciendo EROS (Fig. 9) (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

La generación de EROS activa vías de transducción involucradas a respuesta de estrés oxidante y a la expresión de diversos genes de defensa (Baker y Orlandi, 1995). Todas las lesiones del DNA causadas por los EROS afecta a distintas funciones del núcleo (transcripción y replicación), daños al ciclo celular, formación de aductos o puede acumular mutaciones deletéreas (Britt, 1996; Gichner *et al.*, 2001; Bray y West, 2005; Jiang *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2014), resultando en afectaciones a los lípidos de membrana y otras macromoléculas como DNA y proteínas que se ve reflejado en la reducción de la fotosíntesis, dispersión de electrolitos y aceleración en la senescencia (Mehlhorn y Welburn, 1994; Kanofsky y Sima, 1995; Miller *et al.*, 1999).

Por otro lado, las plantas poseen la capacidad de activar mecanismos de defensa, protección y reparación de daño causado por distintos agentes químicos o físicos. Estos pueden actuar de diversas formas; permiten limitar la absorción mediante el cierre de estomas (Bermejo *et al.*, 2007), pueden destruir los compuestos tóxicos generados o desarrollar diversos mecanismos de tolerancia o acumulación de los mismos (Navarro-Aviño *et al.*, 2007). Algunos de esos mecanismos están relacionados con la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, cambios en la capacidad de la pared celular para unir moléculas o el aumento en la exudación de sustancias quelantes. Para metabolizar los

compuestos orgánicos se involucra su conversión/activación (oxidación, reducción, hidrólisis), conjugan los metabolitos obtenidos anteriormente con moléculas hidrofílicas como azúcares o aminoácidos y compartimentalizan los compuestos modificados en vacuolas o en la matriz de la pared celular mediante la formación de enlaces con la lignina y la hemicelulosa (Dietz y Schnoor, 2001; Cherian y Oliveria, 2005; Komives y Gullner, 2005). Los compuestos inorgánicos implican transporte al interior de la célula, unión a ligandos específicos quelantes como ácidos orgánicos (ácido cítrico, oxálico o málico), aminoácidos (histidina y cisteína) y péptidos (fitoquelatinas y metaloteoneinas); posteriormente se compartimentalizan y hay desintoxicación por retención del complejo ligando-metal en la vacuola (Navarro-Aviño *et al.*, 2007; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

2.4 Especies vegetales como sistemas biológicos de prueba para biomonitoreo ambiental

Paralelamente a los métodos físicos y químicos que analizan las concentraciones de los contaminantes atmosféricos, los métodos biológicos permiten apreciar el efecto de los contaminantes de aire, usando los datos obtenidos para estimaciones de impacto ambiental y potencial de estos en distintos organismos, incluyendo a los humanos (Piraino *et al.*, 2006).

Los sistemas biológicos de prueba incluyen variedad de organismos, se han realizado experimentos con procariontes para detectar el daño generado por distintos agentes químicos encontrando de tipo primario o mutaciones al DNA y en organismos eucariontes en los que se detectan mayor número de efectos como mutaciones, aberraciones cromosómicas estructurales y aneuploidías (Houk, 1992; Valencia-Quintana *et al.*, 2013).

Las plantas superiores han sido usadas desde principios del siglo XX para evaluar la presencia o el grado de daño que generan diversos factores físicos o químicos del ambiente (Ruston, 1921). Como biomonitores pueden dar información acerca de la cantidad de compuestos tóxicos acumulados en ellas (Weinstein *et al.*,

1990). Estas presentan características que las favorecen como modelos genéticos para evaluar contaminantes ambientales, gracias a su sensibilidad para detectar mutágenos y evidenciar una gran variedad de alteraciones genéticas en distintos tipos de tejido (Salas, 2011). Diversos estudios muestran que las plantas son altamente sensibles a contaminantes de la atmósfera, tales como dióxido de azufre, óxido de nitrógeno, ozono, formaldehidos, amoniacos y otras mezclas complejas como la del humo de cigarro o por la quema de diésel (Rodrigues *et al.*, 1997). Existen distintos modelos de plantas superiores empleados, entre ellos: *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Tradescantia* clon 4430, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capilaris* y *Hordeum vulgare* (Grant, 1994; Gichner *et al.*, 2009; Valencia-Quintana *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2013).

El biomonitoreo *in situ* mediante plantas superiores puede ser muy útil para caracterizar contaminantes del aire en áreas específicas (Ceretti *et al.*, 2015). Las ventajas de utilizar a las plantas como sistemas biológicos de monitoreo son: su alta sensibilidad a los agentes tóxicos durante periodos de exposición que pueden durar de minutos a semanas, su facilidad de manejo y son organismos de mantenimiento económico y pueden sustituir instrumentos de mediciones de difícil adquisición (Oshima, 1974).

Los vegetales también son convenientes ya que su papel en las redes tróficas es de vital importancia, debido a que son productores de energía y fuente de alimento para diversos organismos, por lo cual llevan a los contaminantes a niveles tróficos superiores (Kovalchuk, 2008); aunque la respuesta de las plantas no se puede extrapolar directamente a la predicción de efectos tóxicos en la salud humana, los datos obtenidos con estos bioensayos proveen indicadores de contaminación del aire y estrés ambiental (Guimarães *et al.*, 2000).

Los contaminantes atmosféricos se encuentran todo el tiempo en contacto directo con las hojas de las plantas, e ingresan por medio de difusión pasiva gracias a la apertura de estomas. Estas estructuras son poros localizados en la

superficie de las hojas donde se realiza el intercambio gaseoso con la atmósfera. La fracción de concentración con la que pueden ingresar los gases se controla por la resistencia estomática de las hojas, condicionada por el número de estomas y el grado de apertura de estos poros, si se reduce la resistencia aumentará la conductancia estomática y esto elevará el flujo de los gases al interior de la hoja. El funcionamiento de los estomas puede afectarse por la temperatura, la humedad relativa del aire, la luz, los nutrientes o la concentración del CO₂ (Bermejo *et al.*, 2007).

Utilizar las plantas como organismos centinela facilita identificar efectos toxicológicos y daños a otros niveles superiores de la cadena trófica. Un organismo centinela se define como "cualquier organismo no humano que pueda reaccionar ante un contaminante ambiental antes de que el contaminante impacte sobre los seres humanos" (Stahl, 1997); por lo tanto cualquier organismo centinela debe reunir ciertas características (Van der Schallie *et al.*, 1999): 1. Poseer una respuesta al agente a monitorear capaz de ser medida, es decir ser sensible al reactivo, 2. Habitar el territorio en el que se va a realizar la prueba, 3. Contar con una población suficiente de individuos y 4. Tener una relación íntima con la fuente de exposición.

2.4.1 *Taraxacum officinale* (G.H. Weber ex Wigg.)

Taraxacum officinale o diente de león es una especie herbácea perenne común, su escapo puede ser desde uno a varios, hueco y con una sola cabezuela, sus hojas pueden medir de 2 a 40 cm de largo con división profunda; sus flores son amarillas de 7 a 15 mm de largo y crecen en inflorescencias con 80 a 250 flores, sus semillas se encuentran en la parte superior y presentan numerosas costillas longitudinales con espinas, con un vilano de 60 cerdas aproximadamente color blanco de 5 a 8 mm de largo (Fig. 10 A) (Espinosa y Sarukhán, 1997; Rzedowski y Rzedowski, 2001). Es de amplia distribución ya que se encuentra entre los 1200 y los 4000 metros de altitud (Rzedowski, 1997). Esta especie puede

seleccionarse como biomonitor de contaminantes gracias a su localización en zonas con distintas temperaturas y condiciones meteorológicas, así como en lugares con alto índice de contaminación junto a carreteras o en zonas industriales (Ligocki *et al.*, 2011), por su fácil identificación y muestreos sencillos y baratos (Petrova *et al.*, 2013). Existen estudios que relacionan la acumulación de contaminantes en sus hojas con el grado de contaminación ambiental local (Kabata-Pendias y Dudka, 1991; Marr *et al.*, 1999; Keane *et al.* 2001). Asimismo, es una planta utilizada con propósitos medicinales para tratamientos diuréticos, antibióticos, antireumáticos, antiespasmódicos, hepáticos, laxantes y de nutrición (Evans, 2002), por lo que es de suma importancia estudiar la acumulación de compuestos dañinos en este modelo vegetal.

2.4.2 *Robinsonecio gerberifolius* (T.M. Barkley y Janovec)

Robinsonecio gerberifolius es una planta nativa de identificación reciente la cual se encuentra distribuida en México en regiones alpinas o subalpinas como el Pico de Orizaba, el Nevado de Toluca, el Popocatepetl o el Iztaccihuatl a una altitud entre los 3500 y 4500 m. Se caracteriza por ser una planta herbácea de 15 a 33 cm de longitud, con usualmente de 1 a 3 escapos, hojas largas pecioladas de superficie gris-verde cubierta de una capa densa de fibras blancas; sus flores crecen en forma de disco en inflorescencias de color amarillo que se muestran entre los meses de julio y diciembre (Pruski, 2012) (Fig. 10B). Debido a su abundancia en la zona de estudio y a que se ha utilizado en trabajos en los que se ha descrito la presencia de sesquiterpenos que son productos naturales que actúan contra células cancerosas de diversos tipos (Arciniegas *et al.*, 2003) es un modelo vegetal con importancia biológica para ser evaluado.

2.5 Ensayos para evaluar contaminantes ambientales

2.5.1 Electroforesis unicelular alcalina

La electroforesis unicelular o ensayo cometa es una forma fácil de detectar rompimientos en el DNA. Este procedimiento se ha utilizado para investigar las respuestas celulares a distintos agentes genotóxicos, así como a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico que generan daño oxidante al DNA (Ventura *et al.*, 2013), incluyendo pruebas genotóxicas, biomonitoreo humano, ecogenotoxicología, daño al DNA y reparación (Collins, 2014).

Fue descrito inicialmente por Östling y Johanson y con el paso del tiempo ha sufrido modificaciones que permiten detectar distintos tipos de daño al DNA (Fairbarn *et al.*, 1995; Merk y Speit, 1999; Menke *et al.*, 2000). La versión alcalina del ensayo cometa (pH>13) fue introducida por Singh *et al.* (1988), detectando una gran cantidad de lesiones al DNA como rompimientos de cadena sencilla, de cadena doble, sitios sensibles al álcali (principalmente sitiosapurínicos y apirimídicos) (Fortini *et al.*, 1996; Gichner *et al.*, 2003), sitios de reparación por escisión incompleta y entrecruzamientos de DNA (DNA-DNA o DNA-proteína) (Fairbarn *et al.*, 1995; Tice, 1995). Debido a que la mayoría de los agentes genotóxicos generan esta variedad de efectos, la versión alcalina del ensayo cometa se considera como una prueba con gran sensibilidad para la detección del daño al DNA y se recomienda para las evaluaciones de genotoxicidad (Tice *et al.*, 2000).

El ensayo cometa se ha utilizado en diversos sistemas eucariontes tanto animales como vegetales. Debido a que estos últimos presentan una pared celular que recubre la membrana, es necesario un paso inicial que la rompa para que posteriormente ocurra la lisis celular de forma similar al tratamiento en células animales (Santos *et al.*, 2015).

En vegetales, la técnica consta de una serie de pasos (Fig. 11) que inician con el aislamiento de los núcleos de las plantas que fueron expuestas previamente,

mediante el rompimiento mecánico de la pared celular. Estos son embebidos en geles de agarosa, sometidos a una solución de lisis rica en detergentes y sales que permite la formación de nucleoides con ausencia de histonas de protección y componentes nucleares asociados al DNA (Moller, 2005; Gichner *et al.*, 2006), éstos se colocan a un pH alcalino para que la solución de lisis difunda fuera de la agarosa y la alta alcalinidad rompa los puentes de hidrógeno entre los pares de bases de la doble hélice de la molécula de DNA, formada por nucleótidos, que a su vez se componen de un grupo fosfato, una base nitrogenada y una pentosa; lo anterior permite su desenrollamiento quedando expuesto el esqueleto azúcar-fosfato que presenta una carga neta negativa; posteriormente se someten a un campo eléctrico para inducir el corrimiento del DNA. En el caso de que exista daño a la molécula, se forman pequeños fragmentos que generan una estela detrás del núcleo que migra hacia el ánodo (+) gracias a la diferencia de cargas. Seguido a su fijación, se tiñen con bromuro de etidio (colorante fluorocromado) el cual se une al DNA intercalándose entre los pares de bases de la doble cadena y por interacciones electrostáticas a los grupos fosfato del DNA (Collins, 2004), las muestras se observan al microscopio distinguiendo dos tipos de imágenes: las que muestran núcleos sin alteraciones que no presentan fragmentos de DNA (aparecen esféricas) y las que muestran daño significativo donde aparece la cauda (semejando un cometa) (Fig. 12). La medición del momento de la cauda definido como el producto de la longitud de la cauda y la cantidad de DNA en la misma, es utilizada frecuentemente como el parámetro principal de daño al material genético (Burlinson *et al.*, 2007) (Fig. 13).

Las ventajas del ensayo cometa son (Tice, 1995; Salas, 2011):

- a) Puede ser aplicado en varios tipos de células eucariontes.
- b) La información obtenida es en células individuales.
- c) Se requieren pocas células.
- d) Es de bajo costo.

- e) No se necesitan células en proliferación.
- f) Presenta alta sensibilidad.
- g) Se obtienen resultados en poco tiempo.

2.5.2 Expresión de micro-RNAs

Para que se lleve a cabo la codificación de proteínas y las células pueden regular una gran variedad de funciones biológicas, se necesita realizar el proceso de transcripción en el que se generan moléculas de RNA de las cuales solo es codificante el 4%, conocido como RNA mensajero (mRNA); el 96% restante forma parte del RNA no codificante que cumple diversas funciones dentro de la célula. En este grupo existen diversos tipos de RNA, como son: RNA ribosómico (rRNA) que forma a los ribosomas donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas, RNA de transferencia (tRNA) que actúa en la síntesis de proteínas, los RNA nucleares pequeños (snRNA o U-RNA) que actúan en el corte y empalme. Los RNA nucleolares pequeños (snoRNA) que modifican al rRNA, los RNA interferentes pequeños (siRNA) y los microRNA (miRNA) que regulan la expresión de genes individuales (Brown, 2008).

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

Las primeras observaciones que describen la acción de los miRNAs uniéndose a un mRNA para inhibir su expresión se realizaron con el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Descubriendo la forma en que el RNA lin-4 de 22 nt regula la producción de la proteína LIN-14, la cual se une al mRNA de LIN-14 y evita su traducción (Lee *et al.*, 1993). En 2001, ya se habían encontrado distintos miRNAs cercanos a 21 nt en diversos organismos, por ejemplo: plantas (*Arabidopsis*

thaliana), moscas (*Drosophila melanogaster*) y vertebrados (*Homo sapiens*) (Flores *et al.*, 2007).

Para la biogénesis de miRNAs en plantas, los genes se transcriben por las RNA polimerasas II o III y este transcrito primario se llama pri-miRNA, la proteína DCL1 ("Dicer-Like 1") procesa los pri-miRNAs a pre-miRNAs y después éstos a RNAs pequeños de doble cadena. Se puede observar que en el extremo 3' del miRNA maduro está metilado por la proteína HEN1, lo cual no existe en los miRNAs de animales. Ya que están procesados los miRNAs dúplex de 21 pb se transportan al citoplasma por Hasty por medio de un mecanismo dependiente de RAN-GTP y ahí son reclutados por el complejo RISC, en el cual una de la hebras es degradada para dar lugar al RNA maduro (Fig. 14) (Flores *et al.*, 2007). La importancia del papel biológico que tienen los miRNAs está referida directamente a la regulación genética tanto degradación post-transcripcional como represión traslacional (Kantar *et al.*, 2011), se han asociado a diversas funciones como el control de la proliferación celular, muerte, patrones neuronales en nematodos (Johnston y Hobert, 2003) y en plantas se relacionan con el control y desarrollo de hojas y flores, degradación de proteínas y respuesta a estrés ambiental o invasión patógena (Aukerman y Sakai, 2003; Emery *et al.*, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Dugas y Bartel, 2004; Chen, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Kantar *et al.* 2010; Unver *et al.*, 2010). Actualmente se hacen diversos experimentos tipo Northern blot para comprobar la expresión individual de los miRNAs en cuestión.

El miR398 es un conservado que se identificó en *Arabidopsis* tanto por predicción computacional como por análisis secuencial de una pequeña librería de RNA pequeño de esta planta sometida a estrés (Sunkar y Zhu 2004). La expresión del miR398 está relacionada con niveles de tolerancia a estrés. En *A. thaliana* el miR398 se encuentra cercanamente relacionado a los genes codificantes de la superóxido dismutasa Cu/Zn, al CSD1 citosólico y CSD2 del cloroplasto los cuales protegen a las células vegetales de radicales superóxido (Sunkar *et al.*, 2006). La

CSD1 se involucra en diversos procesos de respuesta a estrés por factores bióticos y abióticos, incluyendo sustancias químicas (Bartels y Sunkar, 2005). Durante el estrés por agentes químicos, existen diversos factores de transcripción que pueden ser regulados río arriba o río abajo dependiendo de la función celular que aumente la tolerancia al estrés provocado (Fig. 15) (Kumar, 2014). Resultados diversos indican que distintas especies vegetales siguen respuestas diferenciales del miR398 a varios tipos de estrés abiótico (Zhu *et al.* 2011).

2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica que busca sintetizar *in vitro* muchas veces un fragmento de DNA simulando la síntesis del material genético ocurrida dentro de la célula. Esencialmente la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de DNA, conociendo las secuencias que lo flanquean. Sus aplicaciones son muy diversas entre ellas están: estudios de expresión genética, detección de mutaciones, diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas, etc. (Cortazar y Silva, 2004).

Para esto se debe agregar en el tubo de reacción (Asuar, 2007; Tamay de Dios *et al.*, 2013):

1. Una polimerasa que es una enzima que funciona a temperaturas muy altas siendo muy estable y es obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus* conocida como *taq polimerasa* (Saiki *et al.*, 1988).
2. El DNA del organismo de interés conocido como cadena molde (DNA) o su complementaria (cDNA). Al utilizar el cDNA la reacción es conocida como RT-PCR ya que el DNA proviene del RNA mensajero y se obtiene por medio de una enzima transcriptasa reversa que convierte el RNA extraído en su cadena complementaria de DNA.

3. Los oligonucleótidos o "primers" que son secuencias que delimitan las bases nitrogenadas que se desean amplificar y son complementarios, los cuales son diseñados específicamente para un producto. Se realizan dos secuencias diferentes, una "forward" o sentido y una "reverse" o contrasentido, ambas deben hibridar con la cadena molde y así pueden formarse en dirección 5' - 3' con ayuda de la polimerasa.
4. Los dNTP's son las bases nitrogenadas (Adenina- A, Timina-T, Guanina-G, Citocina-C) necesarias para la construcción de las nuevas hebras de DNA.
5. El amortiguador que ayuda a que la reacción se mantenga en un pH de 8.
6. El magnesio como cofactor de las enzimas que aumenta la especificidad de la reacción y se encuentra disuelto en amortiguadores específicos.
7. El agua como disolvente, la cual debe ser libre de nucleasas para no degradar a los ácidos nucleicos.

Los tubos de reacción con todos sus componentes se colocan en un termociclador, el cual ayudará a llevar las reacciones a las temperaturas ideales para que se realice cada ciclo durante tiempos específicos. La técnica se lleva a cabo en tres etapas principales: la desnaturalización en la que las dobles cadenas se abren por ruptura de los puentes de hidrógeno, el tiempo puede variar ya que mientras más uniones de G-C haya mayor es el tiempo necesario debido a la presencia de los enlaces triples y se realiza a 94 °C, la temperatura desciende para dar inicio al segundo ciclo llamado amplificación que implica una alineación de los oligonucleótidos en el extremo 3' para formar el complejo molde-primer, el cual dará lugar a la unión de la polimerasa e inicie la copia de las bases en dirección 5' - 3'. Para comenzar el ciclo de extensión la temperatura se aumenta a 72 °C donde la enzima tiene su punto de máxima actividad y continúa la síntesis de diversos fragmentos a partir de los oligonucleótidos previamente alineados. Los ciclos se repiten aumentando el número de fragmentos obtenidos

y así pueda ser analizado posteriormente (Asuar, 2007; Tamay de Dios *et al.*, 2013). La PCR punto final a diferencia de la PCR en tiempo real es básicamente cualitativa o en el mejor de los casos semicuantitativa.

Para visualizar los productos obtenidos por la PCR punto final se corre una electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Ambos geles se pueden representar como redes que muestran poros de diversos tamaños por los cuales pasa el DNA; estos son atraídos por corriente eléctrica hacia el polo positivo gracias a las cargas negativas que le brindan los grupos fosfato al DNA. Primero pasan los fragmentos pequeños y los de mayor tamaño se quedan rezagados observando las bandas en el gel dependiendo del tamaño de su molécula. Para los micro-RNAs se utilizan geles de poliacrilamida debido a que sus poros son más pequeños y uniformes, así no se pierde la molécula de interés que es también de tamaño reducido, finalmente los geles se pueden revelar con plata (Asuar, 2007).

3. Justificación

La contaminación ambiental es un severo problema actual que afecta cotidianamente a todos los organismos vivos, por esto es importante evaluar los diversos componentes de esta mezcla compleja, así como sus efectos adversos.

El uso de plantas como *Taraxacum officinale* y *Robinsoncio gerberifolius*, como biomonitores de contaminación atmosférica no se ha abordado previamente; la primera es muy ubicua y se adapta a diversos ambientes, la segunda es nativa en la zona del Parque Nacional Izta-Popo. Una ventaja de utilizar plantas silvestres como sensores biológicos de contaminación es la posibilidad de visualizar no solo los efectos inmediatos, sino también evaluar el daño provocado capacidad de bioacumulación.

El empleo de organismos centinela, considerando la gran variabilidad inherente a los sistemas naturales, constituye una alerta de gran importancia acerca del daño que pueden producir diversos contaminantes antes de que lleguen a afectar al ser humano. Por lo tanto, la investigación relacionada con estos aspectos es fundamental, siendo el ensayo cometa y la metodología de microRNAs herramientas muy útiles que generan resultados básicos de gran interés, que correlacionados con el análisis químico y espectroscópico de los compuestos acumulados en las estructuras vegetales, pueden facilitar la aportación de conclusiones importantes.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto diferencial del daño al DNA y la expresión del miR398 en *Taraxacum officinale* y *Robinsonecio gerberifolius* en respuesta al estrés inducido por los contaminantes atmosféricos presentes en el Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM (CCA) y en el Parque Nacional Izta-Popo (Estación meteorológica "Altzomoni") (ALT) en la temporada de secas y lluvias 2015; correlacionándolos con el análisis químico de los metales pesados y espectroscópico de los contaminantes presentes en el ambiente.

5. Objetivos particulares

En los dos sitios de estudio, uno en el CCA y el otro en la ALT, en las temporadas de secas y lluvias, se planteó:

1. Determinar el daño genotóxico en las células foliares de *Taraxacum officinale* y *Robinsonecio gerberifolius* expuestas, mediante el ensayo cometa.
2. Evaluar la expresión del miR398 en ambas plantas en respuesta al estrés producido por la exposición.
3. Correlacionar el efecto genotóxico y el potencial estresante capaz de inducir la expresión del miR398 de los dos sitios, con los contaminantes ambientales detectados por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente y por espectroscopia FTIR de alta resolución por absorción solar.

6. Hipótesis

Dado que diversos contaminantes del aire han mostrado ser tóxicos en plantas, entonces se espera que *Taraxacum officinale* y *Robinsonecio gerberifolius* expuestas a dos puntos experimentales con distintos grados de contaminación atmosférica, evidencien un efecto diferencial de daño sobre el DNA y de expresión del miR398 en las temporadas de secas y lluvias 2015.

7. Materiales y métodos

7.1 Germinación y crecimiento de diente de león (*Taraxacum officinale*)

Las semillas seleccionadas de diente de león fueron remojadas en agua de la llave por 24 horas en oscuridad a temperatura ambiente para ser hidratadas, se colocaron en cajas con tierra húmeda esterilizada para su germinación y al surgir las plántulas fueron resembradas en macetas para que continuaran su crecimiento dentro de una cámara con luz, temperatura y humedad controladas, cuando las plantas mostraron un tamaño de hoja entre 10 y 15 cm fueron utilizadas para el experimento.

7.2 Recolección de planta nativa (*Robinsonecio gerberifolius*)

Se colectaron dieciocho ejemplares de las plantas nativas del Parque Nacional Izta-Popo colocando cada una de ellas en macetas individuales con tierra esterilizada, teniendo cuidado de no dañar sus hojas y raíces; se colocaron en una cámara de crecimiento dejándolas 6 semanas para su aclimatación.

7.3 Exposición de las plantas

Se realizó la exposición de las dos especies de plantas en 18 macetas a tres condiciones atmosféricas distintas: el testigo se colocó en una cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz (12 horas luz/12 horas oscuridad), humedad (20%) y temperatura (19°C) en el laboratorio (Fig. 16), el segundo grupo estuvo ubicado en la azotea del CCA, en una zona con altas concentraciones de gases contaminantes debido a su localización cercana a zonas muy transitadas en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) dentro de la Ciudad de México protegido de la lluvia (Fig. 17) y el tercer grupo fue ubicado en ALT, que se encuentra dentro del Parque Nacional Izta-Popo en el Estado de México a una altura de 3,985 msnm y sus coordenadas son 19°07' 12"N 98°39' 14"O igualmente protegidas de la lluvia (Figs. 18 y 19). Se realizaron muestreos durante la semana

0, 2, 4 y 6 de exposición de ambas especies de plantas y fueron trasladadas al laboratorio para realizar sus respectivos procesamientos.

7.4 Electroforesis unicelular o ensayo cometa

7.4.1 Aislamiento de núcleos

Se cortaron todas las hojas de dos plantas de las tres condiciones y de cada una de las especies, se lavaron por separado con agua destilada varias veces y con mucho cuidado de no maltratar ninguna de las estructuras se secaron con toallas de papel. Dos hojas de cada condición se congelaron para su posterior uso en el ensayo de microRNA, cuatro se secaron para el análisis químico y se tomaron tres para el aislamiento de núcleos en el ensayo cometa.

En condiciones de oscuridad y sobre hielo se colocaron cortes de las hojas de 1 cm² en cajas Petri pequeñas con 300 µL de PBS frío (pH 7.4) y con una navaja de bisturí nueva y fría se realizaron cortes finos perpendiculares a la venación central. Se dejó reposar la muestra de 3 a 5 minutos en el PBS frío permitiendo la precipitación de los núcleos por gravedad en el fondo de las cajas. Con una punta de micropipeta cortada, se tomaron 50 µL de la suspensión nuclear y se agregaron en un microtubo de 1.5 mL conteniendo 50 µL de agarosa de punto de fusión bajo (Sigma) 1% a 37 °C y se mezcló suave y lentamente; se pusieron 80 µL de la mezcla en un cubreobjetos que se empalmó cuidadosamente con un portaobjetos, previamente cubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% evitando la formación de burbujas. Las laminillas se acomodaron en una placa metálica fría por 5 minutos para que solidificara la agarosa y se retiró suavemente el cubreobjetos, se colocó una tercera capa de 80 µL de agarosa de punto de fusión bajo 0.5% y se dejaron solidificar por 5 minutos para retirar posteriormente el cubreobjetos. Las laminillas se introdujeron en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, NaOH 10 mM, Tritón X-100 1% y DMSO 10% a pH=10) por al menos 1 hora a 4 °C.

7.4.2 Electroforesis

Terminado el tiempo de lisis, las preparaciones se secaron de la parte posterior y laterales y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con amortiguador alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13). Se dejaron incubar por 15 minutos para desenrollar el DNA y se corrieron a 25 voltios y 300 mA por 20 minutos en oscuridad a 4 °C. Las laminillas se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante (Tris 0.4 M, pH 7.5) por 5 minutos cada lavado. Se fijaron y deshidrataron con etanol 100% frío en una caja coplin por 15 minutos y se dejaron secar al aire y se guardaron hasta ser teñidas.

7.4.3 Tinción

Para la tinción de las laminillas, fueron humedecidas con agua desionizada estéril (filtro millipore 0.22 µm), se escurrieron y se les colocaron 50 µL de bromuro de etidio (20 µg/mL). Se colocaron en cajas porta laminillas en una cámara húmeda con agua desionizada estéril y cubiertas con papel aluminio para evitar que se deshidrataran y para impedir que decayera el fluorocromo.

7.4.4 Registro de cometas

Para evaluar el daño al DNA de las células vegetales se registró el momento de la cauda (tail moment o TM) mediante el analizador de imágenes Comet Assay IV acoplado a un microscopio de fluorescencia Axiostar Plus (Zeiss) con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm bajo un objetivo de 20X, obteniendo con este programa un amplio rango de parámetros densitométricos y geométricos que describen las proporciones del cometa completo y las medidas de la cabeza y la cauda.

Se analizaron 3 laminillas por cada tratamiento que se realizó al menos dos veces, y se obtuvo el promedio del momento de la cauda. De cada preparación tanto de los testigos como de las distintas condiciones de exposición se tomaron al azar 100 núcleos, considerando los que presentaran una estructura conservada y una cabeza con buena intensidad.

7.5 Análisis del miR398

7.5.1 Extracción de RNA

Las hojas de plantas expuestas por 6 semanas que fueron pesadas previamente y congeladas en la fecha de recolección se homogeneizaron con trizol (1 mL por 50-100 mg de tejido). Se incubaron por 5 minutos a una temperatura de 15 a 30°C para permitir la disociación completa de los complejos núcleoprotéicos. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de cloroformo por 1mL de trizol, se agitaron con vortex por 15 segundos y se incubaron a una temperatura de 15 a 30 °C por 2 a 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos a entre 2 y 8 °C. Al salir de la centrifuga se observaron tres fases: una roja en la parte inferior, una interfase fenol/cloroformo y una superior acuosa incolora. El RNA se tomó de la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio con alcohol isopropílico (0.5 mL de isopropanol por 1 mL de trizol). Las muestras se incubaron a 4 °C por 24 horas y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos entre 2 y 8 °C. El RNA se precipitó formando un botón al fondo del tubo, se decantó el sobrenadante, se lavó el sedimento con etanol al 75% (1 mL de etanol por 1 mL de trizol). Se mezcló con vortex y se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos a 2 a 8 °C. Se dejó secar el botón de RNA al aire de 5 a 10 minutos, posteriormente se resuspendió en 20 μ L de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

7.5.2 Cuantificación de RNA

Se determinó la concentración y pureza del RNA total de cada muestra en un Nanodrop-1000 (NanoDrop Lite Printer, Thermo Scientific), colocando un volumen de 2 μ L de cada una de las muestras obtenidas previamente por extracción.

7.5.3 Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA se realizó empleando el "Kit" de Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis con la mezcla de reactivos específicos, para el cual se empleó una concentración de RNA final de 20 ng/ μ L. Las condiciones utilizadas en el termociclador (BIORAD- MJ MINI, modelo PTC-1148) fueron: ciclo

1 a 37 °C por 60 minutos, ciclo 2 a 70 °C por 15 minutos, ciclo 3 a 22 °C por 2 minutos y un último ciclo a 4 °C; a esta temperatura se mantuvieron hasta su uso posterior.

7.5.4 PCR de punto final

La PCR de punto final se realizó mezclando reactivos específicos marca Thermo Scientific junto con oligonucleótidos "forward" (Secuencia GGCGTGTGTTCTGAGGTC) y "reverse" (Secuencia CAGTGCAGGGTCCGAGGT), los cuales fueron diseñados previamente y el cDNA sintetizado para cada una de las diversas condiciones evaluadas. Las muestras fueron colocadas en el termociclador y las condiciones aplicadas fueron: ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, ciclo de amplificación que consta de tres pasos, el primero a 94 °C por 30 segundos, el segundo a 56 °C por 30 segundos y el tercer paso a 72 °C por 30 segundos, repitiendo este ciclo 40 veces; posteriormente se inició un ciclo a 72 °C por 5 minutos y un último ciclo a 20 °C por 5 minutos. Se mantuvieron las muestras a 4 °C hasta su corrimiento en los geles de poliacrilamida.

7.5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se elaboraron geles de poliacrilamida al 10% en placas para electroforesis BIORAD de 0.75 mm. Las muestras fueron cargadas en los geles con un volumen final de 15 µL (10 µL productos de PCR + 5 µL de amortiguador 2x de carga de urea). Se corrió la electroforesis a 110 voltios durante 55 minutos. Transcurrido este tiempo se colocaron los geles en 50 mL de fijador por 10 minutos, posteriormente en 50 mL de la solución de tinción por 5 minutos, seguido de 50 mL de la solución de revelado a 4°C por 10 minutos y finalmente en 50 mL de solución de paro durante 5 minutos. Se capturó la imagen del gel obtenido y se analizó el peso molecular de cada una de las bandas observadas.

7.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos del momento de la cauda, se calculó la media, la desviación estándar y el error estándar y se compararon con las distintas condiciones experimentales respecto a los testigos con una prueba ANOVA de dos vías en el programa Statistica considerando las diferencias significativas con una $P < 0.05$; en los casos donde existió una diferencia significativa entre los testigos y los tratamientos se aplicó una prueba post hoc de Newman-Keuls.

8. Resultados

8.1 Ensayo cometa

En la figura 20 se observan los datos de la media \pm error estándar de al menos 300 valores del momento de la cauda, registrados en 6 laminillas diferentes para cada una de las atmósferas analizadas en temporada de secas y lluvias 2015, durante el experimento para *T. officinale* encontrando una mayor genotoxicidad en la temporada de lluvias comparada con el resto de las condiciones evaluadas y un aumento en el daño registrado a mayores tiempos de exposición; la figura 21 muestra lo mismo para *R. gerberifolius* indicando un cambio en el daño genotóxico desde tiempos más cortos (semana 2) con una serie de fluctuaciones, incrementando el efecto en la temporada de lluvias en relación al tiempo de exposición y manteniéndose similar en secas de la semana 2 a la 6 respectivamente.

En la tabla I se observa el promedio de los contaminantes monitoreados por la Red Universitaria de Observatorios Atmosféricos (RUOA) en el Centro de Ciencias de la Atmósfera y Alzomoni durante la temporada de secas y lluvias 2015 los cuales muestran ligeras variaciones a lo largo del tiempo; mayores concentraciones de CO₂, O₃, PM_{2.5}, PM₁₀, UVA y UVB en secas y CH₄, CO, NO, NO₂, NO_x y SO₂ son más altas en lluvias.

Se realizó la cuantificación de metales contenidos en las hojas de *T. officinale* después de seis semanas de exposición en cada una de las tres atmósferas evaluadas tanto en la temporada de secas como en la de lluvias, los datos que se pueden observar en la tabla II indican una mayor concentración en Alzomoni para Mn, Fe, Zn, Mb, Co y Cd en la temporada de secas y de Mn, Fe, Cu, Mb, Cr, Co, Cd, Sb y Pb en lluvias en comparación a los testigos y al CCA. En el CCA Para el Cu, V, Cr, Sb y Pb se registra mayor concentración en la temporada de secas y en el caso del V y Zn existió una mayor concentración en las hojas en lluvias. Cabe destacar en todos los casos tanto en testigos como en expuestos se encontró una

mayor concentración de los metales evaluados que los reportados para su L.D. ($\mu\text{g/L}$).

8.2 Expresión de micro-RNAs

Se obtuvo la expresión del microRNA398 mediante la prueba de PCR de punto final en la temporada de secas y lluvias 2015 en *T. officinale* y *R. gerberifolius*. Los resultados obtenidos se observan en los geles localizados en las figuras 22 y 23 respectivamente; para corroborar que las bandas localizadas en los geles eran del miR398 se realizó el corrimiento del oligonucleótido constitutivo U6 en ambas especies observado en la figura 24. Los resultados encontrados mediante la presencia de bandas en las muestras, indican la expresión diferencial del miR398 conforme avanza el tiempo de exposición con relación a los testigos de la semana cero en ambas plantas, observándose una marca más intensa después de seis semanas especialmente en la temporada de lluvias y en *Robinsonia gerberifolius*.

9. Discusión

Debido a que la atmósfera es una mezcla compleja, hacer una estimación del riesgo genotóxico que implica resulta difícil (Piraino *et al.*, 2006), en este trabajo se plantea una estrategia basada en el establecimiento de dos plantas silvestres como biomonitores u organismos centinela para evaluar el potencial genotóxico del ambiente de dos sitios ubicados uno en el Estado de México (Altzomoni) y otro en la Ciudad de México (Centro de Ciencias de la Atmósfera), así como para detectar la expresión de microRNAs asociados a estrés.

Dado su importante lugar en la cadena trófica y su naturaleza sésil, las plantas pueden ser utilizadas como sensores estables en los ecosistemas, siendo una buena fuente para obtener información relacionada a los compuestos peligrosos del ambiente como a sustancias químicas lipofílicas e hidrofílicas y a metales pesados que pueden generar daño genotóxico en distintos organismos vivos (Gichner *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2013). Éstas se encuentran continuamente expuestas a la mezcla de contaminantes y debido a su capacidad de acumulación constituyen biomonitores de contaminación muy importantes, las raíces se encuentran en constante proliferación por lo que pueden presentar una recuperación pronta del daño y retirar los aductos generados al DNA; particularmente las hojas son un tejido óptimo para el biomonitoreo *in situ* de agentes genotóxicos, logrando detectar lesiones al DNA después de tiempos largos de exposición (Gichner *et al.*, 1999, 2000; Ventura *et al.*, 2013). Aunque la respuesta de la plantas a los contaminantes ambientales no puede ser directamente extrapolada para predecir su efecto en la salud humana, son muy útiles como bioindicadores y biomonitores de estrés ambiental (Guimaraes *et al.*, 2000).

El ensayo cometa permite combinar técnicas bioquímicas para detectar rompimientos al DNA de cadena sencilla, doble, sitios álcali-lábiles y entrecruzamientos en los núcleos de células individuales; siendo una prueba

genotóxica sensible, rápida y económica (Gichner *et al.*, 2003; Awadhesh, 2008). Ésta permite observar rompimientos al DNA que pueden dar origen a aberraciones cromosómicas si no son reparados correctamente. Todo esto puede provocar muerte celular o condiciones patológicas en las que el daño llega a ser heredable y/o conducir a eventos de carcinogénesis (Fadeel *et al.*, 1999). Este se lleva a cabo a distintas escalas biológicas y evalúa el daño en diferentes respuestas ecotoxicológicas en varios niveles como son: desarrollo, reproducción, fisiología o a niveles bioquímicos (Poli *et al.*, 1999).

El daño genético observado en este estudio en ambas plantas está relacionado con el tiempo de exposición tanto en temporada de secas como de lluvias y coinciden con valores elevados de varios contaminantes monitoreados por el grupo de espectroscopia y percepción remota del CCA-UNAM en Altzomoni y en el Centro de Ciencias de la Atmósfera, esto puede asociarse a la acumulación de éstos generando un mal funcionamiento de la planta por interacción con el material genético (Hossain y Huq, 2002; Gichner *et al.*, 2004). Los datos también permiten vincular un daño más alto registrado en temporada de lluvias, con una mayor cantidad de gases contaminantes (NO, NO₂, SO₂, CO₂ y CH₄) detectados por espectroscopia en el infrarrojo transformada de Fourier (FTIR) de alta resolución por absorción solar en esta temporada. Esta respuesta de las plantas puede deberse también a un aumento en la humedad relativa del ambiente, asociado a su fisiología, dado que la apertura estomática es mayor en esta época para favorecer la transpiración y por ende puede haber una mayor entrada de los gases contaminantes responsables del daño al DNA. La media de los contaminantes fue constante a lo largo del tiempo de exposición, sin embargo el daño acumulado al DNA se incrementó en las semanas 2, 4 y en la semana 6 fue mayor.

Al evaluar la interacción de los gases contaminantes con radiaciones UV en el ambiente se han asociado daños en el DNA como rompimientos de cadena sencilla, doble, efecto en sitios álcali-lábiles, oxidación de bases, reacciones DNA-DNA y

entrecruzamientos DNA-proteína (Ventura *et al.*, 2013). Algunos estudios demuestran que la exposición a gases contaminantes como O₃ y CO₂ generan momentos de la cauda elevados respecto a los testigos y si estos se encuentran juntos el daño es mayor (Tai *et al.*, 2010) en el presente trabajo, éste último registró un incremento significativo durante la semana 6 en la temporada de lluvias y puede ser responsable del aumento en la genotoxicidad detectada en ambas especies; Restivo *et al.* (2002) y Sriussadaporn *et al.* (2003) demuestran un mayor daño al DNA asociado a concentraciones más altas de los gases contaminantes en plantas expuestas en vías transitadas.

Por otro lado, los contaminantes monitoreados en la estación atmosférica de Altzomoni fueron menores a los encontrados en el CCA debido a que es una zona protegida con menor tránsito vehicular y pocas emisiones de gases contaminantes. Los valores altos de daño al DNA observados en las plantas provenientes de Altzomoni pueden explicarse considerando que durante el transcurso de la exposición hubo un incremento en la presencia de varios metales pesados, particularmente en la semana 6 que puede deberse a las continuas exhalaciones del volcán Popocatépetl cuyas cenizas liberadas pueden contener Mn, Cu, Zn y Pb (Narvaez-Porras y Cano-Valle, 2004).

Los metales pesados tienden a bioacumularse y pueden asociarse a moléculas orgánicas mediante uniones ligando-metal con uniones no covalentes (Schaaper *et al.*, 1987), puede inhibir la actividad de algunas proteínas o dañar su estructura, desplazar elementos esenciales para el metabolismo generando deficiencias en el organismo y catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) o radicales libres que provocan estrés oxidante, éste puede involucrarse en daño celular a distintos niveles: inactiva proteínas o enzimas por oxidación de grupos sulfhidrilo en los puentes disulfuro, puede romper las cadenas que forman las membranas o tener efectos sobre el DNA como mutaciones, aberraciones cromosómicas o alteraciones en la síntesis y reparación. En las plantas, existen

efectos deletéreos inducidos por la exposición a metales los cuales generan estrés oxidante; al existir la intoxicación se generan EROS que tiene que ser removidos para evitar un daño oxidativo. Éstos organismos unen a los metales pesados a metaloteoneinas (proteínas ricas en cisteínas) (Cobbet y Goldsbrough, 2002), éstas proteínas especializadas actúan como eliminadores de EROS y moléculas señal dentro y fuera del núcleo interactuando con el material genético (Wang *et al.*, 2010; Balestrazzi *et al.*, 2011a). El daño formado por los radicales OH^- pueden conducir a carcinogénesis mediante la alteración de oncogenes, genes supresores de tumores o genes reguladores del crecimiento (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

El plomo (Pb) incrementado ampliamente en la semana 6 de la temporada de lluvias en ALT busca unirse a los grupos fosfatos de la cadena de DNA (Tajmir-Riahi *et al.*, 1993) formando compuestos clastogénicos (Leonard, 1988) y está relacionado a problemas en la síntesis del DNA, mutaciones y aberraciones cromosómicas (Rojas *et al.*, 1999), el cadmio (Cd) visiblemente elevado en ambos sitios durante lluvias y secas interactúa con los ácidos nucleicos sobre los grupos fosfato (Jacobson y Turner, 1980; Koizumi y Waalkes, 1990) induciendo rompimientos de DNA, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Gebhart y Rossman, 1991) y el cobre (Cu) acrecentado en ALT en lluvias está involucrado en la respuesta de defensa por antioxidantes, desintoxicación y regula genes de transcripción (Karmous *et al.*, 2014) generando iones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo los cuales dañan a la célula, principalmente a las proteínas en sus cadenas de aminoácidos mediante oxidación (Bona *et al.*, 2007; Villiers *et al.*, 2011).

Diversos trabajos relacionados con la genotoxicidad de Pb y Cd han probado que tienen efecto carcinogénico (Valverde *et al.*, 2000, 2001). En el presente estudio los metales cuantificados en las hojas de las plantas, mostraron una mayor cantidad de Mn, Fe, Cu, Zn, V, Cr, Co, Cd, Sb y Pb en la época de lluvias que en la época de secas en la mayoría de los casos en ambas atmósferas.

El estrés genotóxico en plantas es considerado como un factor crítico que daña la productividad y el estado físico de la estabilidad del genoma, las lesiones más frecuentes en el DNA son los daños a las bases por oxidación, alquilación, desaminación, sitios apurínicos o apirimídicos (AP) y rompimientos de cadena sencilla (Tuteja *et al.*, 2009). Al sufrir alteraciones de este tipo se activan señales de transducción que generan arresto en el ciclo celular y esto permite regular la expresión de genes de reparación, al causarse el daño en el núcleo y generar estrés oxidativo en el exterior se inicia una compleja actividad molecular que puede resultar en muerte celular programada (Balestrazzi *et al.*, 2013). Angelis *et al.* (2000) encontró en *Vicia faba* adaptaciones posteriores al pre-tratamiento con agentes mutágenos alquilantes utilizando el ensayo cometa como medida para los niveles de APs en los que observó una reducción del daño al DNA. La respuesta de distintos genes de reparación relacionados a estrés abiótico, como son los contaminantes del aire y los metales pesados, representa una oportunidad valiosa para realizar investigaciones profundas de las relaciones entre reparación de DNA y adaptación genotóxica (Balestrazzi *et al.*, 2013). Los ensayos proteómicos o genómicos constituyen un elemento muy importante para complementar los estudios de genotoxicidad (Fielden y Zacharewski, 2001; Awadesh, 2008), con la intención de analizar el efecto de los contaminantes atmosféricos sobre ambas plantas a un nivel más fino, se estudió la expresión del miR398 mediante la técnica de PCR de punto final en las muestras que presentaron mayor daño genotóxico, es decir las de la semana 6 comparándolas con la semana 0 en ambas temporadas y sitios de exposición.

En las plantas muchos procesos como el desarrollo, distintas sustancias de señalización, degradación de proteínas, floración, mantenimiento del genoma, respuesta a estrés ambiental o invasión de patógenos son regulados por vías similares mediante distintos miRNAs (Palatnik *et al.*, 2003; Aukerman y Sakai, 2004; Vaucheret *et al.*, 2004; Chen, 2005; Mallory *et al.*, 2005; Kantar *et al.*, 2010, 2011). El miR398 está relacionado con respuesta a estrés oxidante, presencia de

metales como Cu^{2+} y Fe^{3+} , ozono, ácido abscísico, estrés salino o patógenos disminuyendo o aumentando su expresión como protección al organismo (Sunkar *et al.*, 2006; Jagadeeswaran *et al.*, 2009; Kumar, 2014). Estudios recientes muestran que los miRNAs en plantas afectan a nivel de mRNA generando represión en la traducción (Brodersen *et al.*, 2008) y se ha encontrado que la exposición a radiación induce paralelamente micronúcleos (MN), metilación del DNA y expresión de miRNAs; relacionando la inestabilidad genómica por la formación de MN con una baja expresión de diversos miRNAs (mmu-miR-720, hsa-miR-107, 181d, 680, 720, 1305 y 1826) (Aypar *et al.*, 2011).

Entre los miRNAs de respuesta al estrés, el miR398 se ha descrito directamente involucrado en la respuesta a agentes oxidantes (EROS), deficiencia de agua o cobre y fósforo, por estrés salino, por ácido abscísico o por UV, entre otros (Zhu *et al.*, 2011). Al analizar la expresión del miR398 después de 6 semanas, se observa que en *R. gerberifolius* hay una expresión menor en el testigo, mediana en el CCA y muy aumentada en ALT en la temporada de lluvias, mientras que *T. officinale* prácticamente no presenta marca en ninguna condición durante ambas temporadas; lo cual puede indicar una respuesta de tolerancia al estrés, causado por la exposición a los contaminantes ambientales y metales pesados, disminuyendo la producción del miR398.

En esta investigación se observó en general una mayor expresión del miR398 en *R. gerberifolius* sobre *T. officinale* en temporadas de secas y lluvias, sugiriendo una diferencia en la sensibilidad de ambas plantas pero también una respuesta distinta, ya que miRNAs que se han conservado evolutivamente en varias especies de plantas, pueden responder de maneras diferentes a ciertos tipos de estrés abiótico debido a las características variables entre especies. Los mecanismos subyacentes a las respuestas diferenciales entre especies necesitarán investigación posterior (Sunkar *et al.*, 2006; Kantar *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2011).

El estudio de la contaminación del ambiente es una prioridad en los países desarrollados, en México no existen estudios que relacionen el efecto genotóxico en organismos vegetales centinela con el estado de la calidad del aire. Sin embargo hay trabajos con niños de la Ciudad de México en células de epitelio nasal que muestran diferencias significativas respecto a niños que viven en lugares con menor tráfico vehicular mediante la prueba del ensayo cometa (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 1999). Entre algunos trabajos relacionados al tema cabe destacar a Baumgardner *et al.* (2012) que señalan la importancia de los ecosistemas peri-urbanos en la mitigación de la contaminación del aire de la Ciudad de México. Por esto y con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede afirmar que el monitoreo de los contaminantes mediante organismos vegetales debe ser considerado gracias a que da un esquema de riesgos ecotóxicos y genotóxicos, los cuales brindarán resultados favorables para la población tanto a nivel de salud como de conocimiento de los principales contaminantes atmosféricos.

10. Conclusiones

En ambas especies se mostró genotoxicidad directamente proporcional al tiempo de exposición en temporada de lluvias y secas, siendo más sensible *R. gerberifolius* mostrando que la temporada de lluvias provocó más daño que la de secas mediante la prueba de electroforesis unicelular alcalina.

Se obtuvo una mayor expresión de miR398 en *R. gerberifolius* en comparación con *T. officinale* en ambas temporadas expuestas a distintas atmósferas.

Este estudio resalta la importancia de implementar estas técnicas paralelamente a los análisis químicos tradicionales, así como a metodologías de vanguardia como es el análisis de espectroscopia y percepción remota.

11. Referencias

- AAFCO. (1996). Association of American Feed Control Officials. Official Publication, 1993. pp. 230-236.
- AIRNET Work Group 2. (2004). Air pollution and the risk to human health: epidemiology. Utrecht, Insitute for Risk Assesment Sciences.
- Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Bonner J.C., Murray J.C., Rosas I., Rosales S.P. y Osornio-Vargas A.R. (2002). Biologic effects induced *in vitro* by PM₁₀ from three different zones of México City. *Environ Health Perspect.* 110, 715-720.
- Anderson D. (1988). Comet assay responses of carcinogen exposure. *Mutagenesis.* 13, 539-555.
- Anderson H.R., Spix C., Medina S., Schouten J.P., Castellsague J., Rossi G., Zmirou D., Touloumi G., Wojtyniak B., Ponka A., Bacharova L., Schwartz J. y Katsouyanni K. (1997). Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results for the APHEA project. *Eur Respir J.* 10, 1064-1071.
- Angelis K.J., McGuffie M., Menke M. y Schubert I. (2000). Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. *Environ Mol Mutagen.* 36, 146-150.
- Arciniegas A., Pérez-Castorena A.L., Reyes S., Contreras J.L. y Romo A. (2003). New Oplopane and Eremophilane Derivatives from *Robinsonecio gerberifolius*. *J Nat Prod.* 66, 225-229.
- Asuar L.E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología molecular.* Instituto Nacional de Ecología. Tomado de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=530.
- ATSDR. (1998). Toxicological profile for sulfur dioxide. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Public Health Service, Atlanta, GA.
- Aukerman M.J. y Sakai H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell.* 15, 2730-2741.
- Awadhesh N. J. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 23, 207-221.
- Aypar U., Morgan W.F. y Baulch J.E. (2011). Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations. *Mutat Res.* 707, 24-33.

- Baker C.J. y Orlandi E.W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* 33, 299–321.
- Balestrazzi A., Confalonieri M., Macovei A., Dona M. y Carbonera E. (2011). Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity. *Plant Cell Rep.* 30, 287-295.
- Balestrazzi A., Confalonieri M., Macovei A., Dona M. y Carbonera D. (2013). *Genotoxic Stress, DNA Repair and Crop Productivity.* Springer Science Business Media. Nueva York. pp. 153-169.
- Bartel D. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281-297.
- Bartels D. y Sunkar R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci.* 24, 52123-52158.
- Baumgardner D., Varela S., Escobedo F.J., Chacalo A. y Ochoa C. (2012). The role of peri-urban forest on air quality improvement in the Mexico Megalopolis. *Environ Poll.* 163, 174-183.
- Belpomme D., Irigaray P., Hardell L., Clapp R., Montagnier L., Epstein S. y Sasco A.J. (2007). The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res.* 105, 414-429.
- Bermejo V., Alonso R., Elvira S., Rábago I. y García M. (2007). El ozono troposférico y sus efectos en la vegetación. CIEMAT, Unidad de Contaminación Atmosférica. 75 p.
- Binková B., Cerná M., Pastorková A., Jelínek R., Benes I., Novák J. y Srám R.J. (2003). Biological activities of organic compounds adsorbed into ambient air particles: comparison between the cities to Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutat Res.* 525, 43-59.
- Boezen H. M., van der Zee S. C., Postma D.S., Vonk J. M., Gerritsen J., Hoek G., Brunekreef B., Rijcken B. y Schouten J.P. (1999). Effects of ambient air pollution on upper and lower respiratory symptoms and peak expiratory flow in children. *LANCET.* 353, 874-878.
- Bona E., Marsano F., Cavaletto M. y Berta G. (2007). Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* rots. *Proteomics.* 7, 1121-1130.
- Boorman G.A., Sills R.A., Grumbein S., Hiley R., Miller R.A. y Herbert R.A. (1995). Long-term toxicity studies of ozone in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Lett.* 82/83, 301-306.

- Bray C.M. y West C.E. (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors of the maintenance of genome integrity. *New Phytol.* 168, 511-528.
- Britt A.B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47, 75-100.
- Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Ramussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L. y Voinnet O. (2008). Widespread translational inhibition by plants miRNAs and siRNAs. *Science.* 320, 1185-1190.
- Brown T. (2008). *Genoma. España.* Ed. Médica Panamericana. 760 p.
- Bryan G.W. (1976). Heavy metal contamination in the sea. En: Johnston, R. (ed) *Marine Pollution.* Academic Press, Londres. pp.185-302.
- Burlison B, Tice R.R., Speit G., Agurell E., Brendler-Schwaab S.Y., Collins A.R., Escobar P., Honma M., Kumaravel T.S., Nakajima M., Sasaki Y.F., Thybaud V., Uno Y., Vasquez M. y Hartmann A. (2007) Fourth international work group on genotoxicity testing: Results of the *in vivo* comet assay work group. *Mutat Res.* 627,31-35.
- Burnett R.T., Dales R.E., Brook J.R., Raizenne M.E. y Krewski D. (1997). Association between ambient carbon monoxide levels and hospitalizations of congestive heart failure in the elderly 10 Canadian cities. *Epidemiology.* 8, 162-167.
- Calderón-Garcidueñas L., Wen-Wang L., Zhang Y. J., Rodríguez-Alcaraz A., Osnaya N., Villareal-Calderón A. y Santella R. M. (1999). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ Health Perspect.* 107, 469-474.
- CEAM. (2007). *Diagnóstico y Vigilancia del Impacto por Vía Atmosférica de un Complejo Refinero en Extremadura.*
- Ceretti E., Zani C., Zerbini I., Viola G., Moretti M., Villarini M., Dominici L., Monarca S. y Feretti D. (2015). Monitoring of volatile and non-volatile urban air genotoxins using bacteria, human cells and plants. *Chemosphere.* 120, 221-229.
- Chauhan A.J., Inskip H.M., Linaker C.H., Smith S., Schreiber J., Johnston S.L. y Holgate S.T. (2003). Personal exposure to nitrogen dioxide and the severity of virus induced asthma in children. *LANCET.* 361, 1939-1944.

- Chen X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* 579, 5923-5931.
- Chen H., Goldberg M.S. y Villeneuve P.J. (2008). A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health.* 23, 243-297.
- Cherian S. y Oliveira, M. (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ Sci & Tech.* 39: 9377-9390.
- Clancy L., Goodman P., Sinclair H. y Dockery D.W. (2002). Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *LANCET.* 360, 1210-1214.
- Claxton L.D. y Woodall Jr. G.M. (2007). A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res.* 636, 36-94.
- Coava J.C. y Tovar U. (2009). Caracterización de compuestos orgánicos volátiles (COV's) por cromatografía de alta velocidad. Tesis, Escuela de Procesos y Energía, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Cobbet C. y Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol.* 53, 396-408.
- Collins A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 26, 249-261.
- Collins A. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta.* 1840, 794-800.
- DeMarini D. (2013). Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near road atmospheres: a review. *Mutagenesis.* 28, 485-505.
- Delgadillo-López A., González-Ramírez C.A., Prieto-García F., Villagómez-Ibarra J.R. y Acevedo-Sandoval O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 14, 597-612.
- Díaz-Barriga F., Carrizales L., Yáñez L., Hernández J.M., Domínguez M.C., Palmer E. y Saborio J.L. (1989). Interaction of cadmium with actin microfilaments *in vitro*. *Toxicol in Vitro.* 3, 277-284
- Dietz A.C. y Schnoor J.L. (2001). Advances in phytoremediation. *Environ Health Persp.* 109,163-168.

- Dugas D.V. y Bartel B. (2004). MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 7, 512-520.
- Emery J.F., Floyd S.K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N.P., Ozhaki A. Baum S.F. y Bowman J.L. (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol.* 13, 1768-1774.
- EPA (Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU.) (1991). Air quality criteria for carbon monoxide. National Center of Environmental Assessment Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.
- EPA (Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU.) (2000). Air quality criteria for carbon monoxide. National Center of Environmental Assessment Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. Research Triangle Park, NC. EPA 600/P-99/01F.
- Ercal N., Gurer-Orhan H. y Aykin-Burns N. (2001). Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Curr Top Med Chem.* 1, 529-539.
- ERS, European Respiratory Society. (2010). Air quality and Health. Lausanne, Suiza.
- Espinosa, F. J. y Sarukhán, J. (1997). Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Evans W. C. (2002). Trease & Evans Pharmacognosy. Elsevier, 15 th ed., 585 p.
- Fadeel B., Orrenius S. y Zhivotovsky B. (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun.* 266, 699-717.
- FairbRNA D.W., Olive P.L. y O'Neill. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 339, 37-59.
- Fernández A., Ternero M., Barragán F. y Jiménez J. (2000). An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation. *Chemosphere - Global Change Science.* 2, 123-136.
- Fielden M. R. y Zacharewski T. R. (2001). Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci.* 60, 6-10.
- Flores F., Martínez M.A., Arenas C., Covarrubias A. y Reyes J.L. (2007). ¡Silencio mensajeros! Qué Son y Cómo Actúan Los MicroRNAs. *REB.* 26, 135-141.

- Fortini P., Raspaglio G., Falchi M. y Dogliotti E. (1996). Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis*. 11, 169-175.
- García R. (2007). Determinación de metales pesados en la precipitación pluvial de una zona urbana (Ciudad de México) y de una zona rural (Rancho Viejo, Edo. de México). Tesis, Posgrado en Ciencias de la Tierra, UNAM.
- Gebhart E. y Rossman T.G. (1991). *Mutagenicity, Carcinogenicity, Teratogenicity*. VCH Verlagsgesellschaft, Wheinheim, 617-640.
- Georgieva M., Peychera E., Tashev A., Djingova R. y Miloshev G. (2011). Study of the effect of heavy metal pollution on the genome of plant species *Taraxacum officinale web. (Asteraceae)*: A preliminary. Metales pesados y plantas report. *Science & Technologies*. 1, 45-48.
- Gichner T., Ptacek O., Stareva D. y Plewa M. (1999). Comparison of DNA damage in Plants as Measured by Single Cell Gel Electrophoresis and Somatic Leaf Mutations Induced by Monofunctional Alkylating Agents. *Environl Mol Mutag*. 33, 279-286.
- Gichner T., Ptacek O., Stavreva D. A., Wagner E. D. y Plewa M. J. (2000). A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutat Res*. 470, 1-9.
- Gichner T., Stavrevá D. y Van Breusegem F. (2001). O-Phenyldiamine-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependent. *Mutat Res* 495, 117-125.
- Gichner T., Patková K. y Kim J. (2003). DNA damages measured by the comet assay in eight agronomic plants. *Biol Plantarum*. 47, 185-188.
- Gichner T., Patková K., Szaková J. y Demnerová K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat Res*. 559, 49-57.
- Gichner T., Patková Z., Szaková J. y Dmenrová K. (2006). Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*. 65, 420-426.
- Gichner T., Znidar I., Wagner E. y Plewa M. (2009). The use of Higher Plants in the Comet Assay, in issues in Toxicology n° 5 *The Comet Assay in Toxicology*, eds A. Dhawan and D. Anderson (London: Royal Society of Chemistry), 98-119.
- Grant W.F. (1994). The present status of higher bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res*. 310, 175-185.

- Grant W.F. (1998). Higher plant assays for the detection of genotoxicity in air-polluted environments. *Ecosyst Health*. 4, 210-229.
- Guimarães E.T., Domingos M., Alves E.S., Caldini Jr N., Lobo D.J.A., Lichtefels A.J. y Saldiva P.H. (2000). Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ Exp Bot*. 44, 1-8.
- Gustafsson L.E. y Cotgreave I. (1996). Ozone-induced toxicity in experimental animals and isolated cell system. *Scand. J. Work. Environ Health*. 22, 27-41.
- Hartwig A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*. 8, 3-11.
- Health Effects Institute. (2010). Traffic Related Air Pollution: A Critical Review of the Literature on Emissions, Exposure, and Health Effects, Special Report 17. Health Effects Institute, Boston, MA, USA.
- HEI. (2000). Reanalysis of the Harvard Six Cities Study and the American Cancer Society Study of Particulate Air Pollution and Mortality. Cambridge, MA: Health Effects Institute.
- Hoek G., Brunekreef B., Goldbohm S., Fischer P. y van den Brandt P.A. (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in The Netherlands; a cohort study. *LANCET*. 360, 1203-1209.
- Hossain Z. y Huq F. (2002). Studies in the interaction between Cd⁽²⁺⁾ ions and nucleobases and nucleotides. *J. Inorg. Biochem*. 90, 97-105.
- Houk V.S (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res*. 277, 91-138.
- Straif K., Cohen A. y Samet J. (2013). Air Pollution and Cancer. IARC Scientific Publication. 161.
- INE. (2007). Evaluación de impactos a la salud por contaminantes atmosféricos. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.
- INE. (2010). Manual 1. Principios de Medición de la Calidad del Aire. Primera Edición. Instituto Nacional de Ecología. México.
- INECC. (2011). Metales pesados. Tomado de <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>
- INE-SEMARNAT. (2006). Inventario Nacional de Emisiones de México [INEM, 1999] Instituto Nacional de Ecología- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, 377p.

- INEGI. (2007). Clasificación Mexicana de Actividades y Productos, Censos Económicos 2007. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 3ª reimpresión. México, D. F.
- International Labour Organization. (1999). CIS documents. Programme on Safety and Health at Work and the Environment (SAFEWORK). Tomado de www.ilo.org.
- IPCC. (2007). International Governmental Panel on Climate Change. Climate Change 2007. The Physical Science Basis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ito K. y Thurston G.D. (1996). Daily PM₁₀/mortality associations: an investigation of at risk subpopulations. *J Exposure Anal Environ Epidemiol.* 6, 79-95.
- Jacobson K.B. y Turner J.E. (1980). The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology.* 16, 1-37.
- Jagadeeswaran G., Saini A. y Sunkar R. (2009). Biotic and abiotic stress downregulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta.* 229, 1009-1014.
- Janssen N.A., Fischer P., Marra M., Ameling C. y Cassee F.R. (2013). Short-term effects of PM_{2.5}, PM₁₀ and PM_{2.5-10} on daily mortality in The Netherlands. *Sci Total Environ.* 463-464, 20-26.
- Jiang Z., Qin R., Zhang H., Zou J. y Wang J. (2014). Determination of Pb genotoxic effects in *Allium cepa* root cells by fluorescence probe, microtubular immunofluorescence and comet assay. *Plant Soil.* 383, 357-372.
- Johnston R.J. y Hobert O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 426, 845-849.
- Jovanović Z., Stanisavljević N., Mikić A. y Radović S. (2014). Water deficit downregulates miR398 and miR408 in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol Biochem.* 83, 26-31.
- Kabata-Pendias A. and Dudka S. (1991). Trace metal contents, *Taraxacum officinale* (dandelion) as a convenient environmental indicator. *Environ Geochem Health.* 13, 108-113.
- Kabata-Pendias A. y Pendias H. (1989). Trace elements in the soil and plants. CRC Press, Florida.
- Kangasjarvi J., Jaspers P. y Kollist H. (2005). Signaling and cell death in ozone exposed plants. *Plant Cell Environ.* 28, 1021-1036.

- Kantar M., Lucas S.J. y Budak H. (2011). miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta*. 233, 471-484.
- Kantar M., Unver T. y Budak H. (2010). Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Funct Integr Genomics*. 10, 493-507.
- Karmous I., Chaoui A., Jaouani K., Sheehan D., El Ferjani E., Scocciati V. y Crinelli R. (2014). Role of ubiquitin- proteasome pathway and some peptidases during seed germination and copper stress in bean cotyledons. *Plant Physiol Biochem*. 76, 77-85.
- Katsouyanni K., Touloumi G., Spix C., Schwartz J., Balducci F., Medina S., Rossi G., Wojtyniak B., Sunyer J., Bacharova L., Schouten J.P., Ponka A. y Anderson H.R. (1997). Short term effects of ambient Sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA2 project. *Epidemiology*. 12, 521-531.
- Kaur G., Singh H.P., Batish D.R. y Kohli R.K. (2014). Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involved DNA damage and disruption of oxidative metabolism. *Ecotoxicology*. 23, 1291-1304.
- Keane B., Collister M.H., Shan J.R. y Rogstad S.H. (2001). Metal content of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves in relation to soil contamination and airborne particulate matter. *Sci Total Environ*. 281, 63-78.
- Kelsall J.E., Samet J.M., Zeger S.L. y Xu J. (1997). Air pollution and mortality in Philadelphia, 1974-1988. *Am. J. Epidemiol*. 146, 750-762.
- Kim J.Y., Burnett R.T., Neas L., Thurston G.D., Schwartz J., Tolbert P.E., Brunekreef B., Goldberg M.S. y Romieu I. (2007). Panel discussion review: session two-interpretation of observed associations between multiple ambient air pollutants and health effect in epidemiological analyses. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 17, S83-S89.
- Komives T. y Gullner G. (2005). Phase I xenobiotic metabolic systems in plants. *Z Naturforsch*. 60,179-185.
- Kone B.C., Brenner R.M. y Gullans S.R. (1990). Sulfhydryl/reactive heavy metals increase cell membrane K⁺ and Ca²⁺ transport in renal proximal tubule. *J. Membrane Biol*. 113, 1-12.
- Koizumi T. y Waalkes M. P. (1990). Effects of zinc on the binding of cadmium to DNA: assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNAs. *Toxicol. In Vitro*. 4, 51-55.

- Kovalchuk I. y Kovalchuk Olga. (2008). Transgenic plants as sensors of environmental pollution genotoxicity. *Sensors*. 8, 1539-1558.
- Krupa, Z. (1999). Cadmium against higher plants photosynthesis- a variety of effects and where do they possible come from? *Z. Naturforsch. J. Biosci.* 54c, 723-729.
- Kumar R. (2014). Role of MicroRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Appl Biochem Biotech.* 174, 93- 115.
- Laden F., Neas L.M., Dockery D.W. y Schwartz J. (2000). Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ Health Perspect.* 108, 941-947.
- Lee R.C., Feinbaum R.L. y Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. *Cell.* 75, 843-854.
- Lee J.T., Kim H., Hong Y.C., Kwon H.J., Schwartz J. y Christiani D.C.(2000). Air pollution and daily mortality in seven major cities of Korea, 1991-1997. *Environ Res.* 84, 247-254.
- Leonard A. (1988). Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of *in vitro* approaches. *Mutat Res.* 198, 321-326.
- Lewtas J. (2007). Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res.* 636, 95-133.
- Ligocki M., Tarasewicz Z., Zygmunt A. y Anisko M. (2011). The common dandelion (*Taraxacum officinale*) as an indicator of anthropogenic toxic metal pollution of environment. *Acta Sci Pl Zootechnica.* 10, 73-82.
- Lim S.S., Vos T., Flaxman A.D., Danaei G., Shibuya K., Adair-Rohani H., Amann M., Anderson H.R., Andrews K.G., Aryee M., Atkinson C., Bacchus L.J., Bahalim A.N., Balakrishnan K., Balmes J., Barker-Collo S., Baxter A., Bell M.L., Blore J.D., Blyth F., Bonner C., Borges G., Bourne R., Boussinesq M., Brauer M., Brooks P., Bruce N.G., Brunekreef B., Bryan-Hancock C., Bucello C., Buchbinder R., Bull F., Burnett R.T., Byers T.E., Calabria B., Carapetis J., CRNAahan E., Chafe Z., Charlson F., Chen H., Chen J.S., Cheng A.T., Child J.C., Cohen A., Colson K.E., Cowie B.C., Darby S., Darling S., Davis A., Degenhardt L., Dentener F., Des Jarlais D.C., Devries K., Dherani M., Ding E.L., Dorsey E.R., Driscoll T., Edmond K., Ali S.E., Engell R.E., Erwin P.J., Fahimi S., Falder G., Farzadfar F., Ferrari A., Finucane M.M., Flaxman S., Fowkes F.G., Freedman G., Freeman M.K., Gakidou E., Ghosh S., Giovannucci E., Gmel G., Graham K., Grainger R., Grant

- B, Gunnell D., Gutierrez H.R., Hall W., Hoek H.W., Hogan A., Hosgood H.D. 3rd, Hoy D., Hu H., Hubbell B.J., Hutchings S.J., Ibeanusi S.E., Jacklyn G.L., Jasrasaria R., Jonas J.B., Kan H., Kanis J.A., Kassebaum N., Kawakami N., Khang Y.H., Khatibzadeh S., Khoo J.P., Kok C., Laden F., Lalloo R., Lan Q., Lathlean T., Leasher J.L., Leigh J., Li Y., Lin J.K., Lipshultz S.E., London S., Lozano R., Lu Y., Mak J., Malekzadeh R., Mallinger L., Marcenes W., March L., Marks R., Martin R., McGale P., McGrath J., Mehta S., Mensah G.A., Merriman T.R., Micha R., Michaud C., Mishra V., Mohd-Hanafiah K., Mokdad A.A., Morawska L., Mozaffarian D., Murphy T., Naghavi M., Neal B., Nelson P.K., Nolla J.M., Norman R., Olives C., Omer S.B., Orchard J., Osborne R., Ostro B., Page A., Pandey K.D., Parry C.D., Passmore E., Patra J., Pearce N., Pelizzari P.M., Petzold M., Phillips M.R., Pope D., Pope C.A. 3rd, Powles J., Rao M., Razavi H., Rehfuss E.A., Rehm J.T., Ritz B., Rivara F.P., Roberts T., Robinson C., Rodriguez-Portales J.A., Romieu I., Room R., Rosenfeld L.C., Roy A., Rushton L., Salomon J.A., Sampson U., Sanchez-Riera L., Sanman E., Sapkota A., Seedat S., Shi P., Shield K., Shivakoti R., Singh G.M., Sleet D.A., Smith E., Smith K.R., Stapelberg N.J., Steenland K., Stöckl H., Stovner L.J., Straif K., Straney L., Thurston G.D., Tran J.H., Van Dingenen R., van Donkelaar A., Veerman J.L., Vijayakumar L., Weintraub R., Weissman M.M., White R.A., Whiteford H., Wiersma S.T., Wilkinson J.D., Williams H.C., Williams W., Wilson N., Woolf A.D., Yip P., Zielinski J.M., Lopez A.D., Murray C.J., Ezzati M., Almazroa M.A. y Memish Z.A. (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *LANCET*. 380, 2224-2260.
- Linaker C.H, Coggon D., Holgate S.T., Clough J., Joseph L., Chauhan A.J. y Inskip H.M. (2000). Personal exposure to nitrogen dioxide and risk of airflow obstruction in asthmatic children with upper respiratory infection. *Thorax*. 55, 930-933.
- Loomis D., Grosse Y., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Brenbahim-Tallaa L., Guha N., Baan R., Matocock H. y Straif K. (2013). On behalf of the international agency of research cancer monograph working group IARC, Lyon, France. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol*. 14, 1262-1263.
- Mallory A.C., Bartel D.P. y Bartel B. (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor 17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*. 17, 1360-1375.
- Marr K., Fyles H. y Hendershot W. (1999). Trace metals in Montreal urban soils and leaves of *Taraxacum officinale*. *Canadian J Soil Sci*. 79, 385-387.

- McConnell R., Berhane K., Gililand F., London S.J., Vora H., Avol E., Gauderman W.J., Margolis H.G., Lurmann F., Thomas D.C. y Peters J.M. (1999). Air pollution and bronchitis symptoms in Southern California children with asthma. *Environ Health Perspect.* 107, 757-760.
- McConnell R., Berhane K., Gililand F., London S.J., Vora H., Avol E., Gauderman W.J., Margolis H.G., Lurmann F., Thomas D.C. y Peters J.M. (2003). Prospective study of air pollution and bronchitis symptoms in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 168, 790-860.
- Mehlhorn H. y Wellburn A.R. (1994). Main-induced causes of free radical damage to plants: O₃ and other gaseous pollutants. In Foyer C.H. and Mullineax P.M. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 155-175.
- Menke M., Angelis K.J. y Schubert I. (2000). Detection of specific DBNA lesions by a combination of comet assay and FISH in plants. *Environ Mol Mutagen.* 35, 132-138.
- Merk O. y Speit G. (1999). Detection of cross-links with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen.* 33, 167-172.
- Miller J.D., Arteca R.N. y Pell E.J. (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 1015-1024.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. y van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498.
- Moller P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96, 1-42.
- Morris R.D. y Naumova E.N. (1998). Carbon monoxide and hospital admissions for congestive heart failure: evidence of an increased effect at low temperatures. *Environ Health Perspect.* 106, 649-653.
- Narvaez-Porras O. y Cano-Valle F. (2004). Cenizas volcánicas. Contaminación ambiental. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 17, 232-238.
- Navarro Aviño J.P., Aguilar Alonso I. y López-Moya J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 2007/2.

- Nieminen A.L., Gores G.L., Herman B. y Lemasters J. (1990). Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 265, 2399-2408.
- NOM, 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SSA1-1993, "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al monóxido de carbono (CO). Valor permisible para la concentración de monóxido de carbono (CO) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación*, 23 de diciembre de 1994.
- NOM, 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-023-SSA1-1993. "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente respecto al bióxido de nitrógeno (NO₂). Valor normado para la concentración del bióxido de nitrógeno (NO₂) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación*, 23 de diciembre de 1994.
- NOM, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA1-2010. "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al dióxido de azufre (SO₂). Valor normado para la concentración de dióxido de azufre (SO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación*, 08 de septiembre del 2010.
- NOM, 2014. Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-2014, "Salud Ambiental. Valor límite permisible para la concentración de ozono (O₃) en el aire ambiente y criterios para su evaluación." *Diario Oficial de la Federación*, 19 de agosto del 2014.
- NOM, 2014. Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014. "Salud Ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM₁₀ y PM_{2.5} en el aire ambiente y criterios para su evaluación". *Diario Oficial de la Federación*, 20 de agosto del 2014.
- OMS. (2006). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. Actualización mundial 2005. Resumen de la evaluación de los riesgos. 25 pp.
- Oshima R.J. (1974). A viable system of biological indicator monitoring air pollutants. *Journal of the Air Pollution Control Association.* 24, 576-578.
- Östling O. y Johanson K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123, 291-298.
- Palatnik J.F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J.C. y Weigel D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature.* 425, 257-263.

- Pattenden S., Hoek G., Braun-Fahrländer C., Forastiere F., Kosheleva A., Neuberger M. y Fletcher T. (2006). NO₂ and children's respiratory symptoms in the PATY study. *Occup Environ Med.* 63, 828-835.
- Pereira B.B., Campos Junior E.O. y Morelli S. (2013). In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlandia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. *Ecotox Environ Saf.* 87, 17-22.
- Petrova S., Yurukova L. y Velcheva I. (2013). *Taraxacum officinale* as a biomonitor of metals and toxic elements (Plovdiv, Bulgaria). *Bulg J Agric Sci.* 19, 241-247.
- Piraino F., Aina R., Palin L., Prato N., Sgorbati S., Santagostino A. y Citterio S. (2006). Air biomonitoring: assesment of air pollution genotoxicity in the Province of Novara (North Italy) by using *Trifolium repens* L. and molecular markers. *Sci Tot Environ.* 372, 350-359.
- Poli P., Buschini A., Restivo F. M., Ficarelli A., Cassoni F., Ferrero I. y Rossi C. (1999). Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast test. *Mutagenesis.* 14, 547-555.
- Pope C.A. y Dockery D.W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 56, 709-742.
- PROAIRE. (2007). Programa para mejorar la calidad del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México 2002-2010. <http://www.sma.df.gob.mx/2008>. (Consultado el día 08 de julio del 2015).
- Pruski J.F. (2012). Compositae of Central America- I. The tussilaginoide genus *Robinsonecio* (*Senecionaeae*), microcharacters, generic delimitation, and exclusion of senecioid *Senecio cuchumatansensis*. *Phytoneuron* 2012-38: 1-8.
- Raaschou-Nielsen O., Andersen Z.J., Beelen R., Samoli E., Stafoggia M., Weinmayr G., Hoffmann B., Fischer P., Nieuwenhuijsen M.J., Brunekreef B., Xun W.W., Katsouyanni K., Dimakopoulou K., Sommar J., Forsberg B., Modig L., Oudin A., Oftedal B., Schwarze P.E., Nafstad P., De Faire U., Pedersen N.L., Ostenson C.G., Fratiglioni L., Penell J., Korek M., Pershagen G., Eriksen K.T., Sørensen M., Tjønneland A., Ellermann T., Eeftens M., Peeters P.H., Meliefste K., Wang M., Bueno-de-Mesquita B., Key T.J., de Hoogh K., Concini H., Nagel G., Vilier A., Gironi S., Krogh V., Tsai M.Y., Ricceri F., Sacerdote C., Galassi C., Migliore E., Ranzi A., Cesaroni G., Badaloni C., Forastiere F., Tamayo I., Amiano P., Dorronsoro M., Trichopoulou A., Bamia C., Vineis P. y Hoek G. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European

- Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14, 813-822.
- Rajput M. y Agrawal M. (2005). Biomonitoring air pollution in a seasonally dry tropical suburban area using wheat transplants. *Environ Monit Assess.* 101, 39-53.
- Rzedowski, G. C. (1997). Compositae. Tribu Tageteae. En: Rzedowski, G. C. y Rzedowski, J. (eds.) *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 113.* Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Rzedowski, G. C. and Rzedowski J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México.* 2ª ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Restivo F.M, Laccone M.C., Buschini A., Rossi C. y Poli P. (2002). Indoor and outdoor genotoxic load detected by the Comet assay in leaves of *Nicotiana tabacum* cultivars Bel B and Bel W3. *Mutagenesis.* 17, 127-134.
- Rodrigues G.S., Ma T.H., Pimentel D. y Weinstein L.H. (1997). *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 16, 325-359.
- Rojas E., Herrera L. A., Poirier L. A. y Ostrosky-Wegman P. (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res.* 443, 157-181.
- Ruston A.G. (1921). The plant as an index of smoke pollution. *Annals of Applied Biology.* 7, 390-403.
- Santos C.L.V., Pourrut B. y Ferrera de Oliveira J.M.P. (2015). The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Front Genet.* 6,216.
- Salas S. (2011). Evaluación de la genotoxicidad del arsénico, níquel y cadmio en la raíz de *Vicia faba* empleando la electroforesis unicelular y los marcadores moleculares para Caspasa-3 y ERK. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. y Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplifier location of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239,487-491.
- Samoli E., Aga E., Touloumi G., Nisiotis K., Forsberg B., Lefranc A., Pekkanen J., Wojtyniak B., Schindler C., Niciu E., Brunstein R., Dodic Fikfak M., Schwartz J. y Katsouyanni K.(2006). Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Eur Respir J.* 27, 1129-1137.

- Samet J.M., Dominici F., Curiero F.C., Coursac I. y Zeger S.L. (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities 1987-1994. *N Engl J Med.* 343, 1742-1749.
- Schaaper R.M., Koplitz R.M., Tkeshelashvili L.K. y Loeb L.A. (1987). Metal- induced lethality and mutagenesis: possible role of apurinic intermediates. *Mutat Res.* 177, 179-188.
- Scheiner B., Doyle F. y Kamatra S. (1989). *Biotechnology in Minerals and Metal processing.* Society of Minion Engineers. Inc., Littleton. 209.
- Schlüter T., Berg I., Dörger M. y Gercken G. (1995). Effect of heavy metal ions on the release of reactive oxygen intermediates by bovine alveolar macrophages. *Toxicology.* 98, 47-55.
- Schwartz J. (1999). Air pollution and hospital admissions for heart disease in eight U.S. counties. *Epidemiology.* 10, 17-22.
- Schwartz J. y Morris R. (1995). Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am J Epidemiol.* 142, 23-35.
- Schwarze P.E., Ovrevik J., Lag M., Refsnes M., Nafstad P., Hetland R.P. y Dybing E. (2006). Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol.* 25, 559-579.
- SEDEMA. (2012). *Inventario de Emisiones de Contaminantes y de Efecto Invernadero. Primera Edición 2013.* México, D.F. 175. Tomado de www.sedema.df.gob.mx/inventario_emisiones/
- SEMARNAT. (2012). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental.* México, D.F.
- Shah A.S., Langrish J.P., Nair H., McAllister D.A., Hunter A.L., Donaldson K., Newby D.E. y Mills N.L. (2013). Global association of air pollution and hearth failure: a systematic review and meta-analysis. *LANCET.* 382, 1039-1048.
- Sharma Y.K., Leon J., Raskin I. y Davis K.R. (1996). Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *PNAS.* 93, 5099-5104.
- Sheppard L., Levy D., Norris G., Larson T.V. y Koenig J.Q. (1999). Effects of ambient air pollution on nonelderly asthma hospital admissions in Seattle, Washington, 1987-1994. *Epidemiology.* 10, 23-30.
- Shima M. y Adachi M. (2000). Effect of outdoor and indoor nitrogen dioxide on respiratory symptoms in schoolchildren. *Int J Epidemiol.* 29, 862-870.

- Sills R.C., Hong H.L., Greenwell A., Herbert R.A., Boorman G.A. y Devereaux T.R. (1995). Increased frequency of K-ras mutations in lung neoplasms from female B6C3F1 mice exposed to ozone for 24 or 30 months. *Carcinogenesis*. 16, 1623-1628.
- Silva, R.A., West J.J., Zhang Y., Anenberg S.C., Lamarque J.F., Shindell D.T., Collins W.J., Dalsoren S., Faluvegi G., Folberth G., Horowitz L.W., Nagashima T., Naik V., Rumbold S., Skeie R., Sudo K., Takemura T., Bergmann D., Cameron-Smith P., Cionni I., Doherty R.M., Eyring V., Josse B., MacKenzie I.A., Plummer D., Righi M., Stevenson D.G., Strode S., Szopa S. y Zeng G. (2013). Global premature mortality due to the anthropogenic outdoor air pollution and the contribution of the past climate change. *Environ Res Lett*. 8, 11 p.
- Silva S., Pinto-CRNAide O., Martins-Lopes P. , Matos M., Guedes-Pinto H. y Santos C. (2010). Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. *Environ Exp Bot*. 68, 91-98.
- Simpson J.A., Cheeseman K.H., Smith S.E. y Dean R.T. (1988). Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide. *Biochem. J*. 254, 519-523.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175, 184-191.
- Smith M.W., Ambudkar I.S., Phelps P.C., Regec A.L. y Trump B.F. (1987). HgCl₂-induced changes in cytosolic Ca²⁺ of cultures rabbit renal tubular cells. *Biochem Biophys Acta*. 931, 130-142.
- Stahl R.G. Jr. (1997). Can mammalian and non-mammalian sentinel species data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants. *Hum Ecol Risk Assess*. 3, 329-335.
- Sternbeck J., Sjödin A. y Andreasson K. (2002). Metal emissions from road traffic and the influence of re-suspension - results from two tunnel studies. *Atmos Environ*. 36, 4735-4744.
- Sunkar R. y Zhu J.K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16, 2001-2019.
- Sunkar R., Kapoor A. y Zhu J.K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miRNA398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*. 18, 2051-2065.

- Sunyer J., Ballester F., Tertre A.L., Atkinson R., Ayres J.G., Forastiere F., Forsberg B., Vonk J.M., Bisanti L., Tenías J.M., Medina S., Schwartz J. y Katsouyanni K. (2003). The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital admissions for cardiovascular diseases in Europe (The APHEA- II Study). *European Heart Journal*. 24, 752-760.
- Tai H.H., Percy K. E. y KRNAosky D. F. (2010). DNA damage in *Populus tremuloides* clones exposed to elevated O₃. *Environ Pollut*. 158, 969-976.
- Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2, 70-78.
- Tajmir-Riahi H.A., Naoui M. y Ahmad R. (1993). The effects of Cu²⁺ and Pb²⁺ on the solution structure of calf thymus DNA: DNA condensation and denaturation studied by Fourier Transform IR difference spectroscopy. *Biopolymers*. 33, 1819-1827.
- Tice R.R. (1995). The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in: Phillips D.H., Venitt S. (Eds.), *Environmental Mutagenesis*, BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp. 315-339.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. y Sasaki Y.F. (2000). The single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 35, 206-211.
- Trindade I., Capita C., Dalmay T., Fevereiro M.P. y Santos M.D. (2010). miRNA398 and miRNA408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*. 231, 705-716.
- Tuteja N., Ahmad P., Panda B.B. y Tuteja R. (2009). Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage repair and DNA repair helicases. *Mutat Res*. 681, 134-149.
- Unver T., Bakar M., Shearman R.C. y Budak H. (2010). Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in responses to foliar glyphosate application. *Mol Genet Genomics*. 283, 397-413.
- Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Waliszewski S., Fernández S, y Villalobos-Pietrini R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Rev Int Contam Ambie*. 29, 133-157.
- Valavanidis A., Fiotakis K. y Vlachogianni T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance size and

- composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol. Rev.* 26, 339-362.
- Valverde M., Fortoul T. I., Díaz-Barriga F., Mejía J. y Rojas E. (2000). Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis.* 15, 109-114.
- Valverde M., Trejo C. y Rojas E. (2001). Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis.* 16, 265-270.
- Vandenabeele S., Van Der Kelen K., Dat J., Gadjev I., Boonefaes T., Morsa S., Rottiers P., Slooten L., Van Montagu M., Zabeau M., Inze D. y Van Breusegem F. (2003). A comprehensive analysis of Hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 100, 16113-16118.
- Van der Schalie W.H., Gardner H.S. Jr., Bantle J.A., De Rosa C.T. y Finch R.A. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ Health Perspect.* 107, 309-315.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crété P. y Bartel D.P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* 18, 1187-1197.
- Ventura L., Giovannini A., Savio M., Doná M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D. y Balestrazzi A. (2013). Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere.* 92, 1-9.
- Victorin K. (1992). Review of the genotoxicity of ozone. *Mutat Res.* 277, 221-238.
- Villiers F., Ducruix C., Hugouvieux V., JRNAo N., Ezan E., Garin J., Junot C. y Bourgiugnon J. (2011). Investigating the plant response to Cd exposure by proteomic and metabolomics approaches. *Proteomics.* 11, 1650-1663.
- Wang L., Yang L, Yang F., Li X., Song Y., Wang X. y Hu X. (2010). Involvement of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. *J Plant Physiol.* 167, 1298-1306.
- Wang T., Chen L., Zhao M., Tian Q. y Zhang W.H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high throughput sequencing. *BMC Genomics.* 12, 367.

- Weinstein L.H., Laurence J.A., Mandi R.H. y Walti, K. (1990). Use of Native and Cultivated Plants as Bioindicators and Biomonitors of Pollution Damage. Plants for Toxicity Assesment, ASTM STP 1091. W. Wang, J.W. Gonsuch y W. R. Lower, Eds. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 117-126.
- WHO. (2003). Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide, Report on WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15 January 2003.
- WHO. (2005). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. Resumen de evaluación de riesgos. Actualización mundial.
- Wong C.M., Atkinson R.W., Anderson H.R., Johnson A. , Ma S., Yuen-Kwan P. y Lam T.H. (2002). A tale of two cities: effects of air pollution on hospital admission in Hong Kong and London compared. Environ Health Perspect. 110, 67-77.
- Yang W., Jennison B.L. y Omaye S.T. (1998). Cardiovascular disease hospitalization and ambient levels of carbon monoxide. J. Toxicol. Environ. Health. Part A. 55, 185-196.
- Zhang B.H., Pan X.P., Cobb G.P. y Anderson T.A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with a big impact. Dev Biol. 7, 203-214.
- Zhu Ch., Ding Y. y Liu H. (2011). MiR398 and plant stress responses. Physiol Plant. 143, 1-9.

12. Figuras y tablas

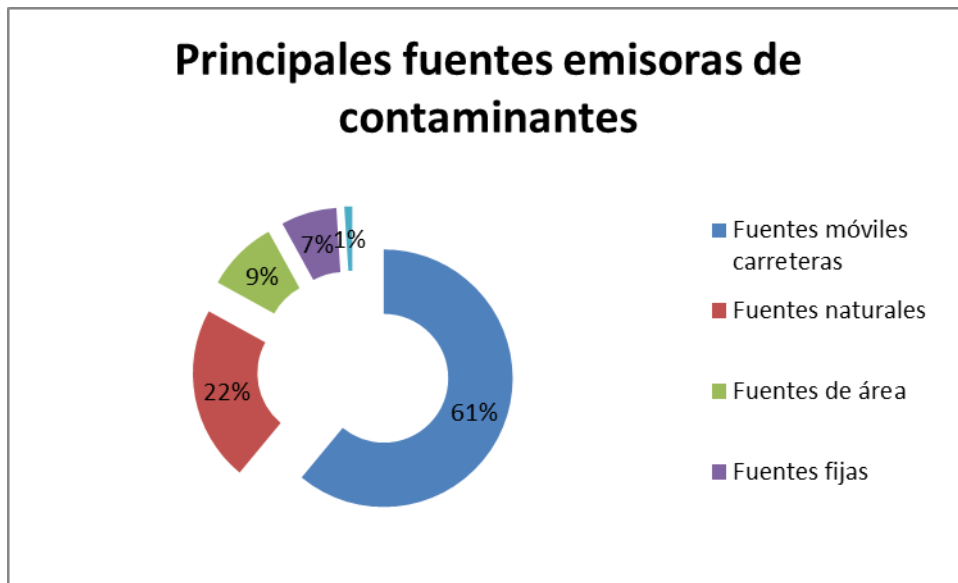


Figura 1. Fuentes emisoras de gases atmosféricos contaminantes en la ZMVM (Tomado de: Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

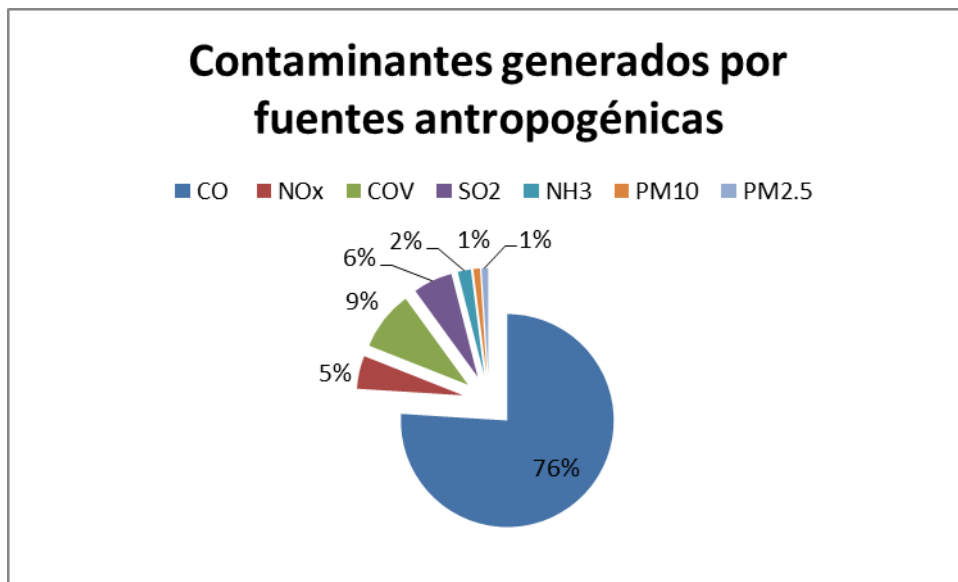


Figura 2. Contaminantes emitidos por fuentes antropogénicas en la ZMVM (Tomado de :Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

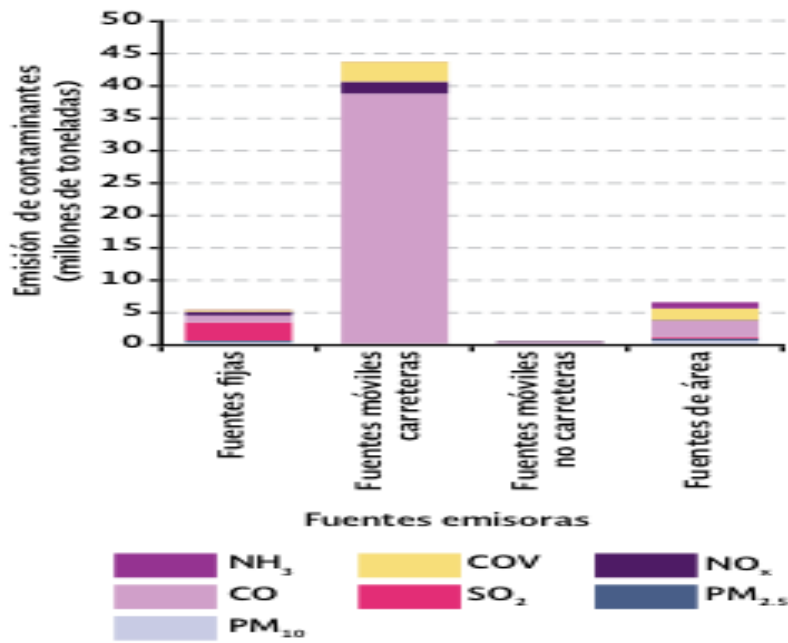


Figura 3. Emisión de contaminantes por fuente y tipo en la ZMVM. (Tomado de: SEMARNAT. Inventario Nacional de Emisiones de México 2005. México, 2012.)

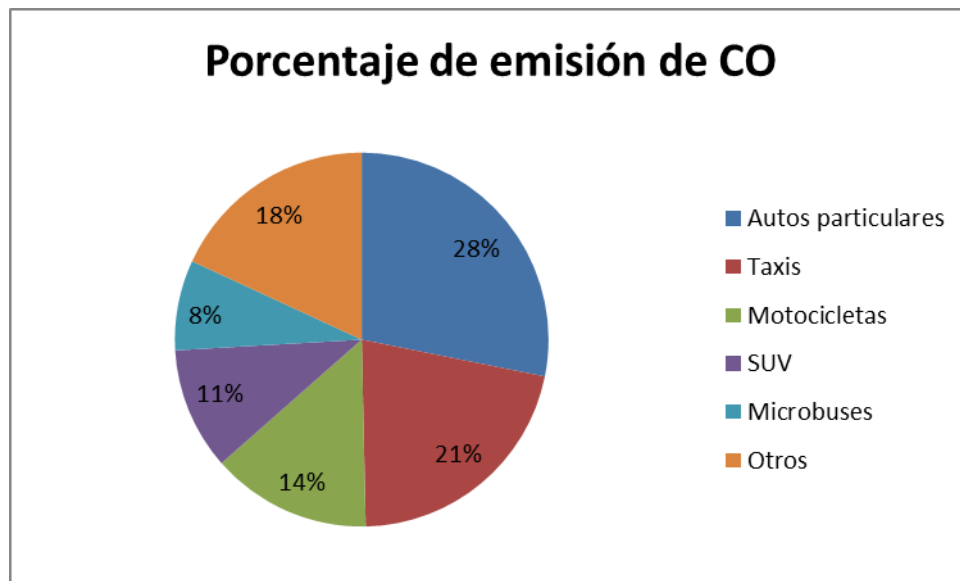


Figura 4. Emisión de monóxido de carbono (CO) por fuente en la ZMVM (Tomado de: Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

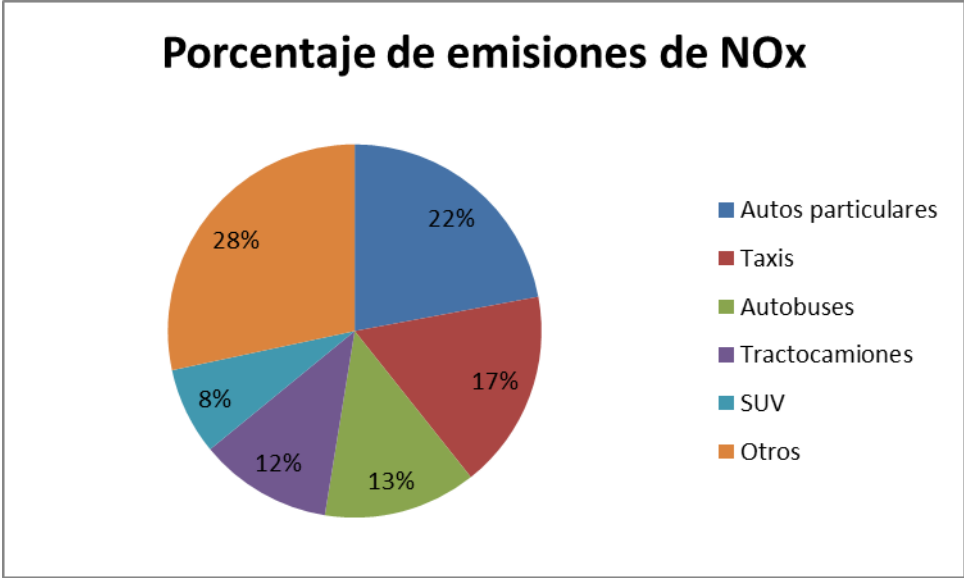


Figura 5. Emisión de óxidos de nitrógenos (NOx) por fuente en la ZMVM (Tomado de: Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

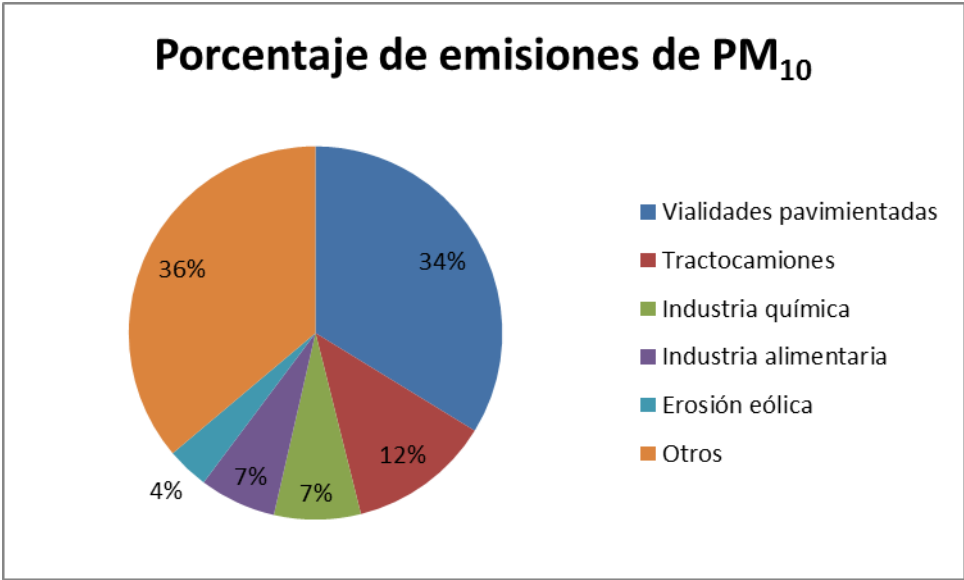


Figura 6. Emisiones de material particulado de 10µm (PM₁₀) por fuente de origen en la ZMVM(Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

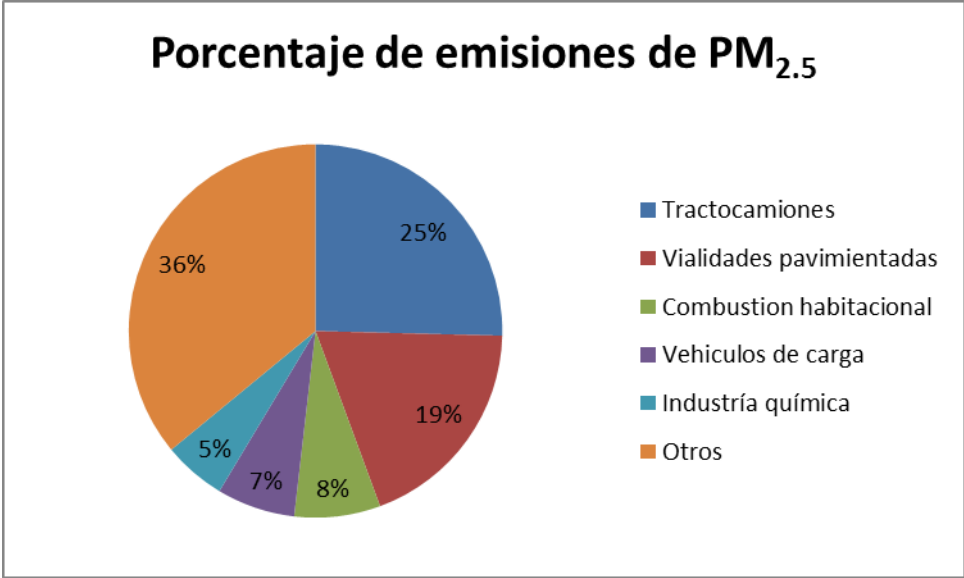


Figura 7. Emisiones de material particulado de 2.5µm (PM_{2.5}) por fuente de origen en la ZMVM (Tomado de: Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

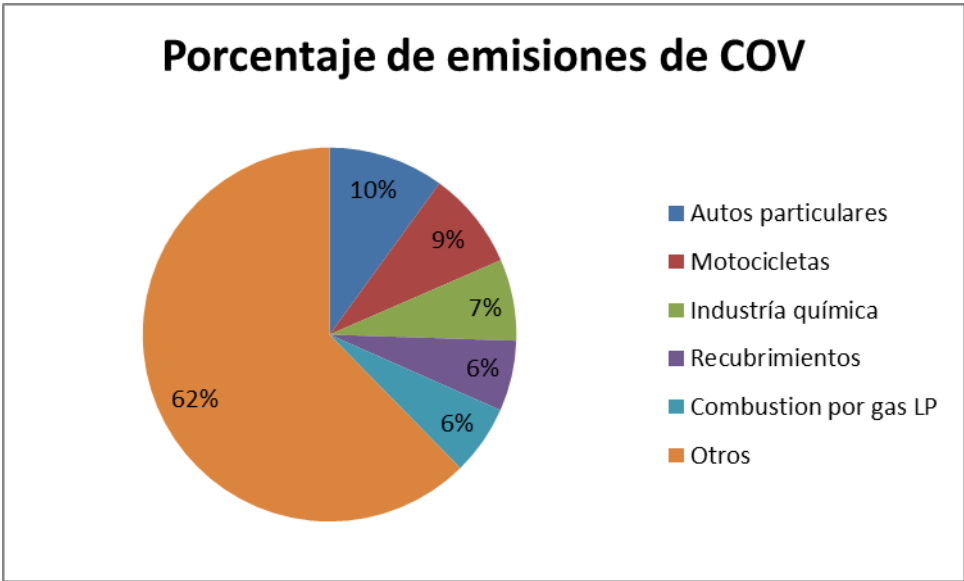


Figura 8. Emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV) por fuente de origen en la ZMVM (Tomado de: Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero, 2012).

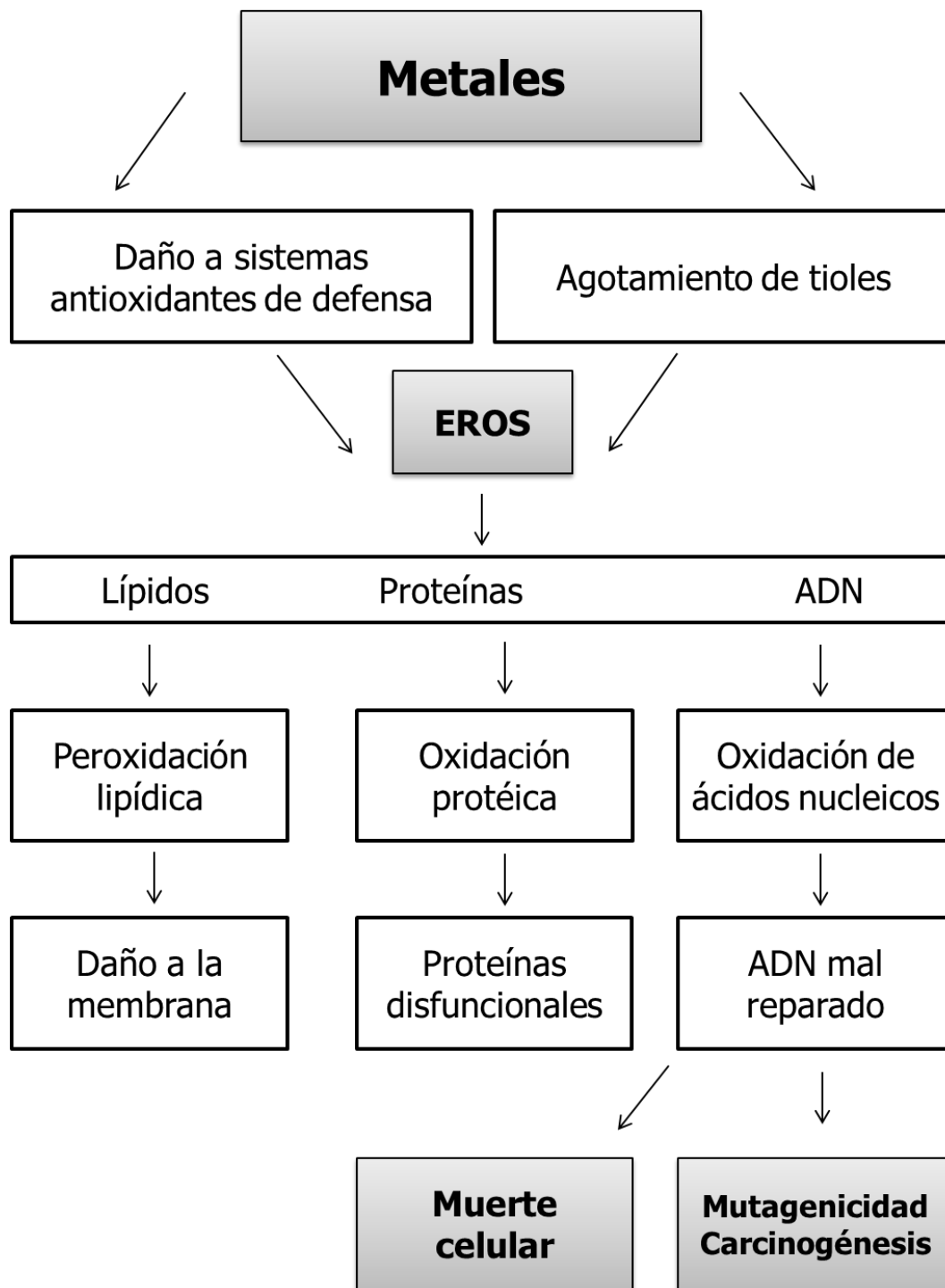


Figura 9. Posibles mecanismos de inducción de estrés oxidante por metales pesados (Modificado de Ercal *et al.*, 2001)



Figura 10. A) *T. officinale* y B) *R. gerberifolius*

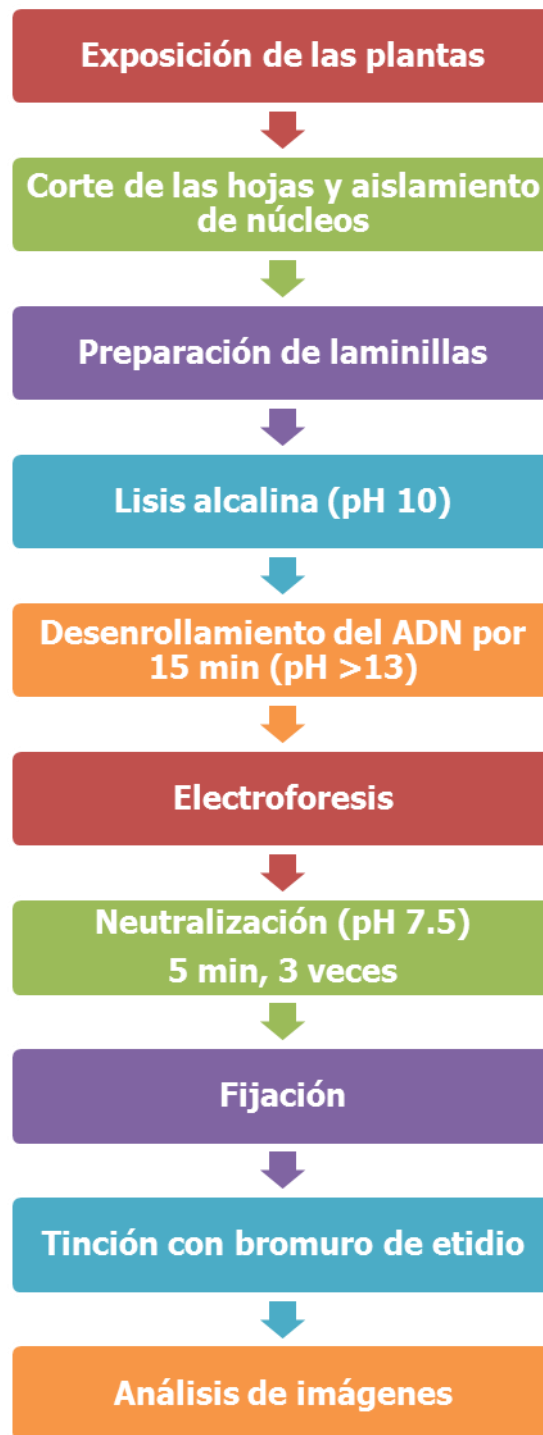


Figura 11. Esquema de la metodología general del ensayo cometa alcalino.

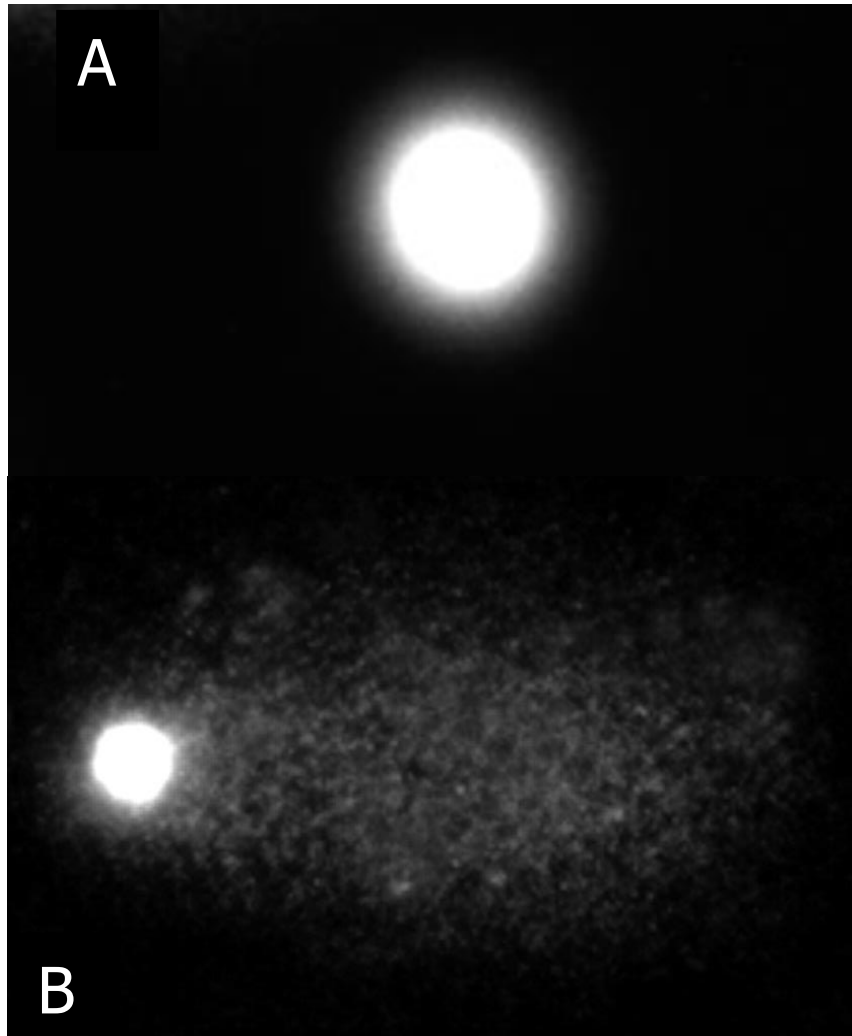


Figura 12. Fotografías de núcleos obtenidos por el ensayo cometa. A) Núcleo intacto y B) Núcleo dañado después de la exposición a contaminantes atmosféricos.

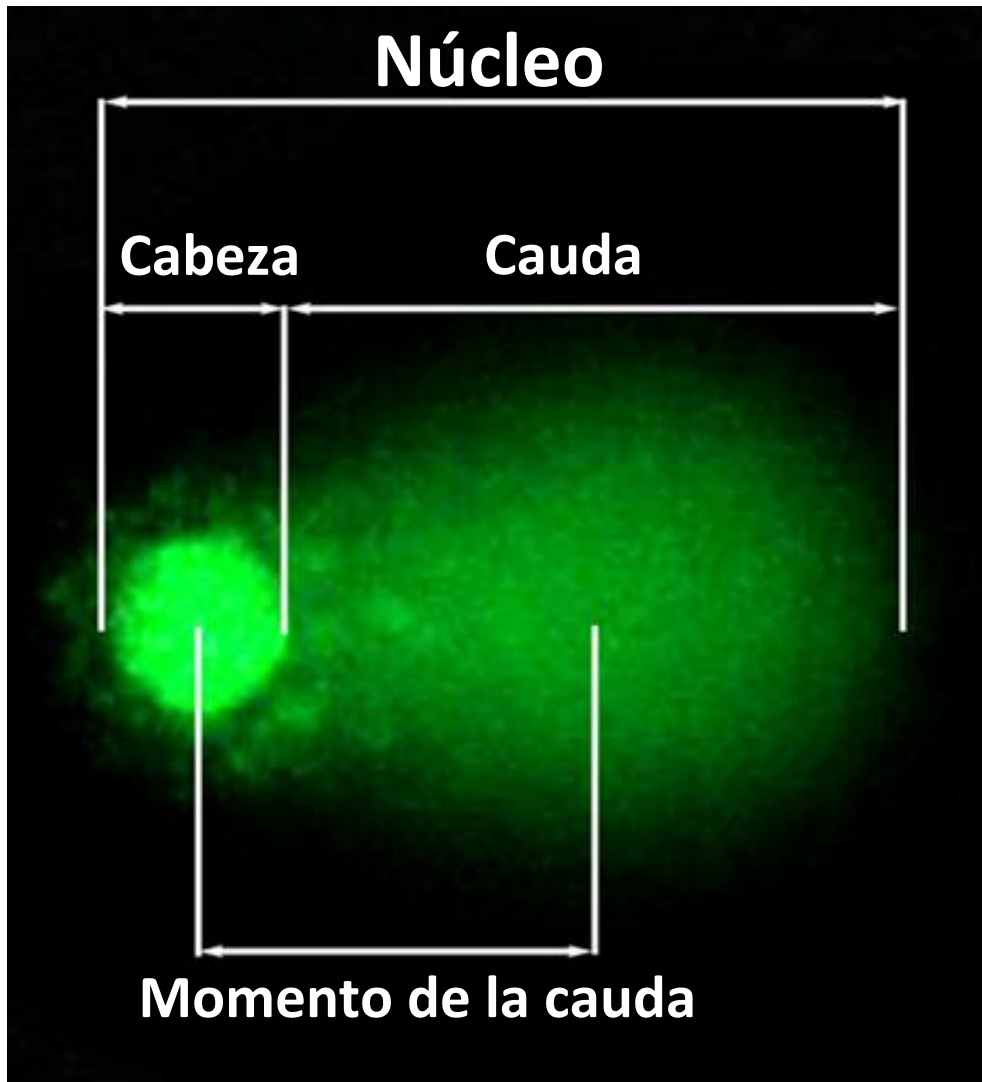


Figura 13. Partes del "cometa" visto en un programa de medición. (Modificada de Cell Biolabs Inc.)

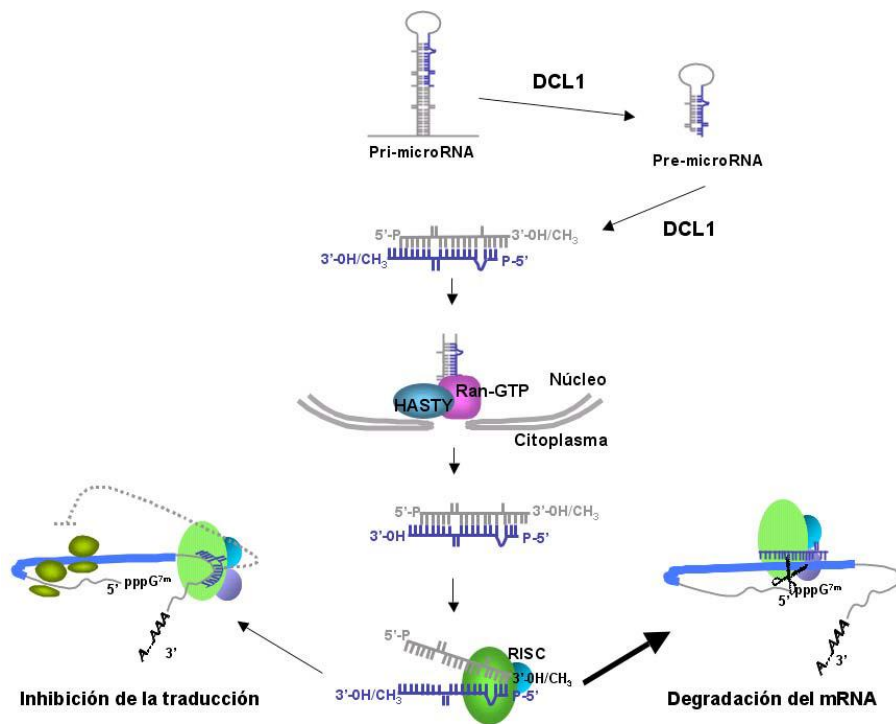


Figura 14. Biogénesis de miRNAs en plantas. (Tomada de Flores *et al.*, 2007)

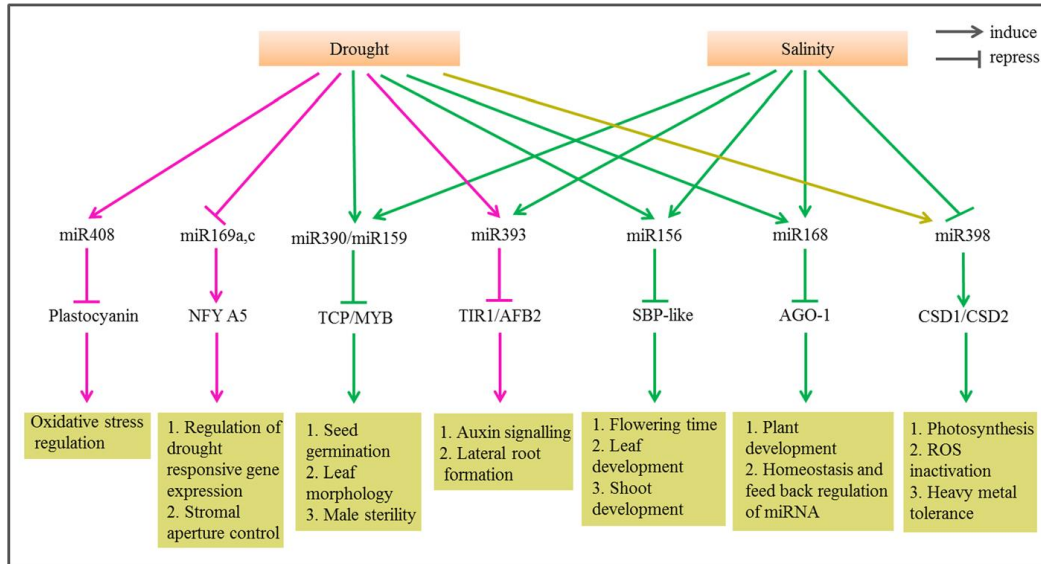


Figura 15. Respuestas a estrés por agentes químicos o por salinidad de *A. thaliana* (verde), *M. truncatula* (amarillo) o ambas (rosa) (Tomado de Kumar, 2014).



Figura 16. Cámara de crecimiento para los grupos testigo.

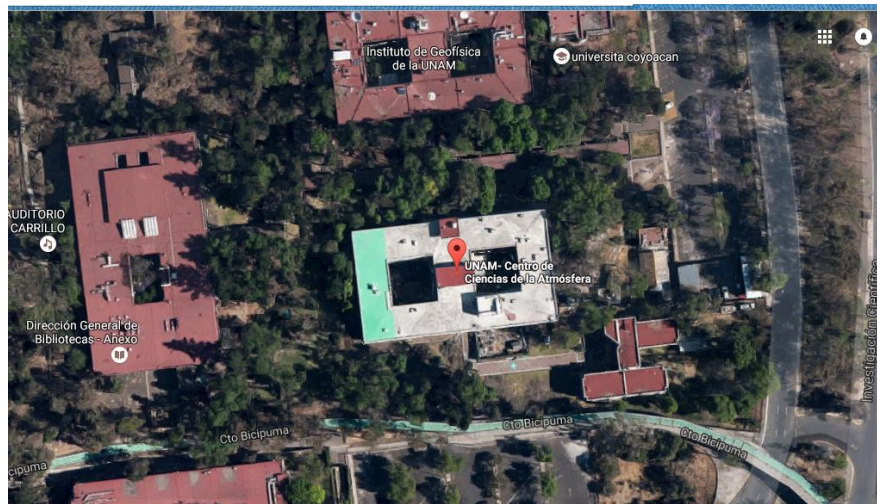


Figura 17. Ubicación del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM (Tomado de Google Maps).



Figura 18. Ubicación Observatorio Atmosférico Altzomoni, UNAM (Tomado de Google Maps).



Figura 19. Observatorio Atmosférico Altzomoni, Edo. de Mex.

Genotoxicidad inducida en *T. officinale*

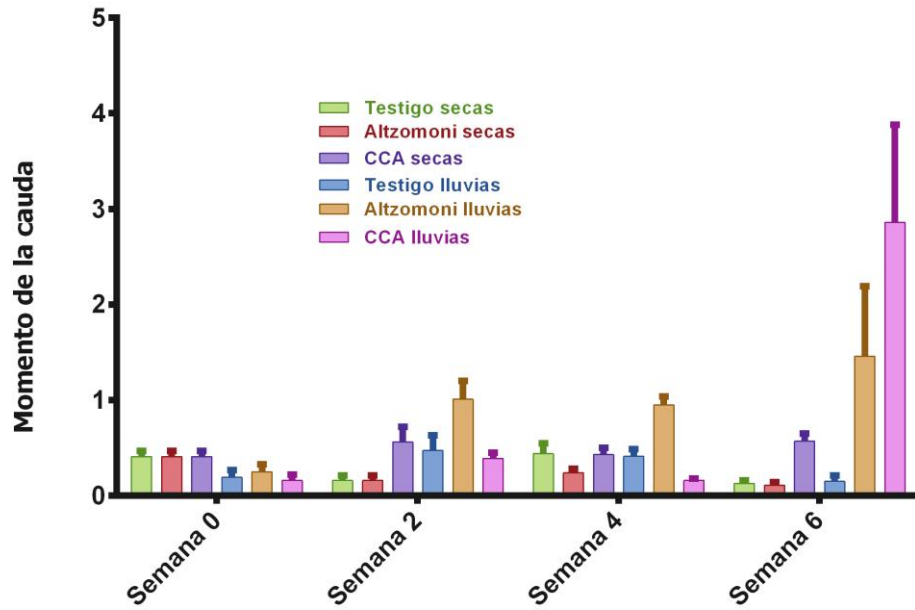


Figura 20. Daño genotóxico encontrado en *T. officinale* expuesta en temporadas de secas y lluvias 2015.

Genotoxicidad inducida en *R. gerberifolius*

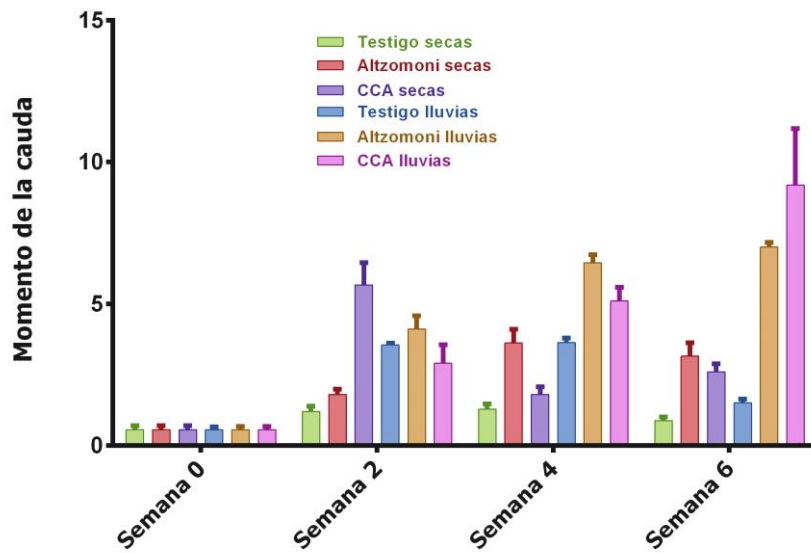


Figura 21. Daño genotóxico encontrado en *R. gerberifolius* expuesta en temporadas de secas y lluvias 2015.

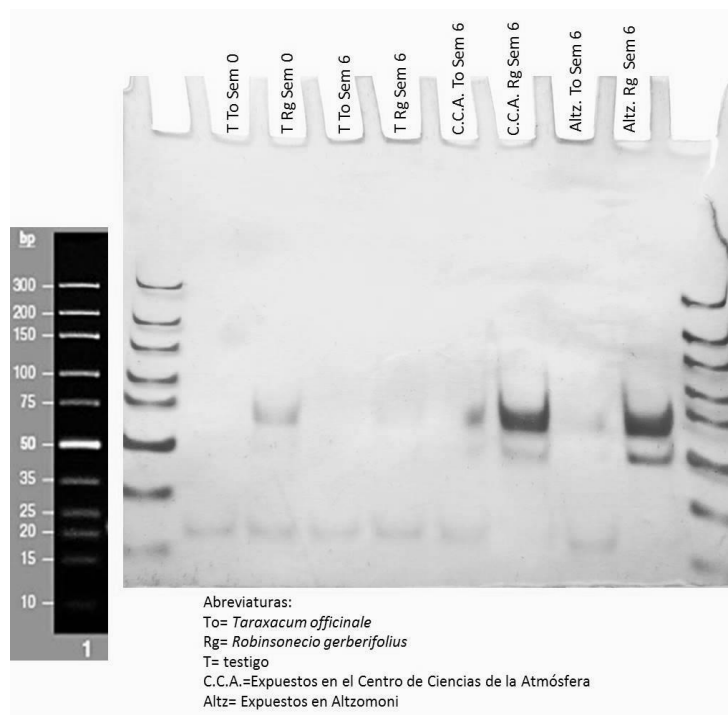


Figura 22. Revelado de productos de PCR (miR398) en *Taraxacum officinale* (To) y *Robinsonecio gerberifolius* (Rg) expuestas en la temporada de secas 2015.

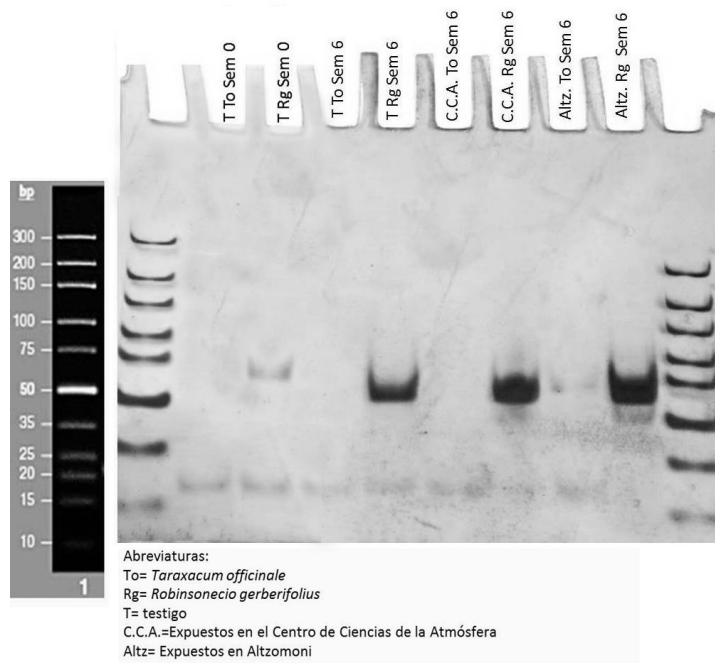


Figura 23. Revelado de productos de PCR (miR398) en *Taraxacum officinale* (To) y *Robinsonecio gerberifolius* (Rg) expuestas en la temporada de lluvias 2015.

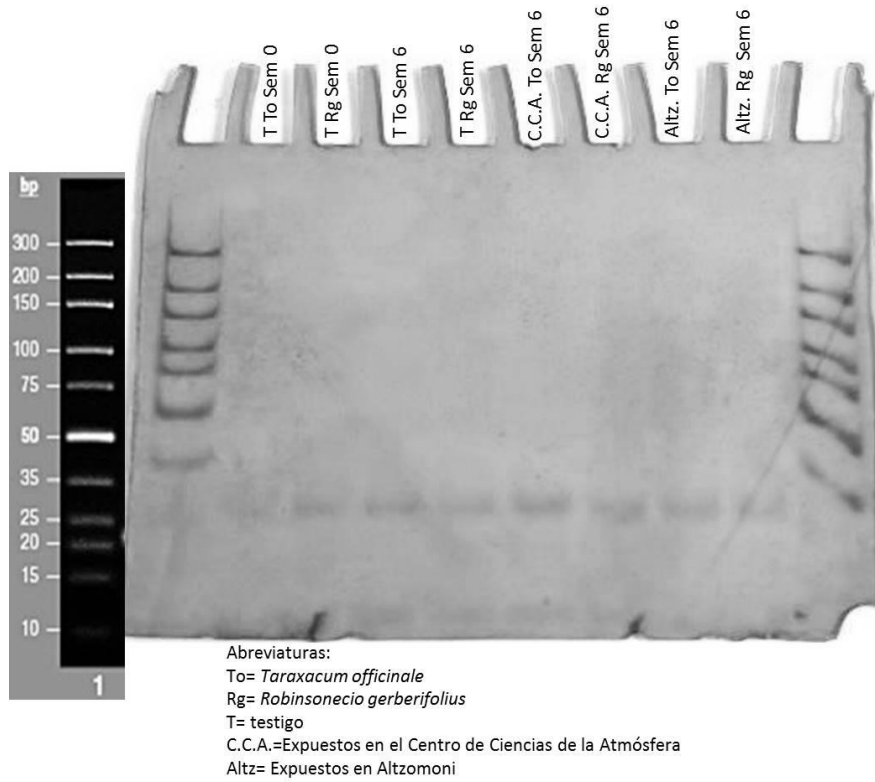


Figura 24. Corrimiento de PCR del gen constitutivo U6 en *Taraxacum officinale* (To) y *Robinsonecio gerberifolius* (Rg),

Tabla I. Contaminantes monitoreados por Espectroscopia FTIR de Alta Resolución por absorción solar durante la temporada de secas y lluvias 2015 en el Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA) y Altzomoni (ALT).

Semana	Sitio	^a CO ₂		^a CH ₄		^a CO		^b NO		^b NO ₂		^b NO _x		^c O ₃		^c SO ₂		^d PM _{2.5}		^d PM ₁₀		^e UVA		^e UVB	
		LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S	LI	S
0	CCA	409.95	420.66	1.99	1.94	0.73	0.65	13.13	12.00	25.66	21.21	39.74	36.17	28.03	32.98	2.88	3.17	15.43	18.39	36.60	52.94	1.25	1.43	0.72	0.76
	ALT	391.03	395.40	1.83	1.84	0.08	0.16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	CCA	411.32	415.53	2.02	1.93	0.64	0.63	12.49	13.04	22.25	21.75	34.73	34.79	20.92	27.37	4.90	2.12	13.57	15.03	33.76	38.37	1.15	1.36	0.68	0.79
	ALT	389.90	395.10	1.86	1.83	0.10	0.13	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	CCA	413.85	419.02	2.02	1.99	0.76	0.54	15.36	9.94	27.78	22.44	43.11	32.38	26.81	36.45	4.96	2.09	19.03	15.64	44.58	42.84	1.16	1.53	0.63	0.85
	ALT	400.81	394.95	1.85	1.84	0.10	0.17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	CCA	424.23	418.31	2.09	1.10	0.86	0.62	23.01	12.62	29.90	24.54	52.90	37.14	19.43	33.73	7.50	2.74	19.73	20.72	51.32	46.55	0.96	1.44	0.51	0.84
	ALT	395.29	394.40	1.87	1.85	0.11	0.17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

a=ppm, b=ppb, c=µg/m³, d=w/m²
 LI= lluvias, S= secas
 --- Datos no registrados

Tabla II. Metales pesados analizados por espectrofotometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente en las hojas de *T. officinale* durante la temporada de secas y lluvias 2015 a seis semanas de exposición.

Semana	Mn		Fe		Cu		Zn		Mo		V		Cr		Co		Cd		Sb		Pb	
	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
L.D. [µg/L]	0.061	0.061	0.25	0.25	0.03	0.03	0.18	0.18	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.002	0.002	0	0	0.01	0.01	0.02	0.02
T	19.33	84.64	68.90	29.12	5.78	8.89	36.34	18.13	1.15	1.46	179.51	78.73	466.97	139.10	39.29	39.35	96.36	39.60	37.32	3.99	554.12	557.51
CCA	51.19	49.59	102.92	81.15	5.22	5.22	16.84	13.81	0.44	0.69	560.52	315.13	314.47	302.59	109.77	123.46	56.15	73.07	28.82	22.08	508.09	533.18
Altz	529.73	112.77	202.89	93.51	13.99	5.65	0.06	55.43	3.10	1.83	495.32	274.09	526.94	152.06	247.65	192.72	518.34	133.66	176.89	5.35	808.46	175.15