



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inducción de muerte celular programada en *Gnaphalium
lavandulifolium* por contaminantes ambientales de la
Zona Metropolitana del Valle de México**

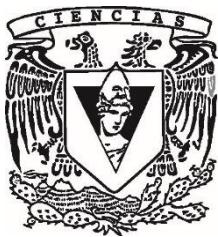
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PABLO ANTONIO MÉRIDA CORTÉS



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA
CIUDAD DE MÉXICO, 2020



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
Mérida
Cortés
Pablo Antonio
5518560012
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311211546
2. Datos del Tutor
Dra.
Josefina
Cortés
Eslava
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Sandra Luz
Gómez
Arroyo
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Pedro Rafael
Valencia
Quintana
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Ana Rosa
Flores
Márquez
7. Datos del trabajo escrito
Inducción de muerte celular programada en *Gnaphalium lavandulifolium* por
contaminantes ambientales de la Zona Metropolitana del Valle de México.
54 p.
2020

Agradecimientos

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica PAPIIT-DGAPA, UNAM, por la beca por dos periodos para la obtención del título de Biólogo, participando en el proyecto: "Biomonitoreo de la calidad del aire en la Ciudad de México mediante el análisis de muerte celular programada, utilizando plantas silvestres y su posible aplicación como organismos centinela".

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por brindarme su apoyo y recibirme con los brazos abiertos desde el comienzo, por apoyarme en este proyecto, por su paciencia, tiempo y conocimientos, también por darme la confianza y recursos para la realización de esta investigación.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por todo su apoyo, por considerarme dentro de sus proyectos, por la confianza que deposito en mí. Le expreso mi admiración por escuchar a cada uno de sus alumnos y por defendernos siempre.

Al Dr. Michel Grutter de la Mora y su grupo de trabajo por facilitar el espacio en la estación meteorológica Altzomoni para la exposición de plantas.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García Jefe del laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por facilitar el espacio y equipo para el procesamiento de las muestras para el análisis morfológico, por microscopia óptica, y electrónica de transferencia.

A la Dra. Reyna Lara Martínez: del laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su apoyo en el procesamiento de las muestras para el análisis morfológico, por microscopia electrónica de transferencia y su experiencia en el análisis inmunocitoquímico.

Al Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana: por su tiempo y sus valiosos aportes en la revisión de este proyecto.

A la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez: Muchas gracias por el valioso tiempo en la revisión de este proyecto, por enseñarnos lo valioso de la minuciosidad en cada experimento y por las risas en el laboratorio.

A la M. en C. Elizabeth Hernández Álvarez por su apoyo analítico en la determinación de elementos traza por ICP-MS, Instituto de Geofísica, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatoria

A mi madre Nery Cortés: Gracias por todo tu apoyo, por tu amor, por desvelarte conmigo, por darme absolutamente todo lo mejor aún sin saber cómo, estoy orgulloso de tener a la mejor amiga, confidente, pero sobre todo a la mejor madre del mundo, sabes que siempre vas a poder contar conmigo en todo lo que sea, eres mi motor y mi vida entera. ¡¡Este logro también es tuyo, TE AMOOO MAMÁ!!

A mi hermanita Alinne: Cuando llegaste, supe que tenía que cambiar mi vida por completo pues ahora tengo una responsabilidad contigo y espero poder ser un ejemplo para ti. Eres el principal motivo de que yo siga adelante, de no dejarme caer y de superarme siempre, espero de todo corazón demostrarte que, si yo pude hacerlo, tú lo vas a lograr también. Cuenta conmigo siempre.

A mi padre Pablo M: Te agradezco el tiempo, el apoyo y la paciencia hasta culminar mis estudios, se que no fue fácil, pero lo logramos.

A Vicky: No tengo palabras para expresarte todo el cariño que te tengo, gracias por ayudarnos en absolutamente todo y por ser una persona tan maravillosa, por tu noble corazón, te mereces todo lo que desees, ojalá todos tuvieran una Vicky en sus vidas.

A Paola: Gracias por brindarme toda tu confianza, cariño, amistad y por todas esas risas en el laboratorio, ojalá sigamos siendo el equipo dinamita y que sigamos siendo los mejores amigos.

Denisse, Norberto, Sandra, Susana, Gabs y Cynthia: Gracias por escucharme, apoyarme y animarme cuando más lo necesité, por sus sabios consejos, risas y más que amigos, mi familia, los quiero y les agradezco que hayan aparecido en mi vida.

A Rubén: Gracias por apoyarme siempre en las decisiones importantes de mi vida por forjar mi carácter y enseñarme "Las leyes del poder" porque sin su amistad y ayuda no hubiera llegado hasta aquí. Gracias Amigo.

A ti R: Porque estuviste conmigo desde el inicio, por brindarme un espacio en tu corazón, por darme la felicidad que merecía, nunca me arrepentiré de haberte conocido porque a tu lado viví los mejores momentos de mi vida y porque después de ti no fue ni será la misma, estoy orgulloso de ti.

A MI MADRE Y A MI HERMANA
POR TODO SU AMOR INCONDICIONAL

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA	4
3.2 LA ZONA METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO	4
3.3 PRINCIPALES CONTAMINANTES DEL AIRE	6
3.3.1 MONÓXIDO DE CARBONO (CO)	6
3.3.2 DIÓXIDO DE AZUFRE	7
3.3.3 OZONO	8
3.3.4 ÓXIDOS DE NITRÓGENO	9
3.3.5 MATERIAL PARTICULADO	10
3.3.7 METALES PESADOS	10
3.4 LAS PLANTAS COMO BIOMONITORES DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE Y SU USO COMO ORGANISMOS CENTINELA	13
3.5 <i>Gnaphalium lavandulifolium</i>	14
3.6 MUERTE CELULAR PROGRAMADA	14
3.7 ACTIVIDAD DE TIPO-CASPASA-3 ACTIVA EN PLANTAS	17
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS	21
7.2 EXPOSICIÓN	21
7.3 INCLUSIÓN DE LAS MUESTRAS	24
7.4 ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA	25
7.5 INMUNOLocalización DE LA PROTEÍNA TIPO-CASPASA 3 ACTIVA	25
7.6 ANÁLISIS DE METALES PESADOS	26
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
8. RESULTADOS	27
8.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO	27
8.3 ANÁLISIS DE METALES PESADOS	31
8.4 ANÁLISIS DE GASES CONTAMINANTES	34
9. DISCUSIÓN	36
10. CONCLUSIONES	39
11. REFERENCIAS	40

1. RESUMEN

Las diversas actividades humanas generan gran cantidad y variedad de contaminantes ambientales, las plantas juegan un papel importante por su amplia distribución en los ecosistemas y por su capacidad de captar e introducir en la cadena trófica diversos compuestos potencialmente dañinos para la salud. Con la finalidad de proponer a la planta silvestre *Gnaphalium lavandulifolium*, como organismo centinela de la presencia y efecto de gases contaminantes y de metales pesados, se expuso en cuatro diferentes sitios de la Zona Metropolitana del Valle de México, en los que se encuentra una estación meteorológica: Centro de Ciencias de la Atmósfera, Ecatepec, Tlalnepantla y en la zona rural Altzomoni, localizada dentro del Parque Nacional Izta-Popo. La exposición se realizó durante 2, 4 y 8 semanas en los meses de octubre y noviembre de 2018, las plantas testigo se mantuvieron en condiciones controladas.

Se observaron los cambios morfológicos ocurridos a nivel celular en cortes semifinos de hojas, que se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico. En cortes ultra-finos se analizó la ultra-estructura celular al microscopio electrónico de transferencia. Por inmunocitoquímica se detectó la localización de la proteína tipo-caspasa-3 activa, indicadora de muerte celular programada tipo apoptosis, para la inmunolocalización se usó el fluorocromo ALEXA 488 conjugado con el anticuerpo secundario. Por otro lado, se realizó el análisis de metales pesados por el método de espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente. Se obtuvieron los datos de los contaminantes atmosféricos registrados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico durante el periodo de estudio. Los resultados mostraron cambios morfológicos característicos de lo que se ha descrito como muerte celular programada tipo apoptosis.

En las células foliares se presentó contracción del protoplasto separándose de la pared celular. Ésta se observó a partir de la cuarta semana en las muestras que se expusieron en las estaciones de Ecatepec y Tlalnepantla, contrastando con las plantas testigo que se mantuvieron bajo condiciones controladas, también se observó el deterioro del tejido y de la estructura celular al microscopio óptico y se pudo apreciar con detalle en las imágenes al microscopio electrónico, especialmente en las muestras expuestas durante 8 semanas en las zonas industriales Ecatepec y Tlalnepantla.

En la inmunolocalización se mostró la presencia de la proteína tipo-caspasa-3 activa en organelos como los cloroplastos, localizados en la periferia adosados a la pared celular, en las muestras expuestas en la semana 2, pero que se observan desplazados separándose de la pared celular en las muestras después de 8 semanas de exposición. Este fenómeno de AL-PCD encontrado por microscopía, coincidió con la presencia de una mayor cantidad de contaminantes gaseosos registrados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico, como el material particulado, los óxidos de nitrógeno y de metales pesados como el Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb, V y Zn, detectados en las plantas expuestas. Los resultados obtenidos indicaron que *Gnaphalium lavandulifolium* puede utilizarse como un excelente biomonitor de contaminantes atmosféricos además de ser un organismo bioacumulador.

2. INTRODUCCIÓN

En 1990 la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las más contaminadas en América Latina; su atmósfera contiene diversos agentes químicos y polvo. Los principales gases registrados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) son: ozono, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, bióxidos de azufre, etc., así como metales pesados, material particulado (PM_{2.5} y PM₁₀) y compuestos orgánicos volátiles, cuyas principales fuentes son las industrias y los emisores vehiculares (Calderón-Segura *et al.*, 2004). Gran parte de la literatura sobre los efectos de la contaminación del aire proviene de estudios en ciudades norteamericanas y europeas, en donde hay numerosos análisis sobre el riesgo de la exposición a contaminantes atmosféricos. En la ZMVM estas evaluaciones son escasas (Villalobos-Pietrini *et al.* 2000), no obstante, su densidad poblacional, su elevado parque vehicular y su orografía, constituida por una altiplanicie rodeada por montañas que favorecen la acumulación de compuestos (Gómez-Arroyo *et al.*, 2018).

La muerte celular programada (MCP) se puede definir como una secuencia de eventos potencialmente interrumpibles que llevan a la destrucción controlada y organizada de células o tejidos (Lockshin y Zakeri, 2004). Ésta se relaciona directamente con diversos procesos durante el desarrollo de las plantas, como la diferenciación celular y tisular, la germinación, la abscisión de órganos o como respuesta al ataque de patógenos (Kuriyama y Fukuda, 2002) y juega un papel crucial en el desarrollo de las estructuras reproductoras, tanto el gineceo como en androceo, así como en el éxito reproductivo (Rogers, 2006). Su regulación se da a nivel genético y comparte características morfológicas y bioquímicas similares a la apoptosis de las células animales, incluyendo la retracción del citoplasma, así como la condensación y fragmentación de la cromatina (Gadjev *et al.*, 2008).

La MCP también juega un papel importante en otros procesos como la resistencia a condiciones ambientales desfavorables y a diferencia de los modelos animales, la MCP en plantas está poco descrita al nivel molecular, lo que ha dado lugar a debates sobre el paralelismo entre este tipo de muerte celular programada en plantas y la apoptosis en animales. Sin embargo, en los últimos años han surgido evidencias importantes que permiten concluir que en las plantas existe tal proceso (Reape y McCabe, 2010).

3. ANTECEDENTES

3.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

La contaminación atmosférica se refiere a cualquier alteración de las condiciones de la atmósfera por la presencia de sustancias que pueden causar daño a los seres humanos, animales, vegetación y materiales (Buell *et al.*, 2003). Siendo uno de los problemas ambientales más graves del mundo, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó la contaminación atmosférica como carcinogénica para los seres humanos (Grupo 1) (Loomis *et al.*, 2013). Se puede caracterizar por las distintas mezclas de partículas y aerosoles, las cuales son la causa de enfermedades graves (IARC, 2013). Las actividades antropogénicas liberan al ambiente millones de toneladas de contaminantes como una mezcla compleja que incluye gases inorgánicos, compuestos orgánicos volátiles, metales pesados y diversos agentes biológicos. Diferentes estudios presentan evidencia de efectos nocivos de esta mezcla (Ceretti *et al.*, 2015). La mayoría de los daños a la salud se atribuyen a las emisiones de los vehículos e industrias (Nikic y Stankovic, 2005).

3.2 LA ZONA METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO

La ZMVM tiene aproximadamente 20 millones de habitantes y es la fuente dominante de contaminación antropogénica en la región (Molina *et al.*, 2007). Su topografía presenta montañas en tres lados, ubicada a unos 2,200 metros sobre el nivel del mar (msnm) lo cual atrapa a los contaminantes en la zona durante las

primeras horas de la mañana y la ventila por la tarde a través de los procesos térmicos (de Foy *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2010).

Las frecuentes inversiones térmicas que ocurren en el valle son un fenómeno natural que causa un estancamiento temporal de las masas de aire en la atmósfera. Ello inhibe la capacidad de autodepuración de ésta y favorece la acumulación de los contaminantes. El estancamiento perdura hasta que la inversión térmica se rompe debido al calentamiento de la atmósfera, entonces los contaminantes se dispersan (INEGI, 2016a). Por otra parte, la intensa y constante radiación solar que se registra en el Valle de México a lo largo de todo el año, dada su latitud ubicada sobre los 19°20' de Latitud Norte y 99°05' de Longitud Oeste, favorece la formación del ozono, como resultado de las complejas reacciones que la luz ultravioleta del sol desencadena entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos emitidos a la atmósfera (INEGI, 2016a).

La altitud a la que se ubica el Valle de México (2,240 msnm), determina que el contenido de oxígeno sea 23% menor que a nivel del mar, lo cual tiende a hacer más contaminantes los procesos de combustión (INEGI, 2016a). En la ZMVM, considerada la más grande y compleja del país, la emisión de contaminantes que alteran la calidad del aire está directamente asociada a las actividades de la población, al alto consumo de combustibles fósiles y a la movilidad de bienes y personas que implica más de 34 millones de viajes diarios (INEGI, 2016b) (Tabla 1).

Tabla 1.- Emisión de contaminantes en la ZMVM, 2016 (Tomado de INEGI, 2016a)

Entidad	Fuente	Emisiones totales (t/año)					
		PM10	PM 2.5	SO2	CO	NOX	COV
ZMVM	Puntuales	3,055	2,256	878	9,850	12,603	26,130
	Área	21,859	7,255	1,216	72,278	12,224	267,996
	Móviles	11,123	5,497	568	646,434	115,275	77,051
	Naturales	1,930	425	N/A	N/A	505	44,912

Dentro del Valle se ubica la ZMVM (16 alcaldías de la CDMX y 18 municipios del Estado de México), con una superficie de 3,540 km² lo que representa el 37% de la cuenca del Valle de México, que posee prominencias topográficas aisladas como el Cerro de la Estrella, el Peñón y el Cerro de Chapultepec, entre otros; su ubicación geográfica y su entorno característico ejercen una influencia determinante sobre la calidad del aire existente en esta zona (SEMARNAT y CONAPO, 2013).

Dentro de los municipios urbanos que destacan en la ZMVM por la gran cantidad de industrias ubicadas dentro de ellos se encuentran Ecatepec (ECA) y Tlalnepantla (TLA). ECA se ubica al noreste de la entidad, limitando al sur con la Ciudad de México, se sitúa a una altitud de 2200 msnm, es considerado uno de los municipios con mayor contaminación y mala calidad del aire, llegando a superar los 100 puntos IMECA, debido a la alta población con aproximadamente 1.6 millones de habitantes, más de medio millón de automóviles y más de 1550 medianas y pequeñas industrias (INEGI, 2016b).

TLA es uno de los 125 municipios del Estado de México y se ubica al norte de la Ciudad de México, es uno de más industrializados y con una gran actividad económica en servicios y comercios. Se encuentra a 2250 msnm. Cuenta con aproximadamente 49 ramas industriales como: alimentos, bebidas, alcohol, textil, madera, industrias metálicas, manufactureras y químicas derivadas del petróleo, carbón y hule (INEGI, 2016b).

3.3 PRINCIPALES CONTAMINANTES DEL AIRE

3.3.1 MONÓXIDO DE CARBONO

El monóxido de carbono, (CO) es un gas incoloro e inodoro que se forma cuando el carbón en el combustible no se quema completamente. El CO es tóxico para los humanos porque compite de manera muy efectiva con el oxígeno en la sangre por los sitios de unión con la porción hemo de las células sanguíneas, lo que reduce la

capacidad de la sangre para transportar oxígeno a diversas partes del cuerpo, incluido el corazón y el cerebro (Kong *et al.*, 2010).

Cuando se respira a niveles muy altos, el CO puede ser fatal, las exposiciones por incendios y emisiones en interiores causan miles de muertes por año en los Estados Unidos (Kleinman, 2000). En las ciudades, casi todas las emisiones de CO pueden provenir del escape de los vehículos motorizados. Otras fuentes incluyen procesos industriales (como el procesamiento de metales y la fabricación de productos químicos), la quema residencial de madera y fuentes naturales como incendios forestales. (Kong *et al.*, 2010). Las estufas de leña y gas, el humo de cigarrillo, los calentadores de gas y queroseno sin ventilación son fuentes de CO (Godish, 2003).

La exposición se produce de dos maneras principales: exposición aguda durante períodos de tiempo variables, donde los efectos son generalmente evidentes de inmediato y exposición retrasada o crónica, donde los efectos pueden no ser reconocidos por días, meses o años (Sekhar *et al.*, 2014). En México el límite máximo permisible es de 11 ppm en un lapso de 8 horas (NOM-021-SSA1-1993).

3.3.2 DIÓXIDO DE AZUFRE

Los óxidos de azufre (SO₂) son un grupo de importantes contaminantes del aire que comprenden especies químicas tanto gaseosas como en partículas, incluyendo monóxido de azufre, dióxido de azufre, trióxido de azufre. Proviene principalmente de servicios eléctricos, especialmente de aquellos que queman carbón e instalaciones industriales que obtienen sus productos de materias primas como mineral metálico, carbón y petróleo crudo o que queman carbón y petróleo para producir calor (Pan *et al.*, 2007).

Los óxidos de azufre y las partículas de sulfato pueden causar gran variedad de impactos a la salud y al ambiente, en particular a subgrupos susceptibles de personas con asma, enfermedades cardíacas o pulmonares y ancianos. Éstos

reaccionan con otras sustancias en el aire para formar ácidos. La lluvia ácida acelera la descomposición de los materiales de construcción y pinturas, daña los bosques y los cultivos, cambia la composición del suelo y hace que los lagos se acidifiquen (Qin y Meng, 2005).

El SO_2 también es una fuente secundaria importante de contaminación del aire como material particulado PM (por sus siglas en inglés). Una vez emitido al aire, puede disolverse en vapor de agua para formar aerosoles ácidos (por formación heterogénea) y también puede interactuar con otros gases y partículas en el aire para crear sulfatos y otros productos de PM a través de la formación homogénea (WHO, 2007). Estas partículas de sulfato pueden ser dañinas para los humanos y para su ambiente, incluso a través de la lluvia ácida. Los sulfatos de partículas finas secundarias formados en la atmósfera a partir del SO también pueden causar un deterioro significativo de la visibilidad (Bloemen *et al.*, 2007). La OMS promueve límites permisibles de este gas, siendo en México el límite de 0.25 ppm anual, 0.110 ppm en 24 horas (NOM-022-SSA1-2010).

3.3.3 OZONO

El ozono (O_3) es un componente natural de la atmósfera que se encuentra en bajas concentraciones y es vital para la vida. La mayor parte (90%), se encuentra en la parte superior de la atmósfera en la estratósfera, a más de 20 km de la superficie y forma una capa que limita el ingreso de radiación ultravioleta proveniente del sol (Ainsworth *et al.*, 2012).

La mayor parte del ozono en la tropósfera se produce cuando los óxidos de nitrógeno, el monóxido de carbono y los compuestos orgánicos volátiles reaccionan en la atmósfera, en presencia de luz solar. Las fuentes antropogénicas más importantes de precursores de ozono son tanto emisiones vehiculares como industriales y los disolventes químicos (Dirección de Monitoreo Atmosférico, 2016).

En el organismo el ozono ejerce su acción a través de varios mecanismos, las reacciones con algunas moléculas biológicas pueden llevar a la formación de radicales libres. El ozono no puede penetrar las membranas celulares o las capas surfactantes de las células, por lo que sus efectos biológicos son provocados por intermediarios tales como radicales libres, aldehídos, peróxido de hidrógeno, entre otros (Heat *et al.*, 2009). Cuando el tracto respiratorio es expuesto al ozono se produce daño en el mismo, el alcance dependerá de la concentración, la duración de la exposición, los patrones de exposición y la ventilación (Peltonen *et al.*, 2010). A concentraciones elevadas se puede agravar el asma, debido a que favorece la susceptibilidad del organismo a los alérgenos (agentes que provocan los ataques) (Heat *et al.*, 2009).

Puede empeorar las enfermedades pulmonares crónicas tales como el enfisema y la bronquitis y reducir la capacidad del sistema inmunológico para defenderse de las infecciones bacterianas (Dirección de Monitoreo Atmosférico, 2016). Los límites máximos permisibles establecidos en el país son menores o igual a 0.095 ppm en 1 hora y menor o igual a 0.070 ppm en 8 horas (NOM-020-SSA1-2014).

3.3.4 ÓXIDOS DE NITRÓGENO

Los óxidos de nitrógeno ($\text{NO}_x = \text{NO} + \text{NO}_2$) se encuentran entre los componentes más importantes de la contaminación del aire, según la Organización Mundial de la Salud, es responsable de una de cada ocho muertes prematuras en todo el mundo (WHO, 2014). Estos gases se han relacionado con enfermedades de las vías respiratorias superiores, asma, cáncer, defectos de nacimiento y enfermedades cardiovasculares, son compuestos traza con una vida corta, y participan activamente en la formación de ozono troposférico y aerosoles secundarios, por lo que dañan la salud humana de manera significativa (Seinfeld y Pandis, 2006).

Las actividades antropogénicas, en particular la quema de combustibles fósiles, son las fuentes más importantes de emisiones de NO_x que se agrupan principalmente

en zonas urbanas densamente pobladas y áreas industriales suburbanas/rurales donde se ubican fuentes puntuales como las centrales eléctricas (Souri *et al.*, 2017).

3.3.5 MATERIAL PARTICULADO

El Material Particulado es una mezcla de partículas líquidas y sólidas suspendidas en el aire, que poseen una diversidad de propiedades físicas (como densidad, dimensión, forma química) (USEPA, 2017). En la fracción inhalable de éstas se incluyen aquellas con un diámetro menor a 10 μm (PM_{10}) y menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) que son capaces de ingresar al sistema respiratorio. Las PM menores a 2.5 μm , representan una mezcla compleja que puede contener compuestos de origen natural o ser el producto de las actividades antropogénicas (Miguel-Pérez *et al.*, 2013). Se ha descrito que conforme disminuye el tamaño de la partícula aumenta su toxicidad y esto se debe a que las más pequeñas son capaces de entrar más profundamente en las vías respiratorias e ingresar al organismo y una vez dentro, son capaces de acumularse en diferentes sitios (Rosales-Castillo *et al.*, 2001).

Los efectos de las PM en la salud humana están estrechamente relacionados con el tiempo de exposición y su tamaño (Di Palma *et al.*, 2017). Las PM pueden causar estrés oxidante, apoptosis y citotoxicidad (Låg *et al.*, 2016). Los límites máximos permisibles en las PM_{10} son de 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ durante 24 horas y de 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual, Asimismo, para las $\text{PM}_{2.5}$ es de 45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para 24 horas y de 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual (NOM-025-SSA1-2014).

3.3.7 METALES PESADOS

Se definen como elementos que tienen una densidad relativamente alta en comparación con el agua (Fergusson, 1990). Con relación a la toxicidad, son capaces de inducir daño en niveles bajos de exposición (Duffus, 2002). En los últimos años, ha habido una creciente preocupación ecológica y de salud pública mundial asociada con la contaminación ambiental por éstos metales, aunque son elementos que se encuentran de manera natural en toda la corteza terrestre, la

mayor parte de la contaminación ambiental y la exposición humana se debe a actividades antropogénicas, como las operaciones de minería y fundición, la producción industrial, el uso doméstico y agrícola y el manejo de compuestos que los contienen (He *et al.*, 2005).

La contaminación ambiental también puede ocurrir a través de la corrosión del metal, el depósito atmosférico, la erosión del suelo, la lixiviación, la re-suspensión de sedimentos y la evaporación de los recursos hídricos al suelo y al agua subterránea (Arruti *et al.*, 2010). También se ha mencionado que fenómenos naturales como la meteorización y las erupciones volcánicas contribuyen significativamente a la contaminación por metales pesados (Fergusson, 1990). En sistemas biológicos, se ha descrito que afectan organelos y componentes celulares como las membranas celulares y mitocondrial, el lisosoma, el retículo endoplásmico, el núcleo y algunas enzimas involucradas en el metabolismo, la desintoxicación y la reparación de daños (Wang y Shi, 2001).

Se ha descubierto que los iones metálicos interactúan con componentes celulares como el DNA y las proteínas nucleares, lo que causa daños y cambios conformacionales que pueden conducir a la modulación del ciclo celular, carcinogénesis o apoptosis (Beyersmann y Hartwig, 2008).

La Asociación Oficial del Control de Alimentos de los Estados Unidos (AAFCO, 1996) afirma que los principales metales tóxicos son aluminio (Al), Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Plomo (Pb), 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 plantas superiores son muy útiles para realizar monitoreo *in situ* y caracterizar los contaminantes de un área específica (Ceretti *et al.*, 2015), se han usado desde principios del siglo XX para evaluar diversos grados de daño generados por factores físicos y químicos del ambiente (Rai *et al.*, 2011). Debido a su alta sensibilidad se

puede detectar la presencia de gases contaminantes de la atmósfera como óxidos de azufre y nitrógeno, ozono, formaldehídos, amoniacos e incluso mezclas complejas (Rodrigues *et al.*, 1997). Las hojas son estructuras muy susceptibles de la planta debido a la abundancia de estomas que permiten la penetración de los xenobióticos (Weigel *et al.*, 1989). Se han realizado estudios con tejidos vegetales en donde se menciona que los metales pesados presentes en las partículas afectan procesos tanto bioquímicos como físicos de las plantas (Prieto *et al.*, 2009).

Los contaminantes entran a la hoja por difusión y la velocidad depende de sus propiedades químicas (Rai *et al.*, 2011). Para evitar su entrada, las plantas tienen varios mecanismos que sirven como barreras físicas, por ejemplo; tricomas, cutícula cerosa, epidermis y pared celular (Weigel *et al.*, 1989). Una vez que se encuentra dentro de la hoja, los contaminantes pueden quedar en algunos tejidos o compartimentos celulares donde ocasionen el menor daño al DNA y los procesos esenciales (Burken, 2004; Tuteja *et al.*, 2009). A nivel celular se pueden acumular en la vacuola o en la pared celular y a nivel de tejido en la epidermis y en los tricomas (Hale *et al.*, 2001).

Los contaminantes pueden ser atrapados por agentes quelantes, formando conjugados. Sin embargo, pueden producir Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) desencadenando una respuesta antioxidante (Heath *et al.*, 2009). Los antioxidantes retardan o previenen la oxidación. En los cloroplastos, por ejemplo, la ferritina, limita los pro-oxidantes, mientras que otras protegen las biomoléculas con ayuda del glutatión y el ascorbato (Chaverri y Cárdenas, 2018). Si la exposición es crónica, los contaminantes se acumulan en los tejidos y ocasionan toxicidad directa, dañando la estructura celular. (Taiz y Zeiger, 2002).

Los contaminantes que más afectan al desarrollo de las plantas son el O₃ y el SO₂ (Heath, 1999). Sus consecuencias dependen de la especie, la edad, los factores meteorológicos y el tiempo de exposición (Pardos, 2006). Debido a que no se puede realizar la experimentación directa con el ser humano por razones éticas y

económicas, se utilizan modelos experimentales, que incluyen especies de diferentes niveles de organización, como organismos procariontes y eucariontes. A estos organismos se les ha llamado organismos biomonitores u organismos centinela (García y Rubiano, 1984).

3.4 LAS PLANTAS COMO BIOMONITORES DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE Y SU USO COMO ORGANISMOS CENTINELA

En general un organismo centinela se define como: “cualquier organismo no humano que puede reaccionar ante un contaminante ambiental antes de que éste impacte sobre los seres humanos” (Stahl, 1997). Y debe reunir ciertas características 1. Dar 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 4. Tener una relación íntima con la fuente de exposición (Shah *et al.*, 2010).

Las plantas superiores presentan diferentes características que les favorecen como modelos genéticos para evaluar contaminantes ambientales, por ejemplo: su sensibilidad y la posibilidad de revelar múltiples alteraciones genéticas en distintos tejidos. Algunas de las más utilizadas son: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, entre otros (Grant., 1994). Al utilizar las plantas se facilita la identificación de efectos toxicológicos y daños a otros niveles superiores de la cadena trófica ya que éstas pueden transportar contaminantes hacia niveles tróficos más elevados (Rodrigues *et al.*, 1997).

En el estudio sistemático de la inducción de genotoxicidad, mutagenicidad y muerte celular programada luego de la exposición a contaminantes y otros agentes de estrés, el uso de plantas ha aumentado significativamente En la última década, lo que destaca su relevancia y utilidad (Santos *et al.*, 2015).

3.5 *Gnaphalium lavandulifolium*

Es una planta sub-arbustiva, con abundantes hojas, de entre 5 a 25 cm de altura, con tallos ramificados, hojas oblongas, sésiles y amplexicaulas que miden de 4 a 12 mm de largo y 1 a 3 mm de ancho, con el nervio medio prominente en el envés, contienen pubescencia densamente lanosa en ambas caras de la hoja y cuando las hojas mueren permanecen fijas al tallo, la inflorescencia se conforma por fascículos de 1 a 3 cabezuelas. Habita en zonas alpinas, se ha encontrado en las faldas del Iztaccíhuatl y del Popocatepetl a 3800 y 4300 m de altitud junto con zacatonal alpino (Calderón y Rzendowski., 2005) (Figura 1).



Figura 1.- *Gnaphalium lavandulifolium*

3.6 MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Así como la división, el crecimiento y la diferenciación celular, también la muerte es un proceso biológico fundamental de la vida en los eucariotas y una multitud de causas puede provocarla. Históricamente, los procesos de muerte celular en metazoos se han dividido según las características morfológicas en tipo I o apoptosis, tipo II o autofagia, y tipo III o necrosis.

En el tipo I, la muerte celular se lleva a cabo por la activación de enzimas catabólicas en las que predominan las proteasas en cascadas de señalización que llevan a la rápida destrucción de organelos siendo ésta una característica de la apoptosis y que concluye en la condensación nuclear como efecto de la compactación cromatínica, así como, la fragmentación nuclear y la división eventual en los denominados cuerpos apoptóticos (Gadjev *et al.*, 2008).

En mamíferos, el grupo de proteínas cisteínicas que señalizan la destrucción celular se han denominado Caspasas (Wolf y Green., 1999) y la actividad de éstas puede ser por receptores de muerte extrínsecos o por vías intrínsecas controladas, en parte, por la mitocondria y la excreción de Citocromo C, activando la formación del apoptosoma el cual es un complejo activador de caspasas en el citoplasma (Adrain y Martin, 2001).

En el tipo II, la muerte por autofagia, partes del citoplasma y algunos organelos celulares, son secuestrados por vacuolas autofágicas o auto fagosomas, para ser degradadas por lisosomas (Shintani y Klionsky, 2004). La micro autofagia, es el proceso por el cual un lisosoma invagina la membrana introduciendo componentes del citosol en las que puede incluir organelos adyacentes a la vacuola. En plantas, este mecanismo se ha observado en plántulas y en hojas senescentes (Harrison-Lowe y Olsen, 2006).

La necrosis o tipo III, es una muerte descontrolada en la que la célula pierde su capacidad de osmorregulación inundando la célula de iones y agua, debido a que es incapaz de activar vías apoptóticas (Lennon *et al.*, 1991). Principalmente se causa por altas dosis de radiación UV-B o en presencia de diferentes tipos de estrés (Mammone *et al.*, 2000). En plantas es una respuesta de hipersensibilidad y está relacionada con otros tipos de muerte, incluso puede comenzar en vías programadas y terminar de forma accidental (Sansón y Zavaleta, 2011).

Estos diferentes procesos de muerte celular pueden desencadenarse por diversos tipos de estrés que son demasiado severos o prolongados para una respuesta adaptativa. Sin embargo, como parte inherente de los programas regulares de desarrollo o fisiológicos, estos casos se conocen como “Muerte Celular Programada” (MCP) (Galluzzi *et al.*, 2018) (Figura 2).

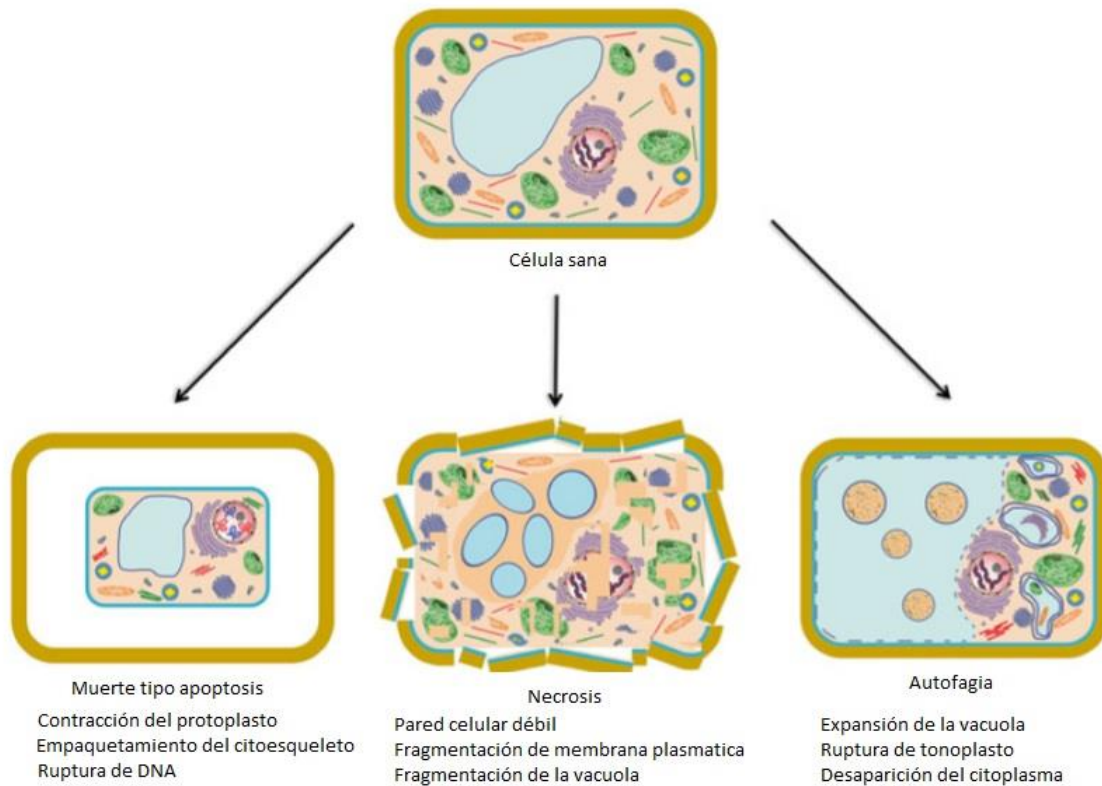


Figura 2.- Tipos de muerte celular en plantas. Tomado y modificado de (Reape y McCabe, 2010).

La MCP definida morfológicamente en plantas se denomina MCP-Tipo Apoptosis (AL-PCD por sus siglas en inglés, Reape *et al.*, 2008). El uso de este término reconoce que existen diferencias entre la apoptosis en animales y la AL-PCD, que se distingue por la separación del protoplasto de la pared celular y la degradación del DNA, éstos se pueden distinguir morfológicamente con microscopio óptico y mayormente con electrónico (Reape y McCabe, 2010).

3.7 ACTIVIDAD DE TIPO-CASPASA-3 ACTIVA EN PLANTAS

Las caspasas son una familia de enzimas pertenecientes al grupo de las cisteinoproteasas que presentan un residuo de cisteína. Median la ruptura de otras proteínas, se encuentran típicamente en la célula como precursores inactivos, se activan al inicio de la apoptosis y están altamente conservadas en las diferentes especies (Adrain y Martin, 2001; Fulda, 2018). Pueden clasificarse como iniciadoras Caspasas 8, 9 y 10 y ejecutoras Caspasas 3, 6 y 7 (Ramirez y Salvesen, 2018). En principio, podrían activarse a través de vías de transducción de señales extrínsecas o intrínsecas (Tsapras y Nezis., 2017).

Estas proteasas degradan los sustratos estructurales y las enzimas de reparación del ADN. La caspasa 3 activa es muy importante ya que las vías intrínsecas y extrínsecas convergen en ella (Snigdha *et al.*, 2012). Sin embargo, su regulación sobre la diferenciación y la función aún no se ha dilucidado completamente. Las caspasas iniciadoras activan las efectoras, generando un torrente proteolítico que desmantela las estructuras celulares clave para producir el fenómeno apoptótico (Savill y Fadok., 2000) (Figura 3).

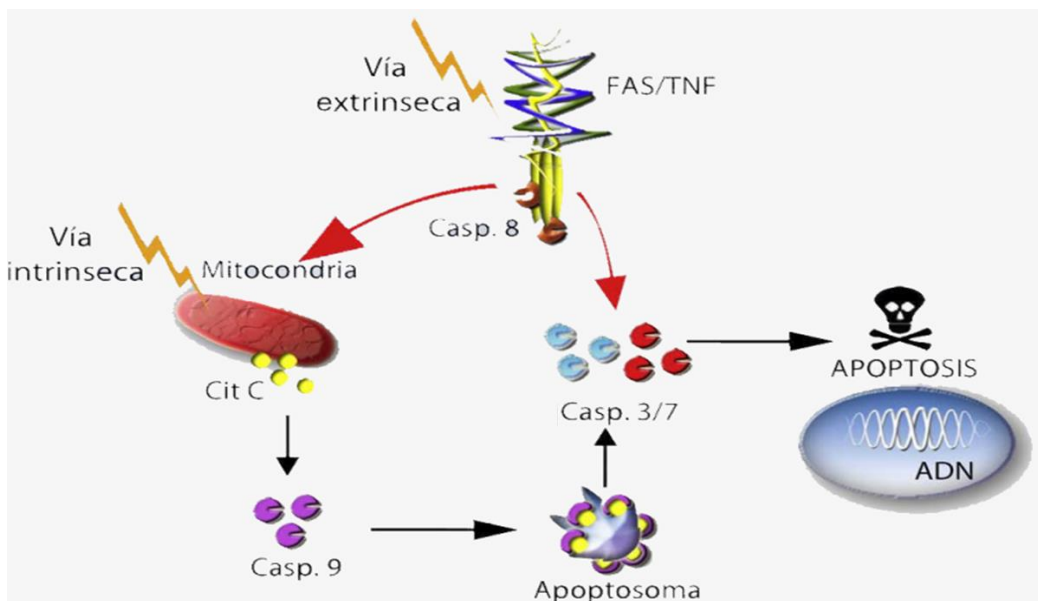


Figura 3. Ruta de acción de las caspasas iniciadoras y efectoras. (Tomado y modificado de Fulda, 2018).

Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente 14 caspasas en mamíferos, un subconjunto de las cuales están involucradas en la regulación de la apoptosis; se cree que el resto está implicado en el procesamiento de citosinas proinflamatorias (Earnshaw *et al.*, 1999). Aunque no hay evidencia de que existan caspasas en los genomas de las plantas ya secuenciadas, se han descubierto moléculas tipo-caspasas, además de que sus sustratos se rompen durante la MCP (Sanmartin *et al.*, 2005). Asimismo, es importante mencionar que el DNA es cortado y diversos genes involucrados en la apoptosis parecen funcionar en la MCP en plantas (Danon *et al.*, 2000).

Otra característica de la AL-PCD es la degradación del DNA, así como la desnaturalización de la polimerasa Poly ADP-ribose, involucrada en la reparación del DNA y que además es un sustrato de la actividad de tipo-Caspasa-3 (Thomas y Franklin-Tong, 2004).

4. JUSTIFICACIÓN

Dado que es imposible hacer experimentación directa en los seres humanos, por razones éticas y económicas, se han establecido diversos sistemas biológicos de prueba entre los cuales las plantas presentan innumerables ventajas que las hace una herramienta sumamente útil para realizar estudios de Toxicología Ambiental.

No obstante sus características sedentarias, abundancia y sensibilidad a los cambios atmosféricos, las plantas silvestres son poco usadas como organismos indicadores de contaminación ambiental, particularmente no se encontraron antecedentes con *Gnaphalium lavandulifolium*, que indiquen que haya sido estudiada previamente, por lo que se propone emplearla como bioindicador de la presencia de gases y metales pesados contaminantes del aire, en 4 zonas ubicadas en la ZMVM: ECA, TLA, Alzomoni (ALT) en el Parque Nacional Izta-Popo y Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA), paralelamente con un testigo para evaluar la respuesta biológica en la inducción de muerte celular programada.

5. HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado la toxicidad de diversos contaminantes del aire, se espera que *Gnaphalium lavandulifolium* expuesta a sitios con diferente grado de contaminación atmosférica, evidencie un daño diferencial que conduzca a muerte AL-PCD.

6. OBJETIVOS

General

Evaluar la presencia de contaminantes atmosféricos de la Zona Metropolitana del Valle de México y su efecto en la inducción de muerte celular programada en *Gnaphalium lavandulifolium* para proponer su posible uso como organismo centinela.

Particulares

Determinar a través de los cambios morfológicos celulares, detectados por microscopía óptica y electrónica, si el tipo de muerte celular inducida en *G. lavandulifolium* es de tipo-apoptosis.

Localizar por inmunocitoquímica, la presencia de la proteína tipo caspasa-3 activa en las células de *G. lavandulifolium*.

Co-relacionar la respuesta biológica de *G. lavandulifolium* con la presencia de contaminantes ambientales reportados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la CDMX y con el contenido de metales pesados almacenados en sus hojas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS

Se colectaron 15 ejemplares de la planta nativa *Gnaphalium lavandulifolium* en el Parque Nacional Izta-Popo colocando cada una de ellas en macetas individuales con tierra estéril, teniendo el cuidado de no causar algún daño en hojas y raíces. Se colocaron en una cámara de crecimiento con condiciones de temperatura y humedad controlada, dejándolas un lapso de 2 semanas para su aclimatación en el CCA.

7.2 EXPOSICIÓN

Las plantas se expusieron del 1º. de octubre al 26 de noviembre del 2018, colocándolas en dispositivos que se diseñaron en el CCA con la finalidad de mantenerlas hidratadas continuamente. El primer grupo se trasladó a la estación meteorológica ALT ubicada dentro del Parque Nacional Izta-Popo a una altura de 3985 msnm (Figura 4).



Figura 4. Estación de monitoreo atmosférico Altzomoni

El segundo grupo se llevó a la estación meteorológica ECA, que se encuentra en el Centro de Salud Comunitario San Agustín en el municipio de Ecatepec de Morelos, un área urbana, principalmente habitacional, rodeada por calles de flujo vehicular alto de autos particulares, taxis, microbuses, autobuses locales y foráneos, camiones de carga y motocicletas (Figura 5).



Figura 5. Estación de monitoreo atmosférico SAG, Ecatepec.

El tercer grupo se trasladó a la estación meteorológica de TLA, que está en el municipio de Tlalnepantla de Baz, un área urbana principalmente habitacional con algunos comercios y servicios. En la avenida Toluca se presenta un flujo vehicular moderado de autos particulares, taxis colectivos “combi”, microbuses, camiones de carga, a 110 metros se encuentran 2 tanques de almacenamiento de combustible y a 1 Km existe una zona industrial y de bodegas (Figura 6).



Figura 6. Estación de monitoreo atmosférico Tlalnepantla.

Un cuarto grupo se mantuvo en la azotea del CCA, cercana a zonas transitadas en la Universidad Nacional Autónoma de México dentro de la Ciudad de México, (Figura 7). En todos los casos, las plantas se mantuvieron protegidas del agua de lluvia para descartar esta variable.



Figura 7. Estación de monitoreo atmosférico del Centro de Ciencias de la Atmósfera.

El quinto grupo se mantuvo en una cámara de crecimiento marca PERCIVAL INTELLUS Control System, bajo condiciones controladas de temperatura (19 °C) con periodos de luz de 12 h y 20% de humedad (Figura 8).



Figura 8. Plantas de *Gnaphalium lavandulifolium* en cámara de crecimiento (testigo negativo).

La colecta de muestras se realizó en las semanas 2, 4 y 8 de exposición), trasladando con cuidado de no someter a estrés, tres macetas con tres individuos cada una en cada ocasión. De cada individuo se tomaron pequeñas muestras para evaluar el fenómeno de MCP mediante la localización de la proteína tipo-Caspasa-3 activa y el resto se empleó para efectuar el análisis químico de metales pesados.

7.3 INCLUSIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la inclusión de las muestras que se analizaron con microscopía óptica y para la inmunocitoquímica se eligieron las hojas, se cortaron en tamaños de aproximadamente 1 cm², se fijaron en pequeños viales con para formaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS), a pH= 7.4, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS 3 veces por 5 min. Después se deshidrataron con cambios graduales de metanol al 30% 5 min a 4 °C, 50% 5 min a 4 °C, 70% 5 min a -20 °C, 90% 30 min a -20 °C. Se realizó la pre inclusión con metanol 90%:Lowicryl, 1:1 durante 60 min a -20 °C; metanol 90%: Lowicryl 1:2 durante 60 min a -20 °C, después Lowicryl puro por 60 min a -20 °C, Lowicryl puro 20 h a -20 °C y el último cambio de Lowicryl puro por 60 min a -20 °C, para finalizar, se encapsularon las muestras y se colocaron en presencia de luz UV durante 24 h a -20 °C y se dejaron otras 24 h a temperatura ambiente en presencia de luz UV para la polimerización de la resina. Después se llevaron al ultra-microtomo, para hacer cortes semi-finos de aproximadamente 5 µm, se colocaron en portaobjetos tratados con Poli -L- lisina 10x y se guardaron para su posterior uso, éstos se destinaron para 2 propósitos. El primero para observar los cambios morfológicos y el segundo para realizar la inmunolocalización.

La inclusión de las muestras para microscopía electrónica se realizó de la siguiente manera: cortes de 1 cm² se fijaron en una mezcla de paraformaldehído 4%, glutaraldehído 6% diluidos en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y luego a 4 °C por 24 h. Se lavaron 3 veces por 5 min y se post fijaron con tetra óxido de osmio 4% por 1 h, posteriormente se deshidrataron con cambios graduales de etanol 30,

50, 70, 80 y 96% por 10 min una vez y después con etanol 100% 3 veces de 10 min cada una. A continuación, se dieron tres cambios de 10 min del agente intermediario óxido de propileno puro.

Se llevó a cabo la preinclusión con óxido de propileno EPON 1:1 y se dejó durante toda la noche. Posteriormente se incluyó en EPON puro, colocando en los moldes primero una “cama” de EPON, la muestra con su etiqueta y se rellenó con EPON. Se dejó polimerizar 24 h a -20 °C. Se realizaron los cortes ultrafinos en un ultramicrotomo Ultracut Leica para ser analizados al microscopio electrónico de transmisión.

7.4 ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

Para observar los cambios a nivel celular, los cortes de 5 μ M se tiñeron con azul de toluidina al 0.1 %, colocando una gota del colorante por 30 segundos aproximadamente y se pasó por el mechero por 5 segundos, se lavaron con agua destilada para quitar el exceso, se mantuvieron a temperatura ambiente para permitir el secado y se guardaron para su posterior observación al microscopio óptico. El registro y captura de imágenes se realizó a 100x. El análisis de la ultraestructura celular se obtuvo en el microscopio electrónico JEM1010 Jeol observados con una cámara Orius SC600 con sensor CCD de 7 megapíxeles GATAN, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

7.5 INMUNOLocalización DE LA PROTEÍNA TIPO-CASPASA 3 ACTIVA

Se realizó la recuperación antigénica con TBS-T (Tris 0.5% + Tritón 0.05%) filtrado aplicando sobre la muestra por 15 min, se colocó el anticuerpo primario anti Caspasa-3 Activa (Anticapase-3 antibody Sigma-Aldrich), en PBS en una dilución 1:25 durante 2 h en una cámara húmeda en oscuridad y se lavó 3 veces con TBS-T durante 5 min cada uno. Se hizo el bloqueo con suero de cabra en PBS en una dilución 1:100 durante 10 min. Al término se colocó el anticuerpo secundario

acoplado al fluorocromo Alexa 488 (Alexa Fluor 488 INVITROGEN) durante 1:30 h, enseguida se hicieron 3 lavados de 5 min con TBS-T, se colocó el fluorocromo DAPI por 2 minutos diluido 1:20 en PBS, por último, se realizó un enjuague rápido y se hizo el montaje de la muestra con Vecta-Shield para su posterior observación al microscopio de fluorescencia manteniendo las laminillas protegidas de la luz y en congelación.

7.6 ANÁLISIS DE METALES PESADOS

Las hojas de las plantas se lavaron con mucho cuidado con agua desionizada y se colocaron a 60 °C para su deshidratación. Posteriormente, fueron preparadas para una digestión ácida en el UltraWave (Milestone). Para ello, se pesaron 0.25 g de tejido vegetal y se adicionaron 5 mL de ácido nítrico (HNO₃) grado cromatográfico, las muestras se dejaron en pre-digestión toda la noche dentro de una campana de extracción. A continuación, se llevó a cabo la digestión asistida por horno de microondas, empleando el programa descrito en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de corrimiento en digestor UltraWave

Etapa	Tiempo (min)	Potencia (W)	Temperatura (°C)	Presión (Bar)
1	20	1500	220	110
2	15	1500	220	110

Una vez terminado el programa, las muestras se enfriaron y aforaron a 50 mL con agua desionizada. Se filtraron, etiquetaron y almacenaron a 4 °C. Para el análisis de metales pesados, se empleó el método de espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente, descrito por Gómez-Arroyo *et al.*, 2018, realizado con el apoyo de personal del instituto de Geofísica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA no paramétrica Kruskal-Wallis en el que se calculó la desviación estándar comparando la muestra testigo contra los distintos metales pesados y gases contaminantes en exposición con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

El análisis con el microscopio óptico de los cortes de hoja teñidos con azul de toluidina mostró cambios en la estructura celular, especialmente en las muestras sometidas a la atmósfera de las zonas más contaminadas, incrementándose conforme aumentó el tiempo de exposición. Algunos cambios fueron la contracción del protoplasto, separándose de la pared celular, la condensación de la cromatina y la formación de vacuolas. En la semana 4, en ECA no se realizó la evaluación por carencia de muestras, debido a causas no controladas (Figura 9). En las muestras expuestas en ECA y TLAL en las semanas 2 y 8 se registró claramente un mayor cambio con respecto al TES, siendo más evidentes en la 8 en ambos sitios. En cuanto a los otros dos sitios de exposición (ALT y CCA) se observó un cambio menos evidente en el protoplasto, y la estructura celular aparece muy similar a la del TES.

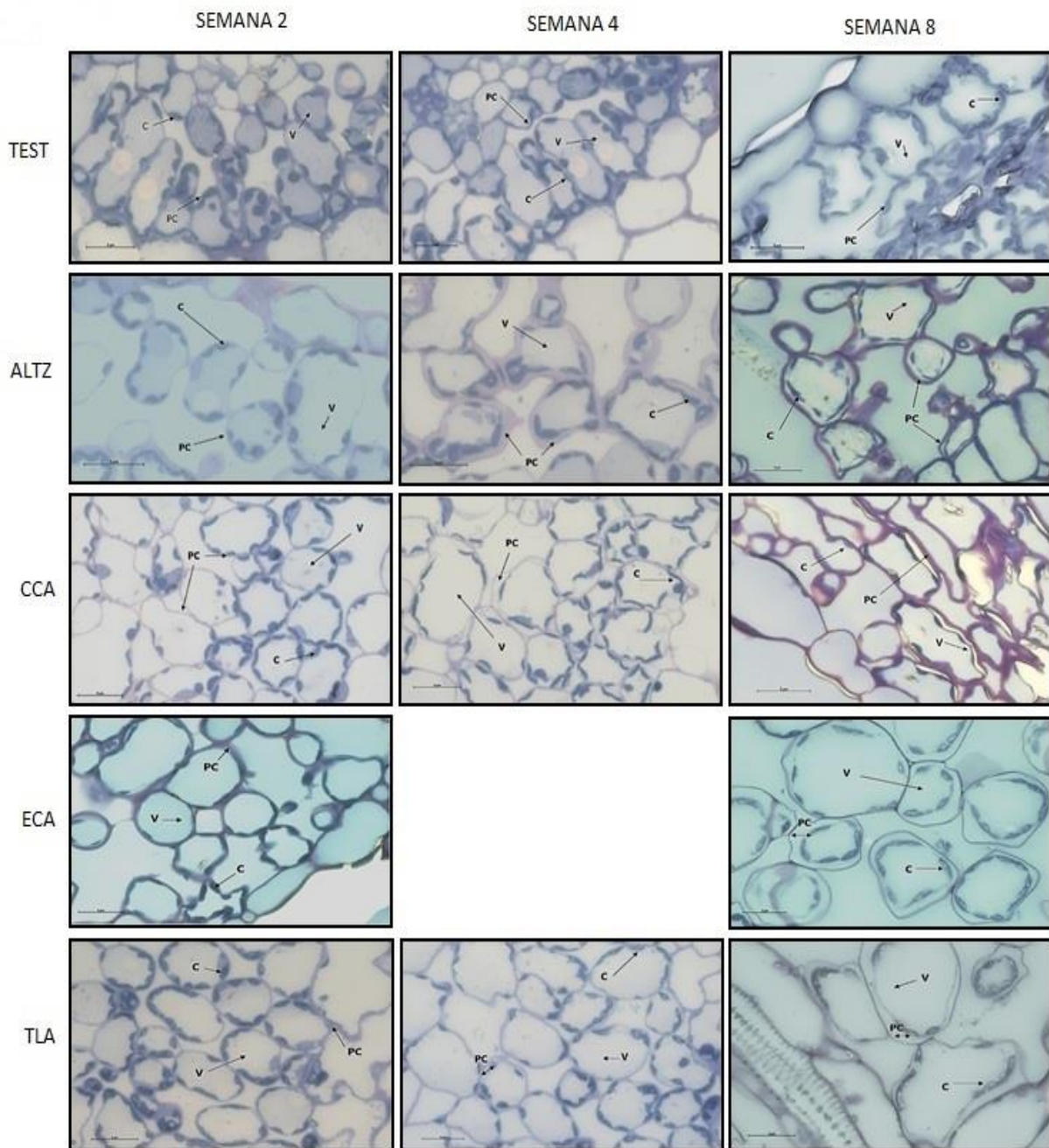


Figura 9. Imágenes de microscopio óptico de *Gnaphalium lavandulifolium* (100X) longitud de la barra inferior izquierda = 5 μ M. PC: pared celular, C: cloroplastos, V: vacuola y N: núcleo.

Los cortes ultrafinos incluidos en EPON evidenciaron al microscopio electrónico de transmisión mayor detalle de los cambios detectados previamente al microscopio óptico. En los TES de los diferentes sitios de exposición, los organelos conservaron

su estructura y se localizaron cercanos a la pared celular, mientras que las expuestas un mayor tiempo en ECA y TLA, presentaron una desorganización y deterioro de su estructura (ribosomas, cloroplastos núcleo) y la pared celular engrosada y difusa (Figura 10).

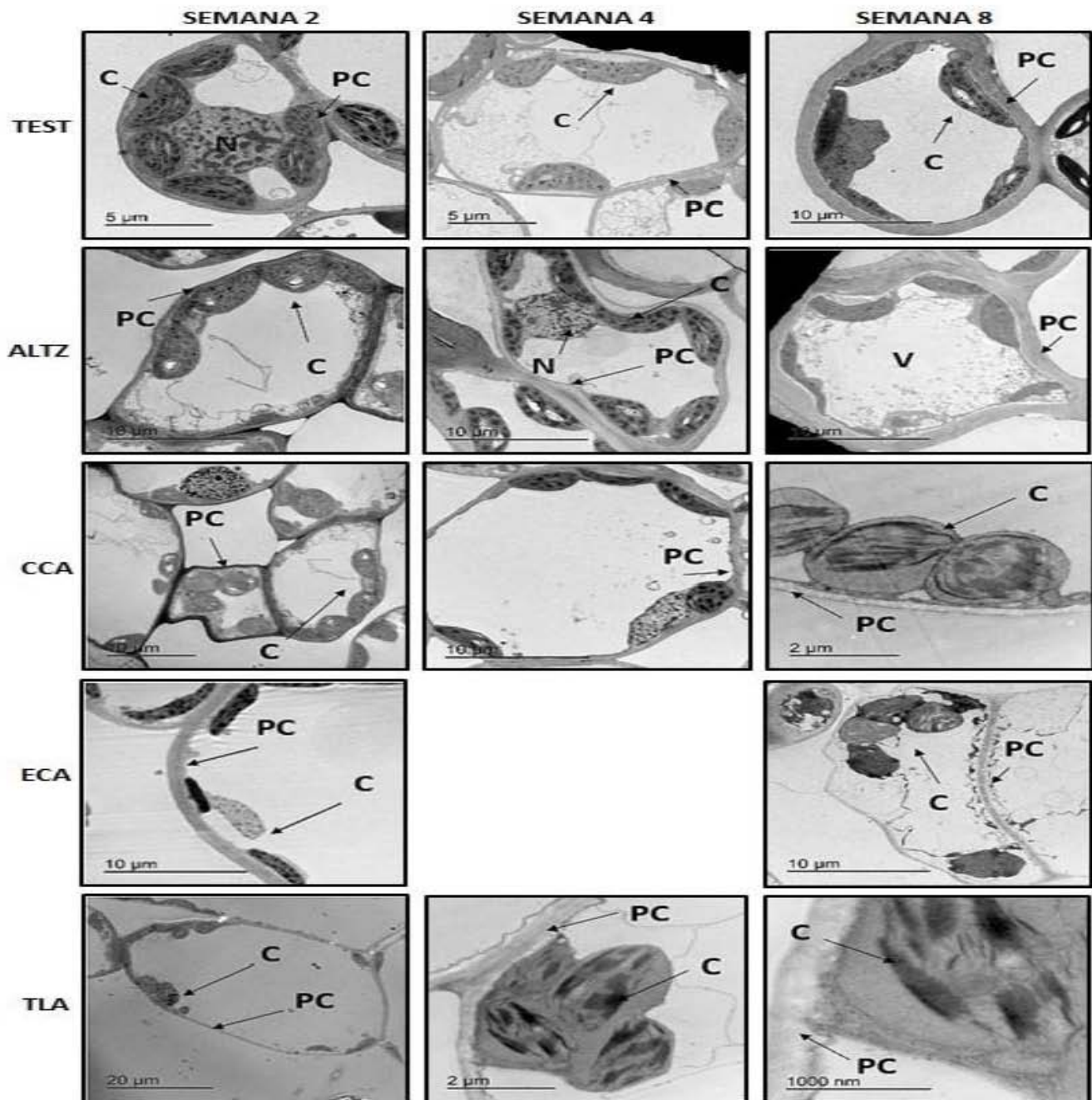


Figura 10. Imágenes al microscopio electrónico de transmisión de *Gnaphalium lavandulifolium* PC: pared celular, C: cloroplastos, V: vacuola y N: núcleo.

8.2 INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TIPO-CASPASA-3 ACTIVA

Las imágenes obtenidas al microscopio confocal revelaron la localización del marcador de muerte celular programada tipo apoptosis, tipo-caspasa-3 activa, conjugada con el fluorocromo Alexa 488 en los organelos, específicamente en los cloroplastos adosados a la pared celular (Figura 11).

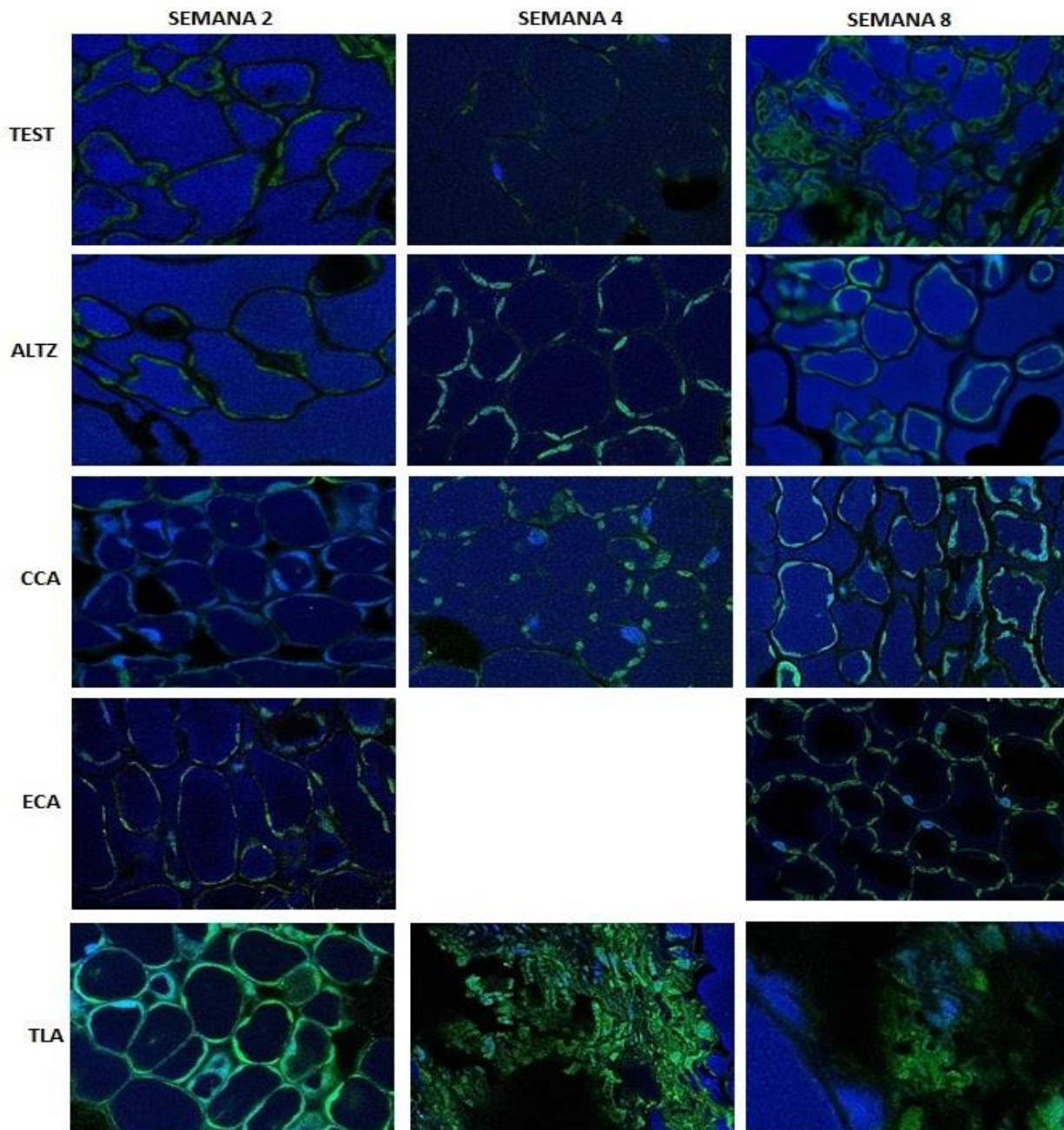
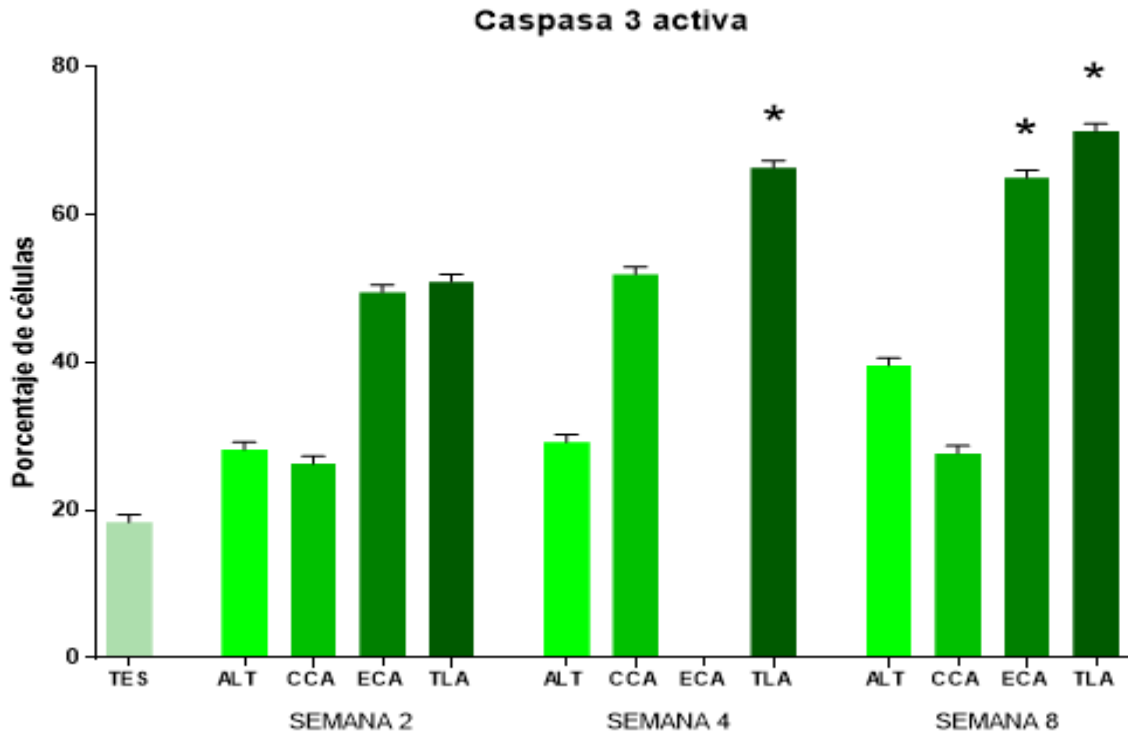


Figura 11. Imágenes al microscopio confocal de *Gnaphalium lavandulifolium*, inmunolocalización de la proteína Anti Caspasa-3 activa.

Mediante el programa de análisis de imágenes Image J (de dominio público), se detectó que la intensidad de la fluorescencia aumentó de manera directamente proporcional al tiempo de exposición para todos los sitios de estudio con respecto al testigo negativo, mostrando diferencias notablemente significativas en TLA durante la semana 4 y en la semana 8, las muestras de ECA y TLA mostraron el mismo comportamiento (Figura 11).

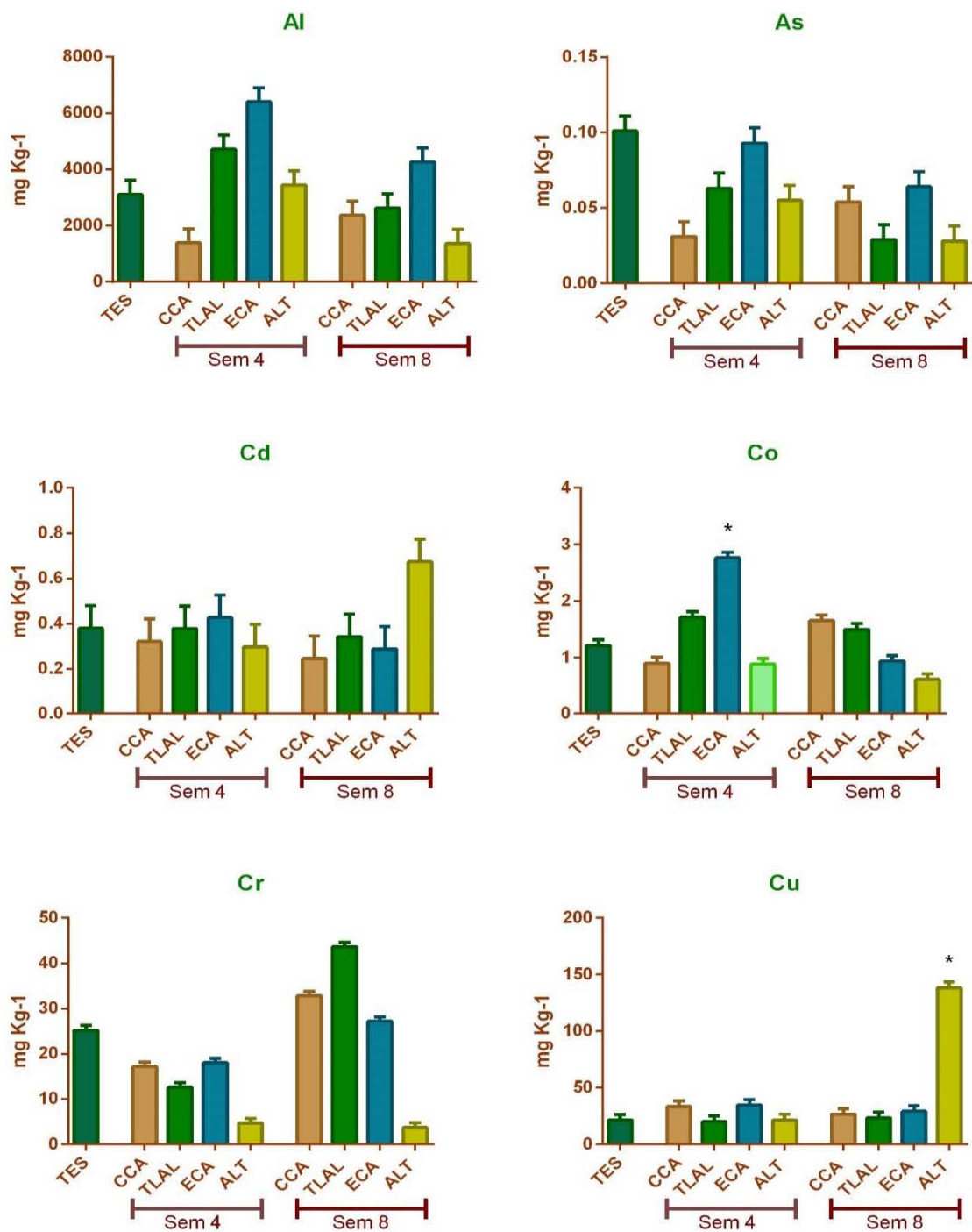


Gráfica 1. Análisis de imagen de la expresión de la proteína tipo-caspasa-3 activa \pm desviación estándar * indica la diferencia significativa entre el testigo y el sitio de exposición ANOVA, post hoc Kruskal-Wallis $p < 0.05$.

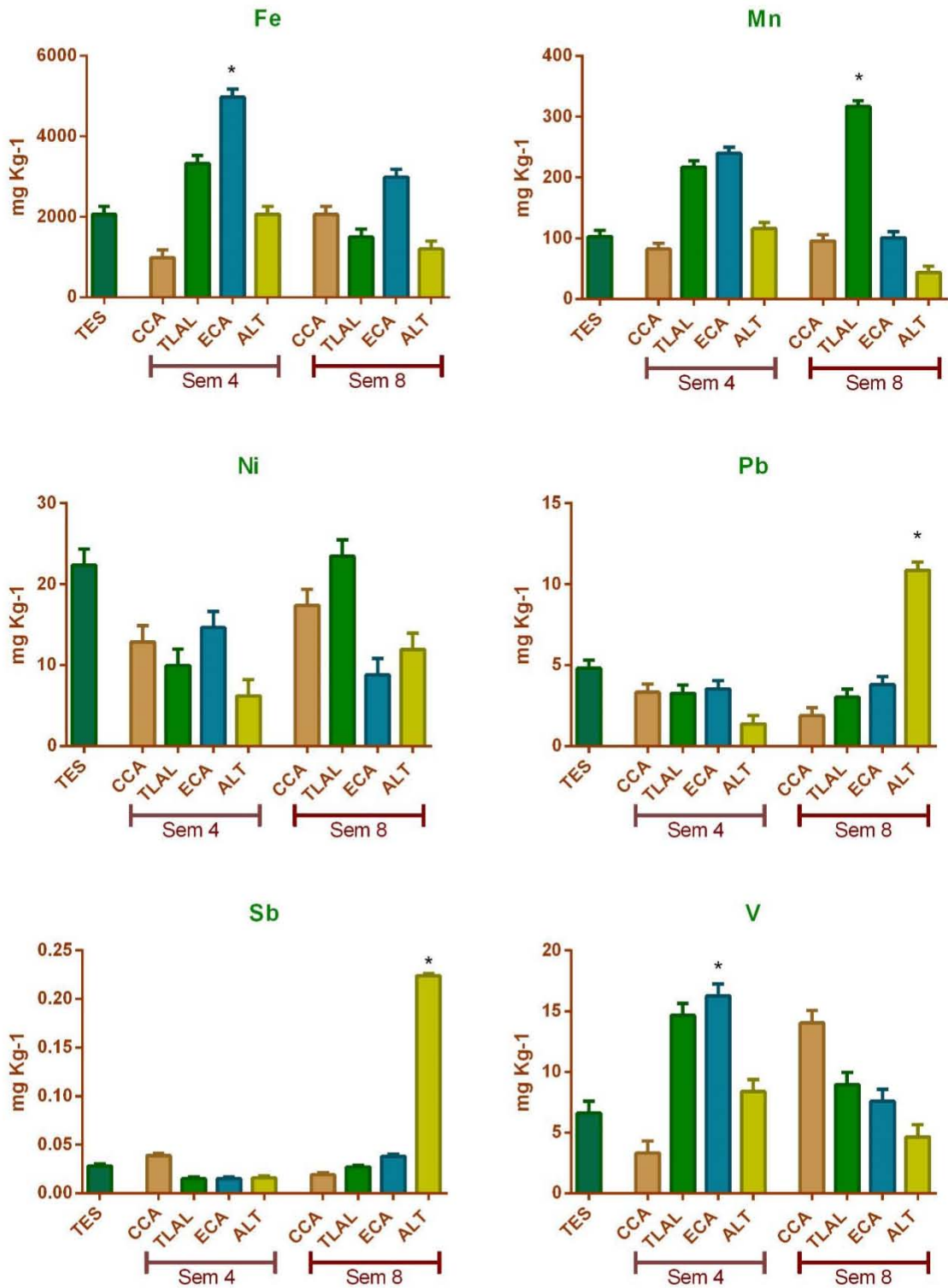
8.3 ANÁLISIS DE METALES PESADOS

El análisis mediante ICP-MS para determinar la concentración de metales pesados acumulados en las hojas de la planta, mostró que el Al, As, Cd y Ni mantuvieron valores similares o por debajo del testigo sin mostrar diferencias significativas. En el caso de Cr, se pudo observar una mayor concentración en la semana 8 de exposición, pero sin llegar a mostrar diferencia significativa. Por otro lado, el Co, Fe,

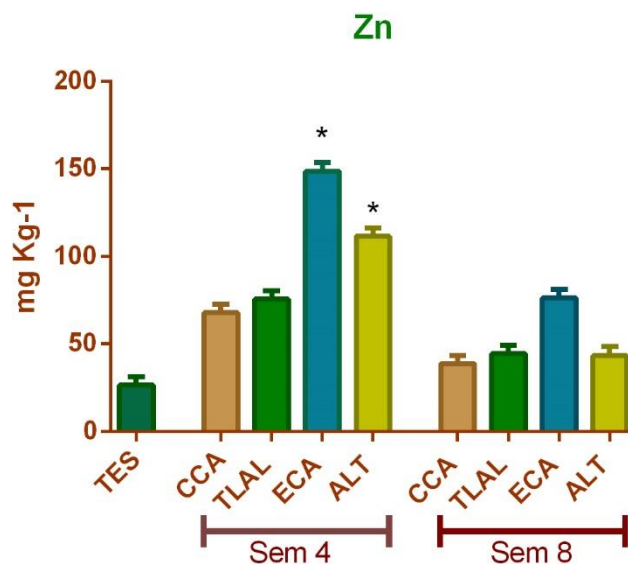
V y Zn se determinaron en altas concentraciones en la semana 4 de exposición y el Cu, Mn, Pb y Sb en la semana 8.



Gráfica 2. Metales pesados registrados por ICP-MS en *G. lavandulifolium*. ± desviación estandar.
* indica la diferencia significativa entre el testigo y el sitio de exposición ANOVA, post hoc Kruskal-Wallis $p < 0.05$.



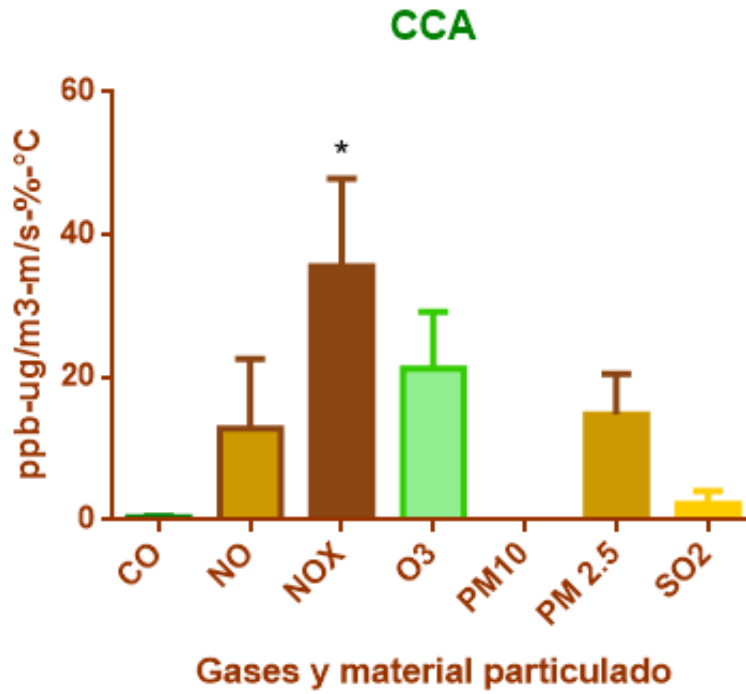
Gráfica 3. Metales pesados registrados por ICP-MS en *G. lavandulifolium*. ± desviación estandar.
 * indica la diferencia significativa entre el testigo y el sitio de exposición ANOVA, post hoc
 Kruskal-Wallis $p < 0.05$.



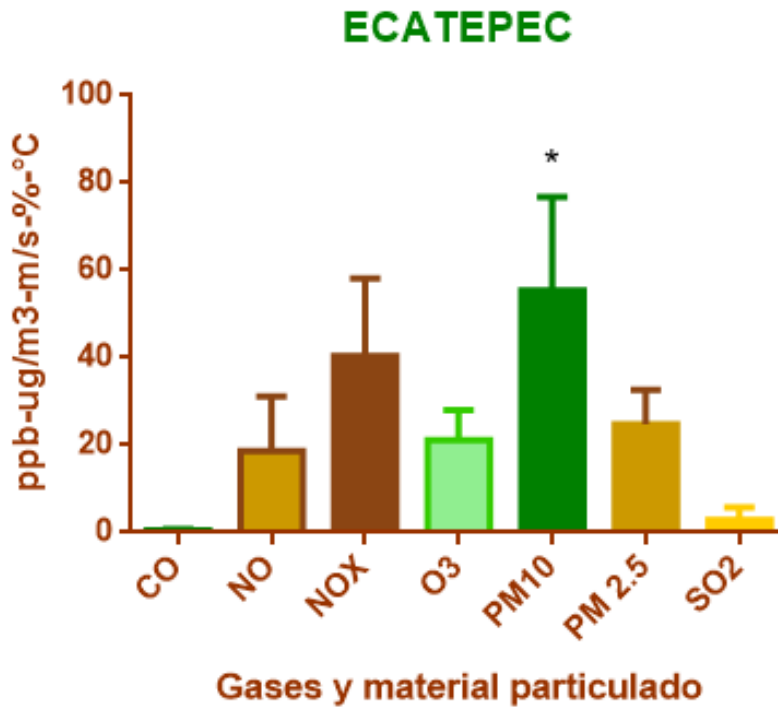
Gráfica 4. Metales pesados registrados por ICP-MS en *G. lavandulifolium*. \pm desviación estandar. * indica la diferencia significativa entre el testigo y el sitio de exposición ANOVA, post hoc Kruskal-Wallis $p < 0.05$.

8.4 ANÁLISIS DE GASES CONTAMINANTES

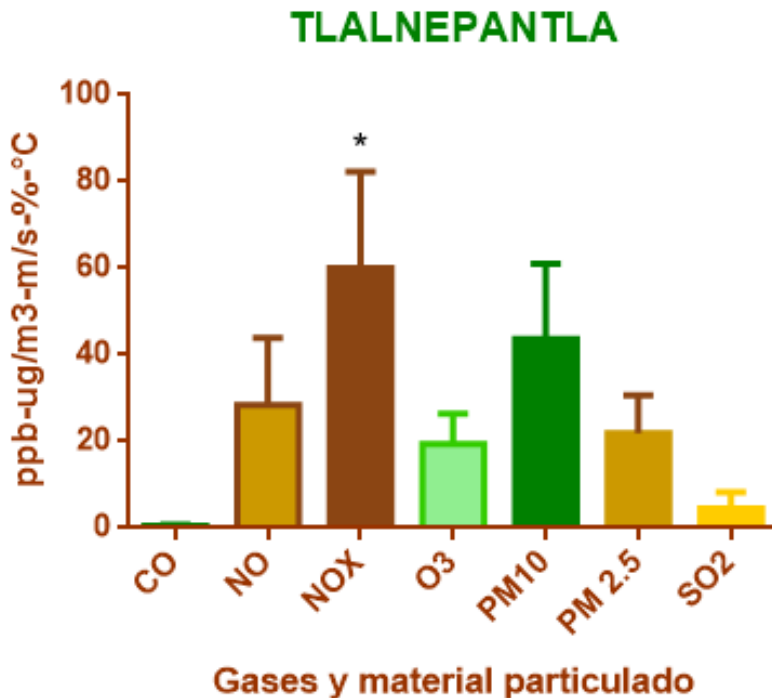
En las gráficas 5, 6 y 7 se muestra la concentración de los contaminantes atmosféricos registrados por la RAMA en cada estación, durante el tiempo de exposición de las plantas. Se detectaron nueve: CO, NO_x, CO, NO₂, NO_x, O₃, SO₂, PM_{2.5} y PM₁₀. En general, se puede observar que los gases tóxicos que permanecieron en concentraciones más elevadas durante todo el tiempo de exposición en los diferentes sitios, con relación al total determinado fueron los óxidos de nitrógeno que se mantuvieron constantes en las 3 estaciones de monitoreo y el material particulado PM₁₀.



Gráfica 5. Gases y material particulado registrados por la RAMA correspondiente a la estación CCA.



Gráfica 6. Gases y material particulado registrados por la RAMA correspondiente a la estación Ecatepec.



Gráfica 7. Gases y material particulado registrados por la RAMA correspondiente a la estación Tlalnepantla.

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados, se observó que el tipo de muerte generado en las hojas de *G. lavandulifolium* fue el de AL-PCD que de acuerdo con Reape y McCabe (2010) se puede definir por la presencia de cambios morfológicos en las estructuras celulares como la contracción del protoplasto, la formación de vacuolas y a nivel molecular, la degradación del ADN. En la muerte tipo autofagia se puede observar la formación masiva de autofagosomas en vacuolas líticas y en la necrosis un daño en la pared celular, fragmentación de la membrana y la vacuola, lo cual no se observó en esta investigación.

En las células foliares de *G. lavandulifolium* se presentó una característica morfológica relevante, que es la contracción del protoplasto separándose de la pared celular, la condensación de la cromatina y la formación de vacuolas característico de la muerte tipo AL-PCD. Esto se puede asociar con el aumento en

la concentración de los contaminantes atmosféricos y con la cantidad de metales pesados (Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb, V y Zn) registrados durante las semanas 4 y 8. Lo cual coincide con estudios que han reportado un aumento de la contracción del protoplasto al exponer las plantas a niveles altos de estrés (Reape *et al.*, 2008).

El mecanismo de ejecución de AL-PCD a menudo se asocia con la activación de moléculas similares a caspasas y la liberación de proteínas mitocondriales, incluido el citocromo C. Cortés-Eslava *et al.*, (2018), utilizaron un método similar al del presente trabajo, con raíz de haba y cebolla detectando aumento en la muerte celular por medio de la activación de la proteína tipo-caspasa-3 activa que fue inducida por exposición a diferentes concentraciones de dicromato de potasio, nitrato de níquel y dos plaguicidas organofosforados, en donde se observó un efecto dependiente de la concentración, similar al reportado en el presente trabajo.

El análisis estadístico aplicado a los valores obtenidos con el programa de análisis de imágenes confirmó que las muestras expuestas por un tiempo más largo mostraron mayor intensidad de la marca, lo que indica una mayor expresión del tipo caspasa-3 activa con respecto al testigo negativo, dando un mejor soporte a los resultados que se obtuvieron en esta investigación.

En el lapso que duró este estudio, los contaminantes con los niveles más altos fueron los NO_x y el PM₁₀. Los NO_x se han reportado capaces de inducir diversas lesiones al ingresar por vías estomáticas en las plantas, sin embargo, no se conoce si los efectos son directamente provocados por los NO_x. Algunos de los efectos que pueden inducir son manchas en las hojas, disminución de la tasa fotosintética y muerte celular tipo apoptosis (Chauhan *et al.*, 2003), siendo este último el que se presentó en las muestras observadas por microscopía.

En el caso del PM₁₀, pueden afectar a los sistemas vegetales por la penetración en la superficie de la hoja, o indirectamente a través de la interacción suelo-raíz (Jovanovick *et al.*, 2007). A nivel celular se ha reportado que las PM₁₀ tienen varios

mecanismos de efecto celular adverso, como la citotoxicidad a través de mecanismos de estrés oxidante por la producción de ERO y daño al DNA. La sobrecarga de PM puede causar la degradación de los pigmentos fotosintéticos y daños a la maquinaria fotosintética, lo que a su vez disminuye la fotosíntesis que conduce al estrés oxidante y a la muerte celular (Apel y Hirt, 2004), por lo que se puede inferir que estos contaminantes posiblemente contribuyeron a la inducción de muerte celular tipo apoptosis y por comparación morfológica sea la que se presentó en este trabajo, principalmente en las zonas industriales de Ecatepec y Tlalnepantla.

En cuanto a los metales pesados estos pueden tener diversos orígenes naturales como las erupciones volcánicas, las tormentas de arena o provenir de fuentes antropogénicas como la quema de combustibles fósiles, la industria minera o plaguicidas, etc. Las plantas utilizan los metales esenciales Cu, Mn, Fe y Zn en bajas concentraciones para realizar funciones biológicas, pero el exceso de éstos y la acumulación de metales no esenciales como el Co, Pb, Sb y V, pueden ser tóxicos y se han catalogado como contaminantes ambientales (Sha *et al.*, 2010). Al bioacumularse en los vegetales pueden provocar cambios en las células, alterando procesos mediante la activación o desactivación de vías metabólicas que catalizan la generación de ERO o radicales libres relacionados con estrés oxidante (Mousavi-Kouhi *et al.*, 2016). Derivando en muerte celular programada.

En el presente trabajo se evaluó la muerte celular tipo apoptosis posiblemente asociada a estrés oxidante provocado por metales pesados, en el caso del Sb y del V pueden causar inhibición significativa del crecimiento de las raíces y una reducción de la biomasa (García *et al.*, 2018). Otros como el Co, son capaces de generar estrés oxidante mediante mecanismos como por ejemplo la reacción de Fenton (Seinfeld y Pandis., 2006). Por lo cual en el sistema vegetal empleado en el presente estudio se puede inferir que el proceso de muerte celular derivó de la bioacumulación de estos metales.

En resumen, los metales son capaces de generar ERO a través de diferentes mecanismos, las ERO formadas por metales son mediadores claves responsables del daño al DNA y la modificación de proteínas en células y tejidos. Los metales también provocan la activación de factores de transcripción nuclear y diversas proteínas de señalización, además de detener el ciclo celular y la apoptosis. En este sentido, los estudios futuros deberán centrarse en definir redes de genes de respuesta, identificar moléculas objetivo de estrés oxidante inducido por metales, desarrollar biomarcadores eficientes y emplear individuos como *G. lavandulifolium* por su gran susceptibilidad a la exposición a este tipo de contaminantes.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo con la morfología observada, la evaluación de los contaminantes atmosféricos mediante microscopia indico que el tipo de muerte celular fue del tipo-apoptótico.

La inmunocitoquímica reveló la presencia de la proteína tipo Caspasa 3-activa en las muestras que se mantuvieron más tiempo expuestas a los contaminantes atmosféricos.

Se comprobó la sensibilidad de *Gnaphalium lavandulifolium* como biomonitor del daño celular inducido por contaminantes ambientales, como gases y metales pesados.

11. REFERENCIAS

- AAFCO. (1996). Association of American Feed Control Officials. Official Publication, 1993. 67. 230-236.
- Adrain C. y Martin S. J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *c*. Trends. Biochem. Sci. 26. 390-397.
- Ainsworth E., Yendrek C. R., Sitch S., Collins W. J. y Emberson L.D. (2012) The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. Annu. Rev. Plant Biol. 63. 637-661.
- Apel K. y Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55. 373-399.
- Arruti A., Fernández-Olmo I. y Irabien A. (2010) Evaluation of the contribution of local sources to trace metals levels in urban PM_{2.5} and PM₁₀ in the Cantabria region (Northern Spain). J. Environ. Monit. 12. 1451-1458.
- Atkinson R. y Arey J. (2003). Atmospheric degradation of volatile organic compounds. Chem. Rev. 103. 4605-4638.
- Beyersmann D. y Hartwig A. (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. Arch. Toxicol. 82. 493-512.
- Bloemen K., Verstraelen S., Van Den Heuvel R., Witters H., Nelissen I. y Schoeters G. (2007) The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. Immunol. Lett. 113. 6-18.
- Brown, S.K., Sim, M.R., Abramson, M.J. y Gray, C.N. (1994) Concentrations of Volatile Organic Compounds in Indoor Air – A Review. Indoor Air. 4. 123-134.
- Buell P. y Giarard J. (2003). Chemistry fundamentals and environmental perspective. second Edition. Jones and Bartlett, Sudbury, Massachusetts 326. 150-157.
- Burken, J. G. (2003). Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. Phytoremediation: transformation and control of contaminants. 59. 59-84.

- Calderón G. y Rzendowski J. (2005). Flora fanerógamica del valle de México. 2da ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán 20.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Butterworth F.M. y Amador-Muñoz O. (2004) The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat. Res.* 558. 7-17.
- Chaverri J. y Cardenas N. (2018). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. *Aspectos básicos. Educación Química.* 53. 157-164.
- 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 airgenotoxins using bacteria, human cells and plants. *Chem.* 120. 221-229.
- Chauhan A., Inskip H., Linaker C., Smith S., Schreiber J., Johnston S. y Holgate S. (2003). Personal exposure to nitrogen dioxide and the severity of virus induced asthma in children. *LANCET* 361. 1939-1944.
- Cortés-Eslava J. Gómez-Arroyo S., Risueño M. y Testillano P. (2018). The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models, *Environ. Pollut.* 240. 77-86.
- Danon A., Delorne V., Mailhac N. y Gallois P. (2000) Plan programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38. 647-655.
- Weigel, H., Halbwegs, G. y Jäger, H. (1989). The effects of air pollutants on forest trees from a plant physiological view. *J. Plant Dis. Prot.* 96. 203-217.
- de Foy B., Burton. S., Ferrare R. y Hostetler C. (2011) Aerosol plume transport and transformation in high spectral resolution lidar measurements and WRF-Flexpart simulations during the MILAGRO field campaign *Atmos. Chem. Phys.* 11. 3543-3551.
- Di Palma A., Capozzi F., Spagnuolo V., Giordano S. y Adamo P. (2017) Atmospheric particulate matter intercepted by moss-bags: Relations to moss trace element uptake and land use. *Chem.* 176. 361-368
- Duffus J. (2002). Heavy metals-a meaningless term? *Pure Appl. Chem.* 74. 793–807.

- Earnshaw W., Martins L. y Kaufmann S. (1999) Mammalian caspases: structure activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68. 383-424.
- Fergusson J. (1990). *The Heavy Elements: Chem. Environ. Impact and Health Effects.* Oxford: Pergamon Press 11. 54-60.
- Fulda S. (2018) Therapeutic opportunities based on caspase modulation. *Semin Cell Dev Biol.* 86. 150-157.
- Gadjev I., Stone J., Gechev T. (2008) Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 270. 87-94.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S., Abrams J., Adam D., Agostinis P., Alnemri E., Altucci L., Amelio I. y Andrews D. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25. 486-497.
- García L. y Rubiano O. (1984). Comunidades de líquenes como indicadores de niveles de calidad del aire en Colombia. *Contamin. Ambient.* 8. 73-80.
- García-Jiménez A., Trejo-Téllez L., Guillén-Sánchez D. y Gómez-Merino F. (2018) Vanadium stimulates pepper plant growth and flowering, increases concentrations of amino acids, sugars and chlorophylls, and modifies nutrient concentrations. *PLoS One.* 567. 9-13.
- Georgieva M., Peychera E., Tashev A., Djingova R. y Miloshev G. (2011). Study of the effect of heavy metal pollution on the genoma of plant species *Taraxacum officinale web* (Asteraceae): A preliminary. *Metal. Pes. And Plants. Report. Science & Technologies.* 675. 45-52.
- Godish T. (2003) *Air Quality.* 4th edn. Boca Raton, FL: CRC Press. Health Effects Institute. Revised Analyses of Time-Series Studies of Air Pollution and Health. Special Report. Boston, MA: Health Effects Institute. 2. 245-253.
- Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Loza-Gómez P., Arenas-Huertero F., Grutter M. y Morton-Bermea O. (2018). In situ biomonitoring of air quality in rural and urban environments of Mexico Valley through genotoxicity evaluated in wild plants. *Atmos. Pollut. Res.* 9. 119-125.

- Gopal R., Dube B., Pratima S. y Chatterjee C. (2003) Cobalt Toxicity Effects on Growth and Metabolism of Tomato. *Comm. Soil Sci. Plant Analysis*. 947. 619-628.
- Grant W., Zinov'eva-Stahevitch A. y Zura K. (1981) Plant Genetic Test Systems for the Detection of Chemical Mutagens. In: Stich H.F., San R.H.C. (eds) *Short-Term Tests for Chemical Carcinogens*. Topics in Environ. Physiol. Med. Springer, New York. 756. 612-623.
- Grant F. (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 35. 175-185.
- Hale K., McGrath S., Lombi E., Stack S., Terry N., Pickering I., George G. y Pilon-Smits A. (2001) Molybdenum sequestration in *Brassica* species. A role for anthocyanins? *Plant Physiol.* 126. 1391-1402.
- Harrison-Lowe, N. y Olsen, L. (2006). Isolation of glyoxysomes from pumpkin cotyledons. *Curr. Protoc. Cell. Biol.* Chap. 3. 9-28.
- He Z., Yang X. y Stoffella P. (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem Med Biol.* 19. 125-140.
- Heath R. (1999). *Biochemical processes in an ecosystem: How should they be measured?* Kluwer academic publishers. 116. 279-298.
- Heath R. Lefohn A. y Musselman, R. (2009). Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment*. 539. 2919-2928.
- IARC. (2013). *Air pollution and cancer*. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications N° 161. France. 240-251.
- INEGI. (2016a). *Estadísticas de vehículos de motor registrados en circulación*, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Consultado en septiembre de 2019.
- INEGI. (2016b). *Estadísticas de vehículos de motor registrados en circulación*. México, En <http://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/Proyectos/bd/continuas/transporte/vehiculos.asp?s=13158>. Consultado el 3 de junio de 2019.
- Jovanovic M., Lefebvre V., Laporte P., Gonzalez-Rizzo S., Lelandais-Brière C., Frugier F., Hartmann C. y Crespi M. (2007). How the environment regulates root

- architecture in dicots K. Jean-Claude, D. Michel (Eds.), *Advances in Botanical Research*, Acad. Press. 46. 35-74.
- Kleinman M. (2000). Carbon monoxide. In: Lippmann M (ed.) *Environmental Toxicants: Human Exposures and their Health Effects*. Hoboken, 35. 256-263.
- Kong W., Zhang L., Guo K., Liu Z. y Yang Z. (2010) Carbon monoxide improves adaptation of *Arabidopsis* to iron deficiency. *Plant Biotech. J.* 36. 88-99.
- Kuriyama H. y Fukuda H. (2002) Developmental programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6. 568-573.
- Låg M., Øvrevik J., Totlandsdal A., Lilleaas E., Thormodsæter A., Holme J., Schwarze P. y Refsnes M. (2016) Air pollution-related metals induce differential cytokine responses in bronchial epithelial cells. *Tox. In Vitro.* 46. 53-65.
- Lennon S., Martin S. y Cotter T. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24. 203-214.
- Lockshin R. y Zakeri Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36. 2405-2419.
- Loomis D., Grosse Y., Lauby-Secretan B., Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Baan R., Mattock H. y Straif K. (2013) International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14. 1262-1273.
- Lwalaba J., Lwalaba W., Tennyson L., Zvobgo G., Eusi M., Richmond A., Fu L., Naz S., Mwamba M., Prince R., Mundende M. y Zhang G. (2008). Physiological and molecular mechanisms of cobalt and copper interaction in causing phyto-toxicity to two barley genotypes differing in Co tolerance, *Ecotox. Environ. Safety.* Vol. 187. 6507-6513.
- Mammone, T., Gan, D. y Collins, D. (2000) Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. *Cell Biol. Tox.* 746. 293–302.
- Miguel-Pérez G., Maya G., Flores-Márquez A.R., Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Eguía-Aguilar P., Perez Peña-Díaz M. y Arenas-Huertero F. (2013). Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón. *Boletín Médico del Hospital. Infantil de México.* 846. 107-115.

- Molina, L., Kolb C., de Foy B., Lamb B., Brune W., Jimenez J., Ramos-Villegas J, Sarmiento P., Víctor-Hugo C., Beatriz V., Gutierrez-Avedoy M. (2007). Air quality in North America's most populous city? overview of MCMA-2003 Campaign. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 84. 2447-2456.
- Molina L., Madronich S., Gaffney J. y Apel E. (2010) An overview of the MILAGRO 2006 campaign: Mexico City emissions and their transport and transformation *Atmos. Chem. Phys.* 10. 8697-8760.
- Mousavi K., Kouhi S., Lahouti M., Ganjeali A. y Entezari M. (2016). Anatomical and ultrastructural responses of *Brassica napus* after long-term exposure to excess zinc. *Turk. J. Biol.* 75. 52-60.
- Nawaz M., Jiao Y. y Chen C. (2018). Melatonin pretreatment improves vanadium stress tolerance of watermelon seedlings by reducing vanadium concentration in the leaves and regulating melatonin biosynthesis and antioxidant-related gene expression *J. Plant Physiol.* 85. 115-127.
- Nikic D. y Stankovic A. (2005). Air pollution as a risk factor for lung cancer. *Institute of Oncology* 13. 68-79.
- 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 respecto al dióxido de azufre (SO₂). Valor normado para la concentración del 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 de 2014.
- 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 de 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.

Pan X, Yue W, He K. y Tong S. (2007) Health benefit evaluation of the energy use scenarios in Beijing, China. *Sci. Tot. Environ.* 85. 242–251.

Pardos J. (2006). La contaminación atmosférica y los ecosistemas forestales, cambio global y polución atmosférica. Efectos sobre el arbolado. ETS de Ingenieros de montes. UPM. España. 947. 55-77.

Peltonen P., Vapaavuori E., Heinonen J., Julkunen-tiitto R., Holopainen J. (2010). Do elevated atmospheric CO₂ and O₃ affect food quality and performance of folivorous insects on silver birch? *Glob. Change Biol.* 47. 928–935.

Prieto-Méndez J., Gonzales-Ramírez C., Román-Gutiérrez A. y Prieto-García F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y aguas. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 94. 29-44.

Qin G. y Meng Z. (2005). Effect of sulfur dioxide inhalation on CYP1A1 and CYP1A2 in rat liver and lung. *Toxicology Letters.* 312. 34–42.

Rai P. (2016). Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring, Ecotoxicology and Environmental Safety. 64. 120-136.

Rai R., Rajput M., Agrawal M. y Agrawal S. (2011). Gaseous air pollutants: A review on current and future trends of emissions and impact on agriculture. *Sci. Res.* 95. 77-102.

Reape T., Molony E., McCabe P. (2008). Muerte celular programada en plantas: distinción entre diferentes modos. *J. Exp. Bot.* 984. 435 – 444.

Reape T. y McCabe P. (2010). Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis.* 578. 249-256.

Rodrigues G., Ma T., Pimentel D. y Weinstein L. (1997). *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 56. 325-359.

Rogers H. (2006). Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany.* 97. 209-215.

- Rosales-Castillo., José A., Torres-Meza L., Víctor M., Olaiz-Fernández G. y Borja-Aburto. (2001). Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud pública México*. 67. 544-555.
- Sanmartin M., Jaroszewski L., Raikhel, N. y Rojo E. (2005). Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant. Physiol.* 841-847.
- Sansón D. y Zavaleta E. (2011). Respuesta de Hipersensibilidad, una Muerte Celular Programada para Defenderse del Ataque por Fitopatógenos. *Rev. Mex. fitopatol.* 29. 34-46.
- Santos C., Pourrut B. y Ferreira J. (2015). The use of comet assay in plant toxicology: recent advances *Front. Genet.* 37. 216-234.
- Savill J. y Fadok V. (2000) Corpore clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 92. 784-788.
- Seinfeld J. y Pandis S. (2006). Atmospheric chemistry and physics: From air pollution to climate change. John Wiley and Sons; New York. 72. 204–275.
- Sekhar K., Rao S., John S. y Haldane R. (2014) The father of oxygen therapy. *Indian J. of Anaesthesia.* 456. 350–352.
- SEMARNAT y CONAPO. (2013) Programa de manejo Parque Nacional Iztaccihuatl Popocatepetl, México 185.
- Shah F., Ahmad N., Massod K., Peralta-Videa J. y Ahmad F. (2010). Heavy Metal Toxicity in Plants. *Plant Adaptation and Phytoremediation.* Springer. 48. 345-367.
- Shintani, T. y Klionsky, D. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. 647.990-995.
- Snigdha S., Smith E., Prieto G. y Cotman C. (2012). Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci. Bull.* 51. 14-24.
- Souri A., Choi Y., Jeon W., Woo J., Zhang Q. y Kurokawa J. (2017). Remote sensing evidence of decadal changes in major tropospheric ozone precursors over East Asia. *J Geophys Res.* 56. 2474–2492.

- Stahl R. (1997). Can mammalian and non-mammalian sentinel species data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 798. 329-335.
- Taiz L. y Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*. Sunderland, Sinauer. 699. 423-237.
- Thomas S., Franklin-Tong, V. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*. 24. 305-09.
- Tsapras P. Nezis I. (2017). Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ.* 64. 1369-1379.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. (2017). Particulate Matter (PM) Pollution En: <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM>. Consultado el 14 de junio de 2019.
- Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S., y Amador-Muñoz O. (2000). Genetic monitoring of airborne particles, in: F. Butterworth, A. Gunatilaka, M. Gonsebatt (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, vol. II, Kluwer Academic/Plenum Publishing Corp., New York. 654. 457–486.
- Wang S. y Shi X. (2001). Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell Biochem.* 53. 3–9.
- WHO. (2014). recuperado de www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/. Consultado el 15 de junio de 2019.
- WHO. (2007). *Global Surveillance, Prevention and Control of Chronic Respiratory Diseases*. Geneva, Switzerland: WHO Press. 83. 15–6.
- Win-Shwe T., Fujimaki H., Arashidani K. y Kunugita N. (2013). Indoor Volatile Organic Compounds and chemical sensitivity reactions. *Clin. Dev. Immunol.* 43. 623-644.
- Zulfiqar U., Muhammad F., Saddam H., Muhammad M., Mubshar H., Muhammad I., Muhammad A. y Muhammad Z. (2019). Lead toxicity in plants: Impacts and remediation, *Journal of Environ. Manage.* 45. 250-263.