



Universidad Nacional Autónoma de México
Maestría en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Exposición prenatal a material particulado y ozono, su asociación con el contenido de ADN mitocondrial placentario.

Tesis

Para optar por el grado de:
Maestro en ciencias

Presenta:

David Alejandro Rodríguez Moreno

Tutora Principal:

Dra. María Eugenia Gosebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Miembros Del Comité Tutor:

Dra. Claudia María García Cuellar
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Julio, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	1
TABLA DE CONTENIDO	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
FINANCIAMIENTO	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	13
➤ 1.1 Contaminación atmosférica	13
➤ 1.2 Contaminación atmosférica en la ZMVM	14
➤ 1.3 Presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el PM de la ZMVM	15
➤ 1.4 Efectos de la contaminación atmosférica en la salud durante el embarazo	16
➤ 1.5 Importancia de la placenta y los efectos nocivos de la contaminación atmosférica en tejido placentario	17
➤ 1.6 Contenido ADNmt como biomarcador de daño	17
➤ 1.7 Asociación entre la exposición contaminación atmosférica y el contenido de ADNmt placentario	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
➤ 4.1 Objetivo general	21
➤ 4.2 Objetivo específico	21
5. MÉTODOS	22
➤ 5.1 Población de estudio	22
➤ 5.2 Modelo 1: estimación de la exposición a contaminación atmosférica	22
➤ 5.3 Modelo 2: estimación de la exposición a contaminación atmosférica	23
➤ 5.4 Determinación el contenido de ADNmt placentario	25
➤ 5.5 Determinación del número de aductos de ADN en leucocitos de sangre materna y de sangre de cordón umbilical	26
➤ 5.6 Análisis estadísticos	26

6. RESULTADOS	27
➤ 6.1 Población de estudio	27
➤ 6.2 Comportamiento del PM_{10} $PM_{2.5}$ y O_3 en la ZMVM durante los años de estudio (Modelo 1).....	28
➤ 6.3 Exposición gestacional a PM_{10} $PM_{2.5}$ y O_3 (Modelo 1)	29
➤ 6.4 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 1) y el contenido relativo de ADNmt placentario	30
➤ 6.5 Exposición gestacional a contaminación atmosférica (Modelo 2).....	33
➤ 6.6 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 2) y el contenido relativo de ADNmt placentario	34
7. DISCUSIÓN	36
➤ 7.1 Comportamiento del PM_{10} $PM_{2.5}$ y O_3 en la ZMVM durante los años de estudio (Modelo 1).....	36
➤ 7.2 Exposición gestacional a PM_{10} $PM_{2.5}$ y O_3 (Modelo 1).....	36
➤ 7.3 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 1) y el contenido relativo de ADNmt placentario	37
➤ 7.4 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 2) y el contenido relativo de ADNmt.....	42
8. LIMITACIONES	43
9. PERSPECTIVAS	43
10. CONCLUSIONES	44
11. AGRADECIMIENTOS	45
12. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ventanas de tiempo analizadas en el modelo 1	23
Figura 2. Representación gráfica del modelo 2.....	24
Figura 3. Comportamiento de PM_{10} y $PM_{2.5}$ en la ZMVM durante los años de estudio.....	28
Figura 4. Comportamiento del O_3 en la ZMVM durante los años de estudio.....	29
Figura 5. Exposición media de los binomios a PM_{10} , $PM_{2.5}$ y O_3 , en el último mes, últimos dos meses y últimos tres meses del embarazo	30
Figura 6. Correlación entre los niveles de exposición a PM_{10} en el último mes, últimos dos meses y tercer trimestre del embarazo, con el contenido relativo de ADNmt placentario.....	31
Figura 7. Comparación estacional del contenido relativo de ADNmt placentario.....	32
Figura 8. Correlación entre los niveles de exposición a PM_{10} en el tercer trimestre del embarazo, con contenido relativo de ADNmt placentario agrupado por temporadas.....	33
Figura 9. Imagen resumen.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de concentración límites establecidos en las NOM, y sugeridos por la OMS para los contaminantes criterio.....	15
Tabla 2 Agentes ambientales que modifican el contenido de ADNmt en placenta o en sangre de cordón umbilical.....	20
Tabla 3. Descripción de los tipos de fuentes de emisión	23
Tabla 4. Reactivos y volúmenes usados por reacción de qPCR	25
Tabla 5. Información de los primers usados.....	25
Tabla 6. Características de la población de estudio	27
Tabla 7. Correlaciones de Spearman entre el contenido relativo de ADNmt placentario y la exposición a PM10 PM2.5 y O3 en las diferentes ventanas de tiempo.....	30
Tabla 8. Correlaciones de Spearman entre el número de copias de ADNmt placentario y las medidas perinatales, edad materna y aductos	32
Tabla 9. Valores de exposición a contaminantes atmosféricos.....	34
Tabla 10. Correlaciones de Spearman entre los diferentes contaminantes y el contenido relativo de ADNmt placentario.....	35
Tabla 11. Estudios donde se ha asociado la exposición a contaminantes atmosféricos con el aumento del contenido relativo de ADNmt	38

ABREVIATURAS

3-NT: 3-nitrotirosina

8-OHdG: 8 hidroxí-desoxiguanosina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNnuc: ADN nuclear

AIF: factor inductor de la apoptosis.

AIF: Factor inductor de la apoptosis

APEX1: Endodesoxirribonucleasa 1 apurínica /apirimidínica

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

B[a]P: Benzo[a]pireno

CDMX: Ciudad de México

CO: Monóxido de carbono

COT: Compuestos orgánicos totales

COV: Compuestos orgánicos volátiles

CYP: Citocromos P450.

CYP1A1: Citocromos P450 de las subfamilias de 1A.

CYP1B1: Citocromos P450 de las subfamilias de 1B

CytC: Citocromo C.

EDOMEX: Estado de México

ERCC4: Subunidad catalítica de endonucleasa de reparación por escisión 4

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HCM: Míocitos cardíacos humanos primarios

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

K562: Línea celular de leucemia mieloide crónica

MOLT-4: leucemia linfoblástica aguda humana de células T

MRC-5: Cepa celular 5 del Consejo de Investigación Médica de Reino Unido

NO₂: dióxido de nitrógeno

NOX: Óxidos de nitrógeno

NOM: Norma Oficial Mexicana

O₃: Ozono

OGG1: 8-oxoguanina glicosilasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}

PM: Material particulado

PM_{2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm

PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SIMAT: Sistema de monitoreo atmosférico

SO₂: Dióxido de azufre

ROS: Especies reactivas de oxígeno

THP-1: Línea celular monocítica de leucemia humana

TOX: Compuestos tóxicos

TRAP: Contaminantes del aire relacionados con el tráfico

ZMVM: Zona Metropolitana del Valle de México

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el programa de Salud y Ambiente del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Red SAI CONACYT 29450, PAPIT IN208914, CONACYT 219887 y por la Fundación Miguel Alemán. Y por la beca de maestría número 1008125 otorgada por CONACYT al alumno David Alejandro Rodríguez Moreno.

RESUMEN

Introducción:

La exposición gestacional a contaminación atmosférica se ha asociado con diversos efectos adversos en la salud durante el embarazo. Uno de los órganos que se ve afectado durante la gestación por contaminantes atmosféricos es la placenta, la cual tiene como función la producción de hormonas, el transporte de gases, nutrientes y desechos. Las mitocondrias además de su rol esencial en la producción de adenosín trifosfato (ATP), participan en numerosas vías de señalización como las apoptóticas, en la biosíntesis de nucleótidos, lípidos, y de los grupos hemo y hierro-sulfuro. Su función es crítica para un embarazo sano. Recientemente se ha empleado el contenido relativo de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (ADNmt) como biomarcador de daño en estudios de contaminación, así como en diversas enfermedades.

Metodología:

Nosotros correlacionamos el contenido relativo de ADNmt placentario con la exposición gestacional a contaminantes atmosféricos en mujeres residentes de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM). Se reclutaron 88 mujeres voluntarias que dieron a luz en el Hospital de Ginec Obstetricia en el Centro Médico la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), entre 2014 y 2015. Al momento del parto se tomaron muestras de la cara fetal de la placenta. Se determinó el contenido relativo de ADNmt placentario mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Se estimó la exposición a contaminantes atmosféricos de dos maneras. En la primera se estimó la exposición a material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm (PM_{10}) y de ozono (O_3) haciendo uso de los datos reportados por la red de monitoreo del Programa de gestión para mejorar la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México (Proaire) correspondientes a los periodos de gestación de las voluntarias. Para la segunda se estimó la exposición acumulada anual a compuestos orgánicos totales (COT), compuestos orgánicos volátiles (COV), compuestos tóxicos (TOX), óxidos de nitrógeno (NOX), PM_{10} , y $\text{PM}_{2.5}$ empleando el software Motor Vehicle Emission Simulator for México (MOVES-México).

Resultados:

Encontramos correlaciones positivas entre el contenido relativo de ADNmt placentario y los valores estimados de exposición del modelo 1 para PM_{10} en el último mes ($\rho=0.5372$, $P<0.0001$), últimos dos meses ($\rho=0.6849$, $P<0.0001$), últimos tres meses ($\rho=0.7492$, $P<0.0001$), y todo el embarazo ($\rho=0.2128$, $P=0.0465$). Asimismo, los niveles de ADNmt correlacionaron con los niveles de $\text{PM}_{2.5}$ durante el último mes ($\rho=0.1810$, $P=0.0458$), últimos dos meses ($\rho=0.5626$, $P<0.0001$) y último trimestre de gestación ($\rho=0.6846$, $P<0.0001$), y con los niveles de O_3 en el último mes ($\rho=0.4608$, $P<0.0001$) y últimos dos meses ($\rho=0.4748$, $P<0.0001$). Además, encontramos correlaciones con el número de aductos en leucocitos de sangre de cordón umbilical ($\rho=0.2739$, $P=0.0049$), y de sangre materna ($\rho=0.1816$, $P=0.0452$), que se habían determinado previamente.

No se encontraron correlaciones entre el contenido relativo de ADNmt placentario y la exposición anual acumulada a COT, COV, TOX, NOX, PM₁₀, y PM_{2.5} estimados empleando el Modelo 2.

Conclusiones:

Concluimos que el aumento del contenido relativo de ADNmt placentario podría ocurrir como un mecanismo compensatorio al daño causado por los aductos y el estrés oxidante, inducidos por los contaminantes atmosféricos.

No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido relativo de ADNmt placentario y los valores de exposición anual acumulada estimados por el modelo 2, probablemente por la falta de resolución temporal del mismo.

ABSTRACT

Introduction:

Gestational exposure to air pollution has been associated with various adverse health effects during pregnancy. One of the organs that is affected during pregnancy by atmospheric pollutants is the placenta, whose function is the production of hormones, the transport of gases, nutrients and waste. Mitochondria, in addition to their essential role in the production of ATP, participate in numerous signaling pathways such as apoptosis, in the biosynthesis of nucleotides, lipids, and heme and iron-sulfide groups. Its function is critical for a healthy pregnancy. The relative content of mtDNA has recently been used as a biomarker of damage in contamination studies, as well as in various diseases.

Methodology:

We correlated the relative content of placental mtDNA with gestational exposure to air pollutants in women residing in the ZMVM. 88 volunteer women who gave birth at the Obstetrics and Gynecology Hospital at the La Raza Medical Center of the IMSS were recruited between 2014 and 2015. At the time of delivery, samples were taken from the fetal face of the placenta. The relative content of placental mtDNA was determined by qPCR.

Exposure to air pollutants was estimated in two ways. In the first, exposure to particulate matter with an aerodynamic diameter equal to or less than 2.5 μm (PM_{2.5}) with an aerodynamic diameter equal to or less than 10 μm (PM₁₀) and ozone (O₃) was estimated using the data reported by the monitoring network of the Management Program to improve air quality in the Metropolitan Area of the Valley of Mexico (Proaire) corresponding to the gestation periods of the volunteers. For the second, the annual accumulated total organic compounds (TOC), volatile organic compounds (VOC), toxic compounds (TOX), nitrogen oxides (NOX), PM₁₀, and PM_{2.5} were estimated using the Motor Vehicle Emission Simulator software to Mexico (MOVES-Mexico).

Results:

We found positive correlations between the relative content of placental mtDNA and the exposure estimates from model 1 for PM₁₀ in the last month ($\rho=0.5372$, $P<0.0001$), last two months ($\rho=0.6849$, $P<0.0001$), last three months ($\rho=0.7492$, $P<0.0001$), and the entire pregnancy ($\rho=0.2128$, $P=0.0465$). Likewise, ADMmt levels correlated with PM_{2.5} levels during the last month ($\rho=0.1810$, $P=0.0458$), last two months ($\rho=0.5626$, $P<0.0001$) and last trimester of pregnancy ($\rho=0.6846$, $P<0.0001$), and with the O₃ levels in the last month ($\rho=0.4608$, $P<0.0001$) and last two months ($\rho=0.4748$, $P<0.0001$). In addition, we found correlations with the number of adducts in leukocytes from umbilical cord blood ($\rho=0.2739$, $P=0.0049$), and from maternal blood ($\rho=0.1816$, $P=0.0452$), which had been previously determined.

No correlations were found between the relative content of placental mtDNA and the cumulative annual exposure to TOC, VOC, TOX, NOX, PM₁₀, and PM_{2.5} estimated using Model 2.

Conclusions:

We conclude that the increase in the relative content of placental mtDNA could occur as a compensatory mechanism for damage caused by adducts and oxidative stress induced by atmospheric pollutants.

No statistically significant correlations were found between the relative content of placental mtDNA and the cumulative annual exposure values estimated by model 2, probably due to its lack of temporal resolution.

1. INTRODUCCIÓN

➤ 1.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica es producto de la actividad humana biogénica, eólica y volcánica, ocurre principalmente en las grandes concentraciones urbanas en todo el mundo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que el 92% de la población mundial vive las zonas donde se superan las concentraciones límites de contaminantes atmosféricos sugeridos por la misma organización (OMS, 2016). Las emanaciones industriales, de los automóviles y los medios de transporte, las generadas en los hogares y hasta por fenómenos naturales como las erupciones volcánicas y las tormentas, generan gases, vapores y partículas que se incorporan al aire que respiramos. Existe suficiente evidencia que demuestra el impacto en la salud humana de estos agentes.

Se estima que este tipo de contaminación causó más de 7 millones de muertes en el mundo, en el 2015 (Landrigan *et al.*, 2017). La información científica que demuestra su efecto nocivo llevó a que esta fuera clasificada en el grupo 1 de agentes carcinogénicos para el ser humano, por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) (IARC, 2013).

Uno de los componentes de la contaminación atmosférica el material particulado (PM), el cual es una mezcla compleja con composición heterogénea de partículas líquidas y sólidas que se encuentran suspendidas en el aire. Estando entre sus principales componentes los sulfatos, el amoníaco, los nitratos, el cloruro de sodio, los polvos minerales, el hollín y el agua (OMS, 2018).

Estimaciones, realizadas con el modelo de transporte químico GEOS-Chem describen que únicamente el PM_{2.5} proveniente de la quema de combustibles fósiles, causa unos 8.7 millones de muertes prematuras al año (Vohra *et al.*, 2021).

Durante la gestación y los primeros 5 años de la infancia, existe una mayor susceptibilidad al daño causado por la contaminación atmosférica, dado que el organismo se encuentra en desarrollo y muchos sistemas son inmaduros como el sistema nervioso, pulmones, y sistema inmunológico (Bateson y Schwartz, 2007). Se estima que, en el año 2016, la contaminación en general fue responsable de la muerte de al menos 940.000 niños a nivel mundial, dos tercios de estos menores a 5 años (Landrigan *et al.*, 2019).

➤ 1.2 Contaminación atmosférica en la ZMVM

La ZMVM, que comprende a la Ciudad de México (CDMX) y municipios circunvecinos del Estado de México (EDOMEX), Morelos y Puebla, tiene problemas de calidad del aire, los cuales son originados por múltiples factores como; la combustión incompleta causada por un 23% de oxígeno menos comparado con el presente a nivel del mar, dada la altura promedio de área (2240 msnm) (Mugica *et al.*, 2010). Además, esta zona está geográficamente rodeada por el eje neovolcánico transversal y sistemas anticiclónicos naturales que generan una baja velocidad de los vientos en la superficie, lo que evita o dificulta la dispersión de los contaminantes (Mugica *et al.*, 2010).

Aunado a ello, es una de las zonas metropolitanas más grandes del mundo con aproximadamente 22 millones de habitantes reportados para el 2020 (INEGI, 2021).

El monitoreo de los principales contaminantes atmosféricos regulados que afectan la salud humana y los ecosistemas, denominados contaminantes criterio en la ZMVM, está a cargo del sistema de monitoreo atmosférico de la CDMX (SIMAT) de la Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA) (Contrera *et al.*, 2013; SEDEMA, 2018). Esta institución reporta la calidad del aire por día y a lo largo del mismo, en categorías que van de buena a extremadamente mala (SEDEMA, 2017). El registro por hora de los niveles de los contaminantes criterio es libre acceso y se encuentra publicado en el enlace <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php>.

El SIMAT cuenta con más de 40 estaciones repartidas entre la CDMX y la zona conurbada del EDOMEX, para el monitoreo y la recolección de datos de los contaminantes criterios estipulados en la Norma Oficial Mexicana (NOM), los cuales son: el dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), O₃ y las partículas suspendidas, estas últimas se subdividen en dos categorías el PM₁₀ y el PM_{2.5} (SEDEMA, 2018).

De estos seis contaminantes, el O₃ y el PM son los que normalmente superan las concentraciones límites establecidas en la NOM, alcanzando niveles perjudiciales para la salud. Un ejemplo de esto es lo ocurrido en el año 2016 donde de la totalidad de días que presentaron una mala calidad, el 100% fue por alguno por alguno de estos tres contaminantes o sus respectivas combinaciones. (SEDEMA, 2017).

La NOM, publicadas en el año 2014, establece como límite máximo permitido para el O₃ de 95 ppb como promedio en una hora, 70 ppb es el promedio móvil de 8 horas, para el PM₁₀ se determinó en 75 µg/m³ el promedio de 24 horas y 40 µg/m³ el promedio anual. Para el PM_{2.5} es de 45 µg/m³ como promedio de 24 horas y de 12 µg/m³ para el promedio anual (Tabla 1). Cabe mencionar que los límites establecidos en la NOM para PM están por encima de los sugeridos por la OMS (Tabla 1.)

Tabla 1. Valores de concentración límites establecidos en las NOM, y sugeridos por la OMS para los contaminantes criterio. Modificado de SEDEMA

Contaminante	NOM			OMS
	NOM	Publicación	Descripción	
SO ₂	NOM-022-SSA1-2019	20/08/2019	0.075 ppm, promedio aritmético de 3 años consecutivos de los percentiles 99 anuales como promedio horario 0.040 ppm, máximo promedio de 24 horas	40 µg/m ³ de media diaria
CO	NOM-021-SSA1-1993	23/12/1994	26 ppm, máximo anual como promedio móvil de 8 horas	4 mg/m ³ de media diaria
NO ₂	NOM-023-SSA1-1993	23/12/1994	0.210 ppm, promedio horario	10 µg/m ³ de media anual 25 µg/m ³ de media diaria
O ₃	NOM-020-SSA1-2014	19/08/2014	0.095 ppm, promedio horario 0.070 ppm, promedio móvil de 8 horas	100 µg/m ³ , máximo diario de periodos de 8 horas 60 µg/m ³ , promedio de periodos de 8 horas, temporada máxima
PM ₁₀	NOM-025-SSA1-2014	20/08/2014	75 µg/m ³ , promedio de 24 horas y 40 µg/m ³ , promedio anual	45 µg/m ³ de media diaria 15 µg/m ³ de media anual
PM _{2.5}	NOM-025-SSA1-2014	20/08/2014	45 µg/m ³ , promedio de 24 horas y 12 µg/m ³ , promedio anual	15 µg/m ³ de media diaria 5 µg/m ³ de media anual

CO: Monóxido de carbono, NO₂: dióxido de nitrógeno, PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 µm, PM_{2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm, O₃: Ozono, SO₂: Dióxido de azufre.

Adicional a estos contaminantes criterios que se encuentra regulados, en la atmosfera de la ZMVM existen otros compuestos potencialmente nocivos para la salud, como lo son los COT, COV y TOX los cuales no son monitorizados (SEMARNAT., 2005), Sin embargo, se han desarrollado herramientas como el Sistema modelado de emisiones, para estimar las concentraciones de los mismos.

➤ 1.3 Presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el PM de la ZMVM

Se ha reportado que el PM producido por motores de combustión interna se encuentra enriquecido con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), en especial la fracción fina. De acuerdo con el estudio realizado en CDMX por Salcido-Neyoy *et al.*, (2015), se encontraron 14 de 16 HAP buscados en el PM₁₀, adicionalmente en la fracción ultrafina (igual o menor a 1 µm) se evidenció que el Benzo[a]pireno (B[a]P) es el segundo HAP de mayor concentración después del naftaleno (Morales-Rubio *et al.*, 2019). Cabe resaltar que, al observar los mapas reportados por el SEDEMA, se evidencia que la mayor producción de PM es en la zona norte.

El B[a]P es el prototipo de los HAP. Está clasificado según la IARC en el grupo 1 de la lista de carcinógenos humanos, y puede fungir como iniciador y promotor durante el desarrollo de neoplasias (IARC, 2012; Sadikovic y Rodenhiser, 2012). El B[a]P es bioactivado para su eliminación, por enzimas pertenecientes a las subfamilias de citocromos P450 (CYP) 1A y 1B. Mas específicamente por las enzimas CYP1A1 y CYP1B1, dando origen B[a]P diol epóxido, el cual puede interactuar con las principales biomoléculas, generando aductos en proteínas, en el ADN nuclear (ADNnuc) y ADNmt (Sadikovic y Rodenhiser, 2012). Este evento se asocia con la generación de mutaciones puntuales, o hipometilación del ADN, en

el caso de su reparación por el mecanismo de escisión de nucleótido (NER) (Sadikovic y Rodenhiser, 2012).

En un estudio realizado por Garcia-Suastegui *et al.*, 2010, se evidenciaron variaciones en el número de aductos en leucocitos de sangre periférica de adultos jóvenes, entre la época lluviosa (de menor contaminación) y en la época seca (de mayor contaminación) en la ZMVM. Siendo significativamente más altos los niveles del biomarcador en la temporada de mayor contaminación atmosférica, mostrando que los niveles de contaminación modulan el número aductos.

➤ 1.4 Efectos de la contaminación atmosférica en la salud durante el embarazo

Durante la gestación la ventilación materna por minuto aumenta hasta un 48% en el volumen de gas inhalado (LoMauro y Aliverti, 2015), aunado a que el feto se encuentra en proceso de diferenciación y presenta una alta tasa de división celular, lo que provoca que la exposición a contaminación atmosférica, durante este periodo, pueda generar efectos adversos en la salud del recién nacido a corto y largo plazo (Perera, 2018).

La exposición a contaminantes atmosféricos especialmente el PM, puede afectar el embarazo al generar, por ejemplo, estrés oxidativo. De manera directa por la presencia de radicales libres en la superficie de la partícula, así como de metales de transición solubles como el hierro que generan el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Saenen *et al.*, 2019) y dañar la información genética mitocondrial que codifica subunidades de la cadena respiratoria, provocando a su vez un mal funcionamiento de fosforilación oxidativa aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al interior de la mitocondria (Saenen *et al.*, 2019). El daño oxidativo puede a su vez, generar una respuesta inflamatoria local o sistémica.

Existen diversos reportes en donde se ha asociado la exposición a contaminación atmosférica durante la gestación con abortos espontáneos, nacimientos prematuros, retraso en el crecimiento intrauterino, preeclampsia, hipertensión gestacional, bajo peso al nacer, así como menor talla a los seis meses y al año (Van den Hooven *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2017; Clemente *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en China se evidenció una relación entre una mayor exposición a contaminación atmosférica y un mayor número de abortos en el primer trimestre; mostrando adicionalmente que la relación no es lineal, sino que el riesgo aumenta considerablemente a concentraciones altas (Zhang *et al.*, 2019).

Nuestro grupo de trabajo encontró una correlación positiva entre la cantidad de aductos de HAP en el ADN en leucocitos de sangre de cordón umbilical o de sangre materna y la concentración de PM₁₀ y PM_{2.5} reportado por el SIMAT en la zona en donde vivía la población estudiada. También los niveles de PM se correlacionaron con marcadores de daño celular como menor viabilidad celular y elevado número de micronúcleos, que son biomarcadores de rupturas cromosomales y células aneuploides (Maciel-Ruiz *et al.*, 2019; Sordo *et al.*, 2019).

➤ *1.5 Importancia de la placenta y los efectos nocivos de la contaminación atmosférica en tejido placentario*

Durante el desarrollo embrionario la placenta es un órgano clave que funge como punto de conexión entre feto y la madre. Entre sus funciones se incluye el transporte de oxígeno, dióxido de carbono y de nutrientes, la eliminación de desechos, además de la producción y eliminación de hormonas que regulan la evolución y homeostasis normal del embarazo, entre las cuales destacan la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) y el lactógeno placentario (Rodríguez-Cortes y Mendieta-Zeron, 2014). Por sus funciones y su gran actividad metabólica la placenta requiere producir energía constantemente y esta es suministrada en gran medida por la función mitocondrial de las células placentarias (Desai *et al.*, 2017).

Recientemente se demostró que el carbono negro como parte del PM producido por la quema de combustibles fósiles, se deposita en la placenta principalmente en la cara fetal (Bové *et al.*, 2019).

Revisiones como la realizada por Saenen *et al.*, (2019) exploran los efectos nocivos de la contaminación atmosférica en el tejido placentario humano, como el aumento de la 3-nitrotirosina (3-NT) y 8 hidroxido-desoxiguanosina (8-OHdG), una longitud telomérica menor, una disminución de la metilación global del ADN placentario, así como un aumento de la metilación en genes de reparación APEX1 (endodesoxirribonucleasa 1 apurínica /apirimidínica), OGG1 (8-oxoguanina glicosilasa), ERCC4 (subunidad catalítica de endonucleasa de reparación por escisión 4) y el gen supresor de tumores P53. Además, discuten la hipótesis denominada “Los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad”, proponiendo que los efectos nocivos de la contaminación atmosférica en la placenta podrían ser causa de enfermedades a largo plazo.

➤ *1.6 Contenido de ADNmt como biomarcador de daño*

La mitocondria es el compartimiento subcelular donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs, la beta oxidación, además está involucrada en diversos procesos biológicos como la homeostasis del calcio, la proliferación celular y la apoptosis (Nelson *et al.*, 2005). Este es el único organelo que posee su propio ADN, ácido ribonucleico (ARN) y ribosomas.

Este organelo es considerado como la central bioenergética de la célula, ya que es el punto donde se produce la mayoría del ATP a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa, usando como aceptor final de electrones al oxígeno (Nelson *et al.*, 2005). Aproximadamente el 90% del consumo de oxígeno celular se da en la mitocondria siendo reducido en su mayoría a agua, pero una pequeña proporción (1-5%) da lugar a ROS. Se sabe que este organelo es la principal fuente celular de ROS y blanco inmediato de las mismas, razón por la cual cuenta con diversos mecanismos de defensa como superóxido dismutasa de magnesio, catalasa, glutatión peroxidasa y peroxiredoxina, además de mecanismos de reparación del ADN como la reparación por escisión de bases (BER) y la unión de extremos mediada por microhomología (Timon, 2016; Zinovkina, 2018). El envejecimiento, así como enfermedades degenerativas como la enfermedad de Parkinson,

Alzheimer o cardiopatías se han relacionado con lesiones mitocondriales (Druzhyna *et al.*, 2008).

Dada las características intrínsecas de la mitocondria como el potencial de membrana, un pH alcalino, y un ambiente lipofílico se ha observado que este organelo es blanco de múltiples contaminantes ambientales, por ejemplo el PM (Fetterman *et al.*, 2017); en un estudio hecho por Grandjean *et al.*, (2008), se observó que al exponer células *in vitro* a la fracción ultrafina del PM, los núcleos de carbono tienden a acumularse en este organelo, posiblemente por interacciones entre las cargas de las partículas y matriz mitocondrial.

La exposición a material particulado puede generar estrés oxidante, disminuir el potencial de membrana de la mitocondria, dañar la estructura mitocondrial, alterar la función respiratoria mitocondrial, así como causar rupturas y metilaciones del ADNmt (Fetterman *et al.*, 2017, Breton *et al.*, 2019 & Xu *et al.*, 2011).

El genoma mitocondrial tiene longitud de 16.569 pb donde se encuentran codificadas 27 proteínas, 11 de las cuales, están implicadas en la replicación de la información genética, y 13 polipéptidos que son parte de los complejos de la fosforilación oxidativa, además de dos ARN ribosómicos y 22 ARN de transferencia. Sin embargo, la mayoría de proteínas necesarias para su funcionamiento incluyendo para su replicación, están codificadas en ADNnuc (Pakendorf y Stoneking, 2005).

Los cambios en el contenido relativo de ADNmt, medido como la proporción de ADNmt/ADNnuc cuantificado a través de qPCR se ha utilizado y reportado como biomarcador en un amplio rango de enfermedades humanas que van desde diabetes, obesidad, cáncer y envejecimiento (Malik y Czajka, 2013). Este biomarcador a sido propuesto como indicador de déficit mitocondrial en condiciones de estrés oxidante, el aumento de copias del material genético del organelo estimula la proliferación mitocondrial para satisfacer la demanda energética provocada por el al estrés oxidante (Lee y Wei., 2000; Carugno *et al.*, 2012). Y funge como un mecanismo de protección por abundancia, diluyendo el número de lesiones por kilo base (Dannenmann *et al.*, 2017).

Para observar el impacto de la contaminación atmosférica durante la gestación se seleccionó como biomarcador de daño el contenido de ADNmt, ya que este a diferencia del ADN genómico no posee histonas, y se está transcribiendo constantemente; por lo que encuentra des compactado. Además, carece intrones y no posee del mecanismo de reparación NER, el cual se usa para reparar daños que causan deformaciones en la doble hebra, como los causados por los HAP (Lee y Wei, 2000; Lee y Wei, 2005).

Se ha encontrado que en exposiciones agudas a agentes inductores de estrés oxidante como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se da un incremento del número de copias del ADNmt, así como un aumento de tamaño de las mismas en la cepa celular 5 del Consejo de Investigación Médica de Reino Unido (MRC-5) (Lee *et al.*, 2000). En trabajadores polacos expuestos ocupacionalmente a HAP, se encontró que los trabajadores que tenían más de 3 μmoles de 1-pirenilol (un metabolito de HAP) por mol de creatinina en orina, también presentaban un mayor número de copias de ADNmt en sangre periférica (Pavanello *et al.*, 2013).

Estudios realizados evaluando el comportamiento del contenido de ADNmt en la exposición gestacional a contaminación atmosférica, como el de Rosa *et al.*, (2017) en México, evidenciaron que mayor exposición a PM_{2.5} menor contenido de ADNmt en sangre de cordón umbilical; y propusieron que la ventana de sensibilidad a dicho contaminante se da de la semana 35 a la 40 de gestación.

Otros estudios recientes como el realizado por Breton *et al.*, (2019) encontraron una relación positiva entre el número de copias del ADNmt y el metabolito BaP-tetrol, un derivado de B[a]P medido en sangre del cordón umbilical, en madres expuestas a contaminantes del aire relacionados con el tráfico (TRAP). Así como también Cao *et al.*, 2020, observaron una asociación positiva entre el contenido de ADNmt en sangre de cordón umbilical y metabolitos hidroxilados de HAP (OH-HAP).

➤ *1.7 Asociaciones entre la exposición a contaminación atmosférica y el contenido de ADNmt placentario.*

Existen estudios realizados con enfoques similares al planteado en este proyecto de exposición gestacional a contaminación ambiental, como el realizado por Janssen *et al.* (2012) en Bélgica, donde se encontró que un incremento de 10 µg/m³ de PM₁₀ durante el último trimestre de embarazo, disminuye un 17% en promedio el contenido de ADNmt en placenta. Adicionalmente, en otros estudios realizados por este mismo grupo, se encontró una asociación entre los niveles de NO₂ y un 4.9% menos de contenido de ADNmt junto con una disminución de 48 g de peso al nacer, por cada 10 µg/m³ de incremento de exposición al contaminante, así como menor talla y peso a los seis y doce meses (Clemente *et al.*, 2015; Clemente *et al.*, 2017).

En otra investigación se realizó una aproximación múltiple, teniendo en cuenta diversos contaminantes y se encontró una asociación positiva entre el número de copias de ADNmt placentario con los niveles de β-hexaclorociclohexano y arsénico, además una relación negativa entre dicho biomarcador y los niveles de talio (Vriens *et al.*, 2017).

Un resumen de los estudios donde se usó el contenido de ADNmt como biomarcador en la exposición a contaminación atmosférica en humanos, tratados en este documento se presenta en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Agentes ambientales que modifican el contenido de ADNmt en placenta o en sangre de cordón umbilical.

Muestra analizada	Contaminante	Ciudad/ País	Efecto encontrado	Referencia
Placenta	PM ₁₀	Genk/ Bélgica	↓ Contenido de ADNmt	(Janssen <i>et al.</i> , 2012)
	NO ₂	Genk/ Bélgica Valencia, Sabadell, Gipuzkoa y Asturias/España	↓ Contenido de ADNmt ↓ Peso al nacer ↓ Peso y talla a los 6 y 12 meses	(Clemente <i>et al.</i> , 2015) (Clemente <i>et al.</i> , 2017)
	β-hexaclorociclohexano Arsénico Talio	Flandes/ Bélgica	↑ Contenido de ADNmt ↓ Contenido de ADNmt ↓ Contenido de ADNmt	(Vriens <i>et al.</i> , 2017)
Sangre de cordón umbilical	PM _{2.5}	CDMX/ México	↓ Contenido de ADNmt	(Rosa <i>et al.</i> , 2017)
	TRAP	Los Ángeles/ U.S.A.	↑ Contenido de ADNmt	(Breton <i>et al.</i> , 2019)
	HAP	Taiyuan/ China	↑ Contenido de ADNmt	(Cao <i>et al.</i> , 2020)

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, NO₂: dióxido de nitrógeno, PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 µm, PM_{2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm, TRAP: Contaminantes del aire relacionados con el tráfico.

2. JUSTIFICACIÓN

La contaminación atmosférica es un factor que afecta negativamente la salud humana. La ZMVM posee características físicas geográficas y demográficas, que contribuyen a que se presentes altos niveles de contaminantes atmosféricos, especialmente de PM y O₃. Durante la gestación la exposición a contaminación atmosférica se ha asociado a diversos efectos adversos, al momento del parto e incluso a largo plazo en el recién nacido. Uno de los órganos fundamentales durante el embarazo es la placenta por sus diversas funciones como punto de conexión entre la madre y el feto, así como su papel endocrino. Se sabe que la exposición a contaminantes atmosféricos afecta de manera negativa en el tejido placentario. Para evaluar el daño causado por la contaminación se empleará el contenido relativo ADNmt, este biomarcador se ha investigado en una amplia gama de enfermedades humanas.

3. HIPÓTESIS

La exposición a PM y O₃ durante la gestación modula el contenido relativo de ADNmt placentario.

4. OBJETIVOS

➤ 4.1 Objetivo general

Correlacionar los niveles exposición a PM₁₀, PM_{2.5} y O₃, con el contenido relativo de ADNmt placentario en muestras tomadas de habitantes de la ZMVM.

➤ 4.2 Objetivos específicos

Determinar el número relativo de copias de ADNmt en muestras de la cara fetal de la placenta.

Correlacionar el número relativo de copias de ADNmt placentario con los niveles de contaminación atmosférica utilizando los datos de la SIMAT y del sistema modelado de emisiones.

5. MÉTODOS

➤ 5.1 Población de estudio.

Para realizar este trabajo se invitó a participar a mujeres que dieron a luz entre febrero de 2014 a diciembre de 2015, en el Hospital de Ginecoobstetricia No. 3 "Dr. Víctor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez" del Centro Médico La Raza de la CDMX. Este estudio fue autorizado por el oficio 09-B5-61-2800/201300/ 2056 del IMSS y el Comité de Ética para estudios de seres humanos del IIB, UNAM. Este hospital se encuentra en la zona norte del ZMCM, que es de las zonas con mayor contaminación atmosférica por PM, de acuerdo con los registros del SIMAT. Las voluntarias firmaron una carta de consentimiento informado para participar en el estudio, además de llenar un cuestionario con información relevante para la investigación, como su domicilio, tipo de alimentación, hábitos como tabaquismo, alcoholismo y otros factores confusores. Adicionalmente, se tomaron datos del recién nacido como peso, talla y edad gestacional en semanas determinado a través del test de Capurro (Saravia., 2012).

Al momento del parto se tomó tejido placentario separado en cara materna y fetal, de 150 voluntarias. Las muestras fueron congeladas inmediatamente después de su recolección, para ser transportadas a laboratorio donde se almacenadas a -80°C .

Los criterios de inclusión usados fueron que el parto ocurriera en la semana 36 o superior, que las madres tuvieran entre 19 y 35 años, y que las mujeres fueran atendidas en el hospital ya mencionado. Por el otro lado, los criterios de exclusión fueron que las madres fueran fumadoras activas durante el embarazo y/o presentar exposición ocupacional a HAP, haber presentado enfermedades asociadas al embarazo (preeclampsia, diabetes, etc.), Presentar enfermedades crónicas (cáncer, hipertensión, epilepsia, etc.), haber presentado ruptura prematura de membrana, que el feto presentara cromosomopatías y/o malformaciones.

Utilizando estos criterios, se seleccionaron 88 muestras, de las cuales 74 se georreferenciaron de un total de 150 muestras colectadas.

➤ 5.2 Modelo 1: estimación de la exposición a contaminación atmosférica.

Haciendo uso de las bases de datos de libre acceso publicadas por el SIMAT, disponibles en tiempo real para su descarga en la página web <http://www.aire.cdmx.gob.mx/>, donde se reportan cada hora la concentración de contaminantes criterio, registradas por las diferentes estaciones de monitoreo distribuidas en la CDMX. Se estimaron los niveles de los contaminantes criterio PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$ y O_3 , en diferentes ventanas de tiempo durante la gestación (Figura 1).

Adicionalmente se estimó la diferencia de exposición a $\text{PM}_{10-2.5}$ en los mismos periodos de tiempo.

Dado que el hospital y la residencia de las mujeres participantes de este estudio están ubicados en la zona norte de ZMVM, se tomaron en cuenta para los cálculos de exposición las siguientes estaciones de monitoreo: Cuautitlán, Villa de las Flores, Atizapán, Tultitlán, Los Laureles, Tlalnepantla, La Presa Buena, Xalostoc, San Agustín, FES Acatlán, Camarones, Gustavo A. Madero, Hospital General de México, Merced y San Juan de Aragón.

Ha de aclararse que no en todas estaciones ni en todos los años las estaciones mencionadas se reportan los tres contaminantes.

Con los datos de dichas estaciones y la fecha de parto se estimó para cada embarazo, la exposición media a PM_{10} , $PM_{2.5}$ y O_3 , en el último mes, últimos dos meses, y tercer trimestre. Adicionalmente, se analizaron otras ventanas de exposición a PM como el segundo trimestre, primer trimestre y todo el embarazo. Las ventanas de tiempo analizadas se esquematizan en la Figura 1.

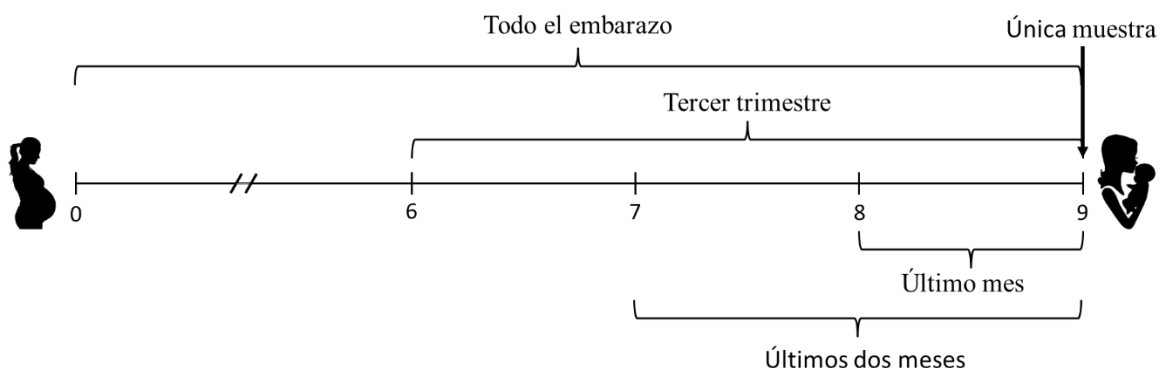


Figura 1. Ventanas de tiempo analizadas en el modelo 1.

➤ *5.3 Modelo 2: estimación de la exposición a contaminación atmosférica.*

Se estimó la exposición anual de los binomios a COT, COV, TOX, NOX, PM_{10} , y $PM_{2.5}$.

La exposición a cada uno de estos contaminantes se separó adicionalmente por el tipo de fuente de emisión. Dichos tipos de fuentes se describen en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3. Descripción de los tipos de fuentes de emisión.

Tipo de Fuente	Descripción
Fuentes puntuales	Son aquellas instalaciones establecidas en un solo lugar (fijas), que puedan generar emisiones de contaminantes, como las refinerías de petróleo o fábricas.
Fuentes de área	Son los conjuntos de fuentes fijas que se encuentran dispersas en una zona, que por su tamaño se dificulta su seguimiento como una fuente fija. Como imprentas, panaderías, carpinterías, etc.
Fuentes naturales	Son aquellas, producto de fenómenos naturales como erupciones volcánicas, erosión del suelo, la vida animal y vegetal.
Fuentes móviles	Engloba a todos los tipos de transporte automotor.

Definiciones de acuerdo con SEMARNAT, (2005).

La definición de las tres categorías de contaminantes empleadas son las siguientes. Los COT son el conjunto de gases, donde se incluyen los compuestos carbonados excepto ácido carbónico, carbonatos, carburos metálicos, CO y dióxido de carbono. Los COV son un subconjunto de COT, donde se engloban los gases fotoquímicamente reactivos formados por hidrocarburos (SEMARNAT., 2005). Mientras que los compuestos o contaminantes tóxicos son gases o partículas suspendidas en el aire, que pueden tener efectos a largo o corto plazo

en la salud humana, en estos que están incluidos metales pesados, el listado de 189 contaminantes considerados en esta categoría se puede consultar en SEDEMA 2016.

Para determinar la exposición a los contaminantes, primero se realizó la geo-referenciación de la vivienda de cada una de las madres voluntarias, haciendo uso de las plataformas Google Maps y Google My Maps. Las coordenadas obtenidas fueron validadas en cada caso, con el fin de evitar errores. De las 88 voluntarias analizadas, se realizó la geo-referenciación satisfactoriamente en 74 casos (Figura 2A).

Haciendo uso del inventario de emisiones modelado de la Secretaría del Medio Ambiente, de libre acceso y disponible para su descarga en la página web <http://www.aire.cdmx.gob.mx/>, se obtuvo la concentración anual para el 2014 de los contaminantes atmosféricos en la ZMVM, generados por el software Motor Vehicle Emission Simulator for México (MOVES-México). Este modelo secciona la ZMVM en cuadros de un 1km² (Figura 2), lo que permite asignar una exposición especial específica a cada voluntario.

Los datos del modelo en conjunto con las georreferencias validadas se cargaron al programa ArcGIS Pro.

A cada una de las referencias geográficas se les asignaron tres zonas de influencia, con radios de 250m, 500m y 750m, respectivamente (Figura 2B). Ya que la contaminación producida en los cuadrantes aledaños al que se encuentra ubicada la vivienda pueden estar influyendo en el comportamiento del biomarcador, dado la importancia de la emision de algunas fuentes como las fijas.

La exposición a cada uno de los contaminantes se estimó tomando el promedio de los cuadrantes que interactuaron en cada zona de influencia.

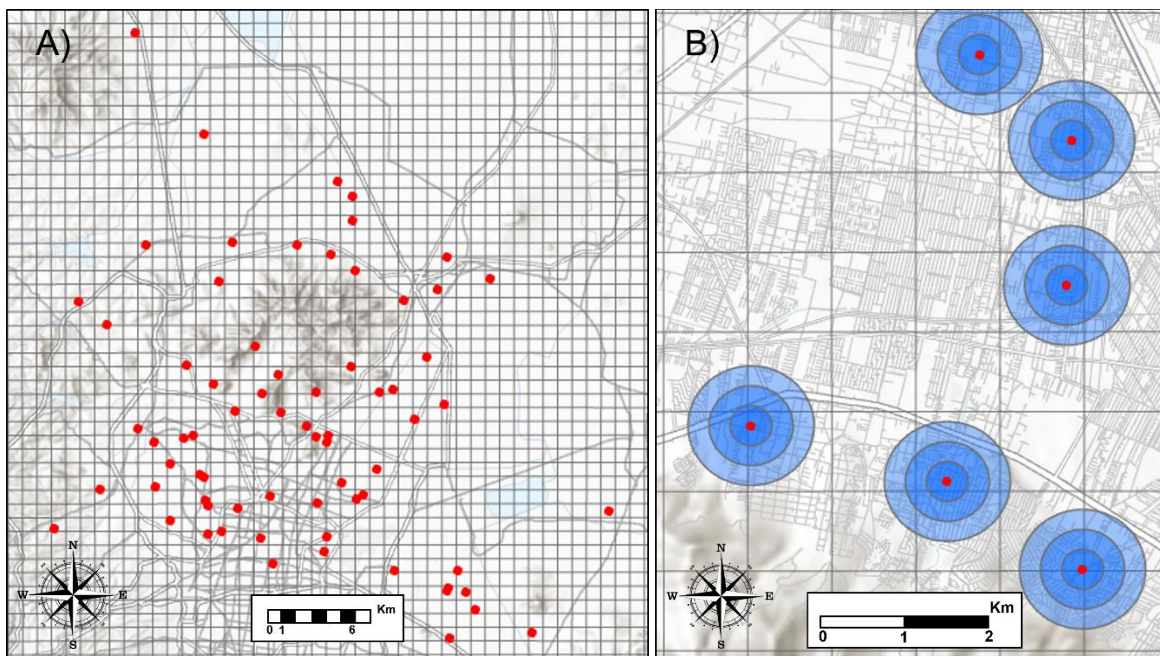


Figura 2. Representación gráfica del modelo 2. A) Distribución espacial de las 74 viviendas georreferenciadas. B) Radios de influencia tomados en cuenta.

➤ 5.4 Determinación el contenido de ADNmt placentario.

El ADN total de las 88 muestras se purificó mediante el método clásico de fenol- cloroformo. Todas las extracciones se realizaron usando tejido proveniente de la cara fetal de la placenta (tejido de origen fetal), que fue tomado del área circundante al cordón umbilical.

La pureza de los ADN extraídos fue analizada usando un NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, adicionalmente se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (P/V), para verificar la integridad.

El contenido relativo de ADNmt se determinó haciendo uso del método de qPCR. En cada reacción se adicionaron los reactivos en cantidades y concentraciones especificados en la Tabla 4, salvo en los controles sin templado (NTC) donde el templado fue remplazo por un 1 µL adicional de agua libre de nucleasas. Se empleó el equipo Rotor Gene Q 6000 y el reactivo KAPA SYBR® FAST qPCR (2X).

Tabla 4. Reactivos y volúmenes usados por reacción de qPCR

Reactivo	Concentración	Cantidad
KAPA Sybr Green	2X	5 µL
Primer forward	5µM (hB2M) 3µM (hMITO)	1 µL
Primer reverse	5µM (hB2M) 3µM (hMITO)	1 µL
Agua libre de nucleasas	-	2 µL
Templete (ADN)	10 ng/µL	1 µL
Total		10 µL

Los primers empleados en este estudio se muestra en la Tabla 5. Estos fueron revisados del artículo de Malik *et al.*, (2011), quienes realizaron un análisis *in silico* para encontrar secuencias únicas del ADN genómico y mitocondrial, diseñando primers contra el gen de la beta-2-microglobulina hB2M (Gen nuclear), y contra una región no codificante del ADNmt hMITO.

Tabla 5. Información de los primers usados.

Primer	Secuencia (5'---3')	Gen blanco	T. Amplicon (pb)
hMITO F3	CAC TTT CCA CAC AGA CAT CA	D-loop región no codificante del ADNmt	129
hMITO R3	TGG TTA GGC TGG TGT TAG GG		
hB2M F1	TGT TCC TGC TGG GTA GCT CT	Beta-2-microglobulina	187
hB2M R1	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CA		

Secuencia, gen blanco y tamaño del amplicón (T. Amplicon) en pares de bases (pb).

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, el promedio de los duplicados se utilizó para realizar los cálculos posteriores.

El contenido relativo de ADNmt se calculó usando el método comparativo de *Ct* (Venegas *et al.*, 2011; González-Hunt *et al.*, 2016), empleando la siguiente formula:

$$\text{Contenido relativo de ADNmt} = 2 \times 2^{\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ ADNnuc} - Ct \text{ ADNmt}$$

Para cada reacción de qPCR se realizó la curva estándar del gen analizado, con lo cual se determinó la eficiencia y reproducibilidad de las reacciones. Dicha curva estándar se realizó con 5 puntos, y un factor de dilución 1:5. Los puntos fueron 100 ng/μL, 20 ng/μL, 4 ng/μL, 0,8 ng/μL y 0,16 ng/μL.

- *5.5 Determinación del número de aductos de ADN en leucocitos de sangre materna y de sangre de cordón umbilical.*

La determinación de aductos de ADN en leucocitos de sangre de cordón umbilical y sangre periférica materna fue realizada previamente, utilizando el ensayo de postmarcaje con ³²P, por los doctores Pavel Petrosyan y Jorge Maciel Ruiz, como se describe en el artículo Maciel-Ruiz *et al.*, 2019.

- *5.6 Análisis estadísticos.*

Para el análisis del modelo 1 se compararon las concentraciones registradas los tres contaminantes ambientales (PM₁₀, PM_{2.5} y O₃) en la temporada de lluvias (de junio a octubre) contra las reportadas en temporada seca (de enero a mayo y de noviembre a diciembre), para los tres años (2013, 2014 y 2015).

Los datos utilizados en las correlaciones fueron sujetos a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk, y dado que los datos no se comportan de manera normal; se realizó la correlación de Spearman de una cola. Todos los análisis descritos se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.0.1

Se realizaron correlaciones de Spearman, entre el contenido relativo de ADNmt y exposición media a PM₁₀, PM_{2.5} y O₃, en el último mes, últimos dos meses y tercer trimestre. Así como con exposición media a PM₁₀ y PM_{2.5} en todo el embarazo. Los niveles de contaminante se correlacionaron con peso, talla y edad gestacional del recién nacido, por último, con los aductos medidos en sangre periférica materna y del cordón umbilical.

Adicionalmente, se agruparon las muestras de acuerdo con la fecha de nacimiento; en temporada seca y de lluvias. Se compararon los grupos de temporada con una prueba de muestras no pareadas de Mann Whitney. Posteriormente se separaron las temporadas por año de muestreo y se hicieron correlaciones entre el biomarcador con la exposición a PM₁₀ en el último trimestre.

Por el otro lado, para el modelo 2 se realizaron correlaciones entre el contenido relativo de ADNmt placentario y exposición a COT, COV, TOX, NOX, PM₁₀, PM_{2.5}, y las respectivas fuentes de emisión.

6. RESULTADOS

➤ 6.1 Población de estudio.

En la Tabla 6 se consignan las características de la población de estudio. La edad materna promedio fue de 29.8 años con una desviación estándar de 5.0 años, en un rango de 21 a 41 años. El 52.3% (46) de estas reportaron ser empleadas y el 38.6% (34) ser amas de casa; el porcentaje restante (9.1%) no reportó ocupación. El 69.3% de las madres han tenido uno o dos partos, un 19.3 % tres o más, con un máximo de siete partos.

Los recién nacidos tuvieron una edad gestacional promedio de 38.4 semanas, con una desviación estándar de 1.2 en un rango 36 a 41. Presentaron una talla y peso promedio de 49.7 cm y 3048.3 g, con una desviación estándar de 2.3cm y 434.6 g respectivamente. El 47.7% de los neonatos fueron del sexo femenino, 47,7% masculino, del 4.5% restante no se tiene registro.

Tabla 6. Características de la población de estudio.

Característica	Media ±DE o Número (%)
Numero de binomios	88
Madres	
Edad (años)	29.7 ±5.0
Ocupación	
Empleada	46 (52.3)
Ama de casa	34 (38.6)
No reportado	8 (9.1)
Paridad	
1	29 (33.0)
2	32 (36.4)
≥3	17 (19.3)
No reportado	10 (11.4)
Recién nacidos	
Sexo	
Femenino	43 (48.9)
Masculino	43 (48.9)
No reportado	2 (4.5)
Edad gestacional (Semanas)	38.4 ±1.2
Peso (g)	3048.3±434.6
Talla (cm)	49.7 ± 2.3

Las variables cuantitativas continuas se describen con la media y desviación estándar (DE), mientras que las cualitativas y cuantitativas discretas con número de individuos y porcentaje (%).

➤ 6.2 Comportamiento del PM_{10} , $PM_{2.5}$ y O_3 en la ZMVM durante los años de estudio (Modelo 1)

Usando las bases de datos disponibles en el SIMAT, se graficó el comportamiento de PM_{10} , $PM_{2.5}$ y O_3 a lo largo de los años 2013, 2014 y 2015 (Figuras 3 y 4). Los datos del 2013 fueron tomados en cuenta ya que la parte de gestación de algunas de las mujeres reclutadas se dio durante este año.

En el caso del PM se ve una disminución en la concentración en todos los años durante la época lluviosa; meses de junio a octubre, y alcanza el pico más alto en la época seca; los meses de noviembre a mayo.

Se realizó una comparación de estadística entre las concentraciones registradas del PM en la época de lluvias y la seca, para lo cual se utilizó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) dado que los valores no se comportan de manera normal. Para todos los años, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre las dos épocas del mismo año. Además, no se observaron diferencias estadísticas entre las temporadas de lluvia o entre las de seca de los diferentes años.

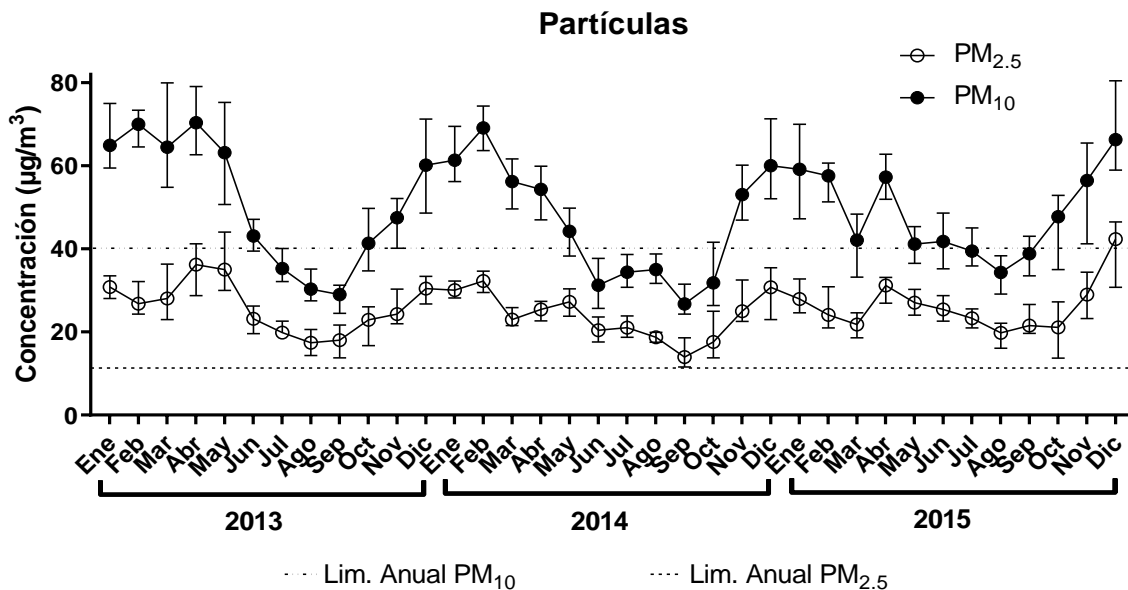


Figura 3. Comportamiento de PM_{10} y $PM_{2.5}$ en la ZMVM durante los años de estudio. Los datos representados son las medianas e intervalos de confianza de los datos registrados por mes. La abreviatura Lim. Anual hace referencia al promedio anual límite establecido en la NOM-025-SSA1-2014 para PM_{10} y $PM_{2.5}$. PM_{10} : Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm , $PM_{2.5}$: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm

Por otro lado, las concentraciones registradas del O₃ tampoco presentaron un comportamiento normal por lo que nuevamente se usó la prueba Kruskal-Wallis. En este caso, se encontraron diferencias significativas entre la temporada lluviosa 2014 con la seca del mismo año ($p < 0.0001$) y lluviosas 2013 con la seca 2014 ($P = 0.0228$). También se presentaron diferencias estadísticas entre la época seca 2013 con la época seca 2015 ($P = 0.0172$), y la temporada lluviosa 2014 con la lluviosa 2015 ($P = 0.0164$) y seca de 2014 con la seca de 2015 ($P = 0.0031$).

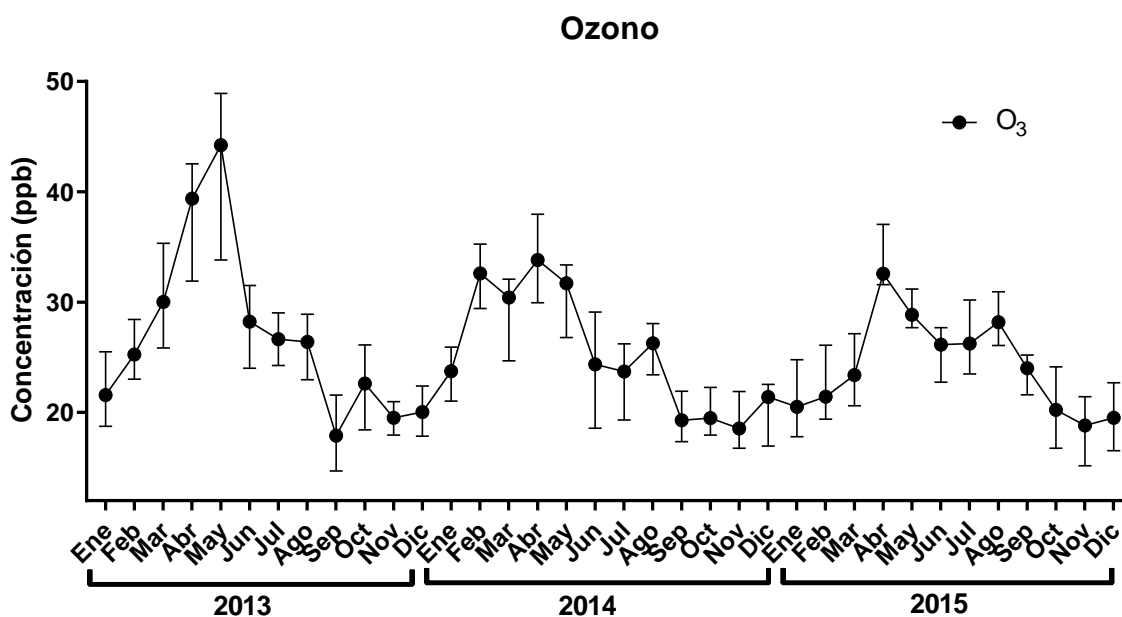


Figura 4. Comportamiento del O₃ en la ZMVM durante los años de estudio. Los datos representados son correspondientes a la mediana e intervalo de confianza de los datos registrados por mes. O₃: Ozono, ZMVM: Zona Metropolitana del Valle de México.

➤ 6.3 Exposición gestacional a PM₁₀ PM_{2.5} y O₃ (Modelo 1)

Se estimó la exposición a PM₁₀ PM_{2.5} y O₃ de cada binomio para el 1er, 2do y tercer trimestre tomando en cuenta la fecha de parto y las semanas de gestación (Figura 5A, 5B y 5C). Se observa que la mayoría de las participantes tuvieron una exposición promedio a PM₁₀ superior a lo establecido en la NOM-025-SSA1-2014, en caso de PM_{2.5} todas están por encima de lo permitido en esta misma norma.

El promedio de exposición a PM₁₀ para el primer mes fue de $49.03 \pm 9.69 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para el bimestre fue $51.10 \pm 9.88 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y para el trimestre de $51.56 \pm 9.32 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Mientras que a PM_{2.5} para el primer mes fue de $24.5 \pm 2.99 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para el bimestre es de $25.44 \pm 2.64 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y para el trimestre es de $25.99 \pm 2.66 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Por último, para la exposición a O₃ el promedio en el primer mes fue de $28.77 \pm 3.73 \text{ ppb}$, para el bimestre fue $28.79 \pm 3.52 \text{ ppb}$ y para el trimestre de $27.89 \pm 3.32 \text{ ppb}$.

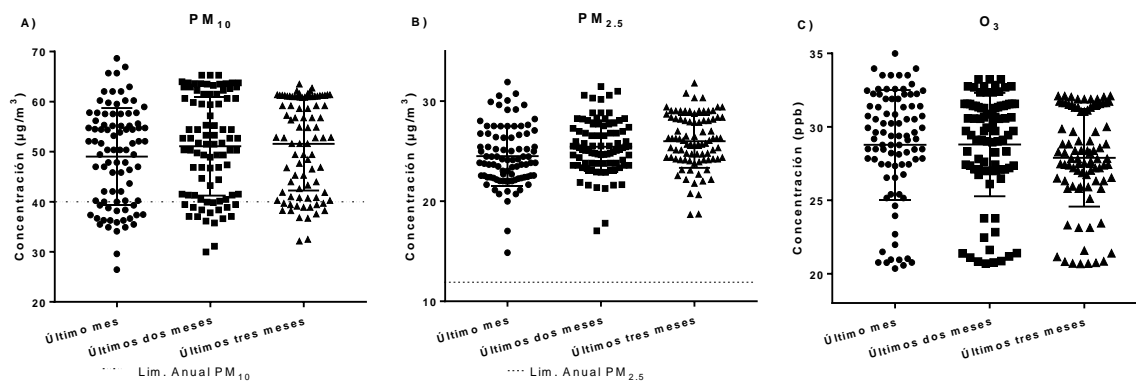


Figura 5. Exposición media de los binomios a PM₁₀ (A), PM_{2.5} (B) y O₃ (C), en el último mes, últimos dos meses y últimos tres meses del embarazo. El Lim. Anual (Líneas punteadas) hacen referencia a la concentración promedio anual límite establecido NOM-025-SSA1-2014 para PM₁₀ y PM_{2.5}. PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 µm, PM_{2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm, O₃: Ozono

➤ **6.4 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 1) y el contenido relativo de ADNmt placentario**

Se realizaron correlaciones entre el contenido de ADNmt placentario con los niveles de PM y O₃ en las diferentes ventanas de tiempo (Figura 1). Los resultados de las diversas correlaciones se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Correlaciones de Spearman entre el contenido relativo de ADNmt placentario y la exposición a PM₁₀ PM_{2.5} y O₃ en las diferentes ventanas de tiempo.

Ventana de tiempo	PM ₁₀ rho	PM _{2.5} Rho	PM _{10-2.5} rho	O ₃ rho
Último mes	0.5372****	0.181*	0.6028****	0.4608****
Últimos dos meses	0.6849****	0.5626****	0.6770****	0.4748****
Tercer trimestre	0.7492****	0.6846****	0.7129****	0.1682
Todo el embarazo	0.2128*	-0.1693	0.4148****	-

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 µm, PM_{10-2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico entre 10 µm y 2.5 µm, PM_{2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm, O₃: Ozono

Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre el número relativo de copias de ADNmt placentario con los niveles promedio de PM₁₀ presentes durante el último mes de la gestación (rho=0.5372, P<0.0001), últimos dos meses (rho=0.6849, P<0.0001), tercer trimestre (rho=0.7492, P<0.0001), y todo el embarazo (rho=0.2128, P=0.0465).

De manera similar, se evidenciaron correlaciones positivas y significativas con exposición media a PM_{2.5} en el último mes (rho=0.1810, P=0.0458), los últimos dos meses (rho=0.5626, P<0.0001) y el tercer trimestre del embarazo se observó la correlación más fuerte (rho=0.6846, P<0.0001).

A sí mismo, se observaron correlaciones positivas y significativas entre el contenido relativo de ADNmt placentario y el PM_{10-2.5} en el último mes de la gestación ($\rho=0.6028$, $P<0.0001$), últimos dos meses ($\rho=0.6770$, $P<0.0001$), tercer trimestre ($\rho=0.7129$, $P<0.0001$), y todo el embarazo ($\rho=0.4148$, $P<0.0001$).

En el caso del O₃ se observaron correlaciones positivas con el biomarcador y en el último mes ($\rho=0.4608$, $P<0.0001$) y últimos dos meses ($\rho=0.4748$, $P<0.0001$).

Las correlaciones entre el contenido relativo de ADNmt placentario con la exposición promedio de los binomios a PM₁₀ durante el último mes, últimos dos meses y tercer trimestre del embarazo se representa gráficamente en la Figura 6.

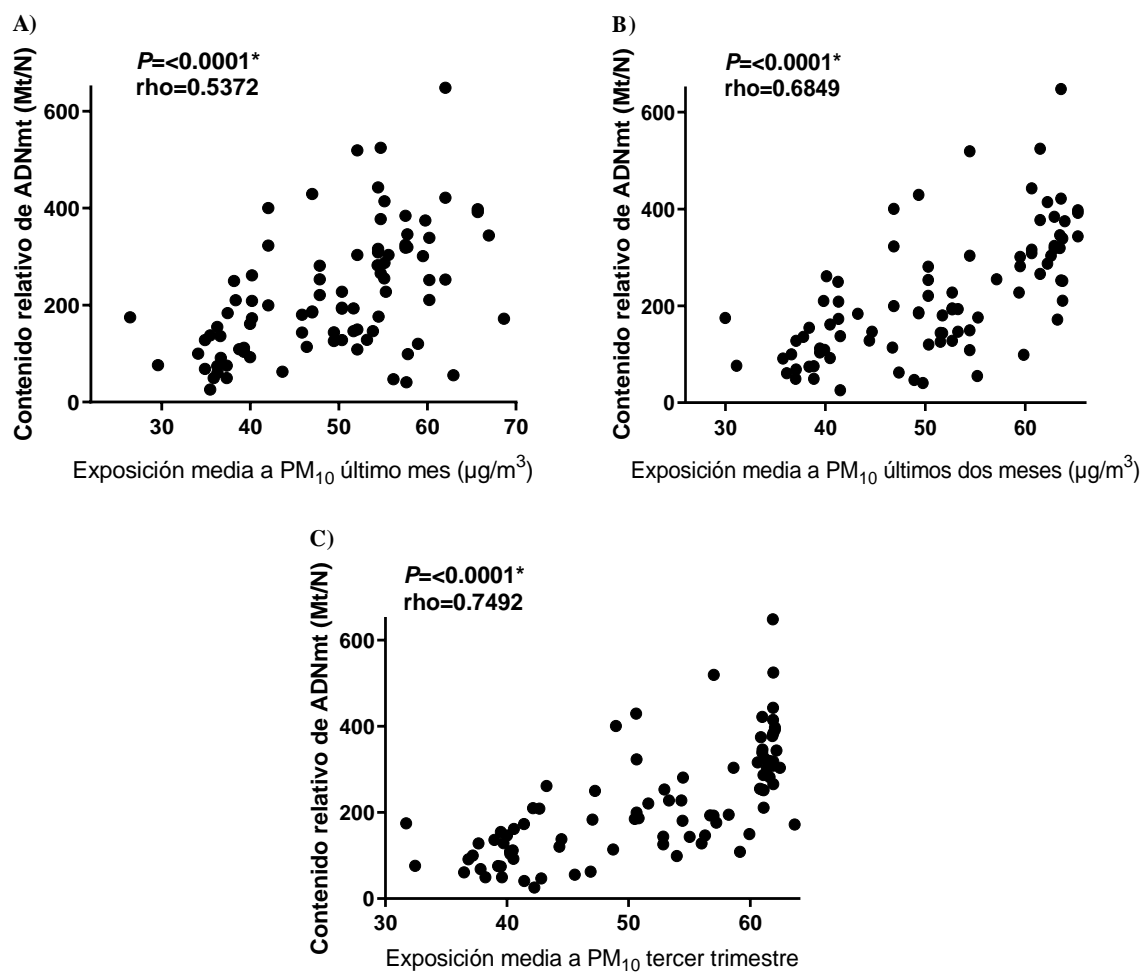


Figura 6. Correlación entre los niveles de exposición a PM₁₀ en el último mes(A), últimos dos meses(B) y tercer trimestre (C) del embarazo, con el contenido relativo de ADNmt placentario. *Valor estadísticamente significativo ($P\leq 0.05$). PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 µm, ADNmt: ADN mitocondrial.

Asimismo, se correlaciono el número relativo de copias de ADNmt placentario con los parámetros perinatales (peso, talla, edad gestacional), edad materna y niveles de aductos en leucocitos de sangre periférica materna y de cordón umbilical. Estos resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Correlaciones de Spearman entre el número de copias de ADNmt placentario y las medidas perinatales, edad materna y aductos.

Variable vs. Contenido relativo de ADNmt placentario	Rho
Edad Materna	-0.1011
Peso fetal	-0.0696
Talla fetal	-0.0741
Edad gestacional al momento del parto	-0.1055
Aductos en leucocitos de sangre materna	0.1816*
Aductos en leucocitos de sangre del cordón umbilical	0.2739**

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

ADNmt: ADN mitochondrial.

Se observaron correlación positivas y significativas entre el contenido relativo de ADNmt placentario, y el número aductos en sangre del cordón umbilical ($\rho=0.2739$, $P=0.0049$), y en leucocitos de sangre materna ($\rho=0.1816$, $P=0.0452$)

Correlación entre la temporada del año y el contenido relativo de ADNmt placentario. Se agruparon las muestras de acuerdo con la fecha de nacimiento, entre los partos dados en la temporada de lluvias (de junio a octubre) y la seca (noviembre a mayo).

Al comparar el contenido relativo de ADNmt placentario del tejido de las muestras separadas por temporada, se observa que los grupos son estadísticamente diferentes ($P < 0.0001$). Teniendo mayor el número de copias de ADNmt aquellos nacimientos que ocurrieron en la temporada seca (Figura 7).

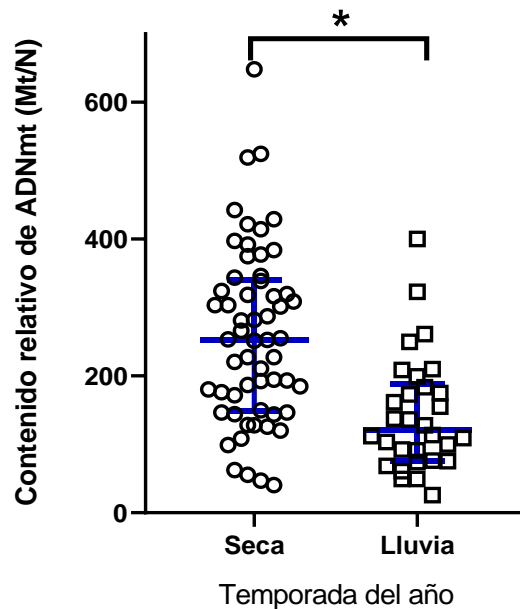


Figura 7. Comparación estacional del contenido relativo de ADNmt placentario. Media y rango intercuartil. Diferencias estadísticas hallada con un test de muestra no pareadas Mann Whitney ($P < 0.0001$). Tamaño muestral: seca= 58 lluvias=30 n=88. ADNmt: ADN mitochondrial

Adicionalmente se separaron las muestras por año de muestreo y temporada, obteniendo cuatro grupos (seca 2014, lluvia 2014, seca 2015 y lluvia 2015). Se realizaron correlaciones entre la exposición media en el tercer trimestre a PM_{10} de cada grupo, con el contenido relativo de ADNmt (Figura 8). Se evidenciaron correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre el biomarcador con la concentración de PM_{10} en la temporada seca 2014 ($\rho=0.5045$, $P=0.0003$), de lluvia 2014 ($\rho=0.7866$, $P=0.0157$) y lluvia 2015 ($\rho=0.6485$, $P=0.0015$).

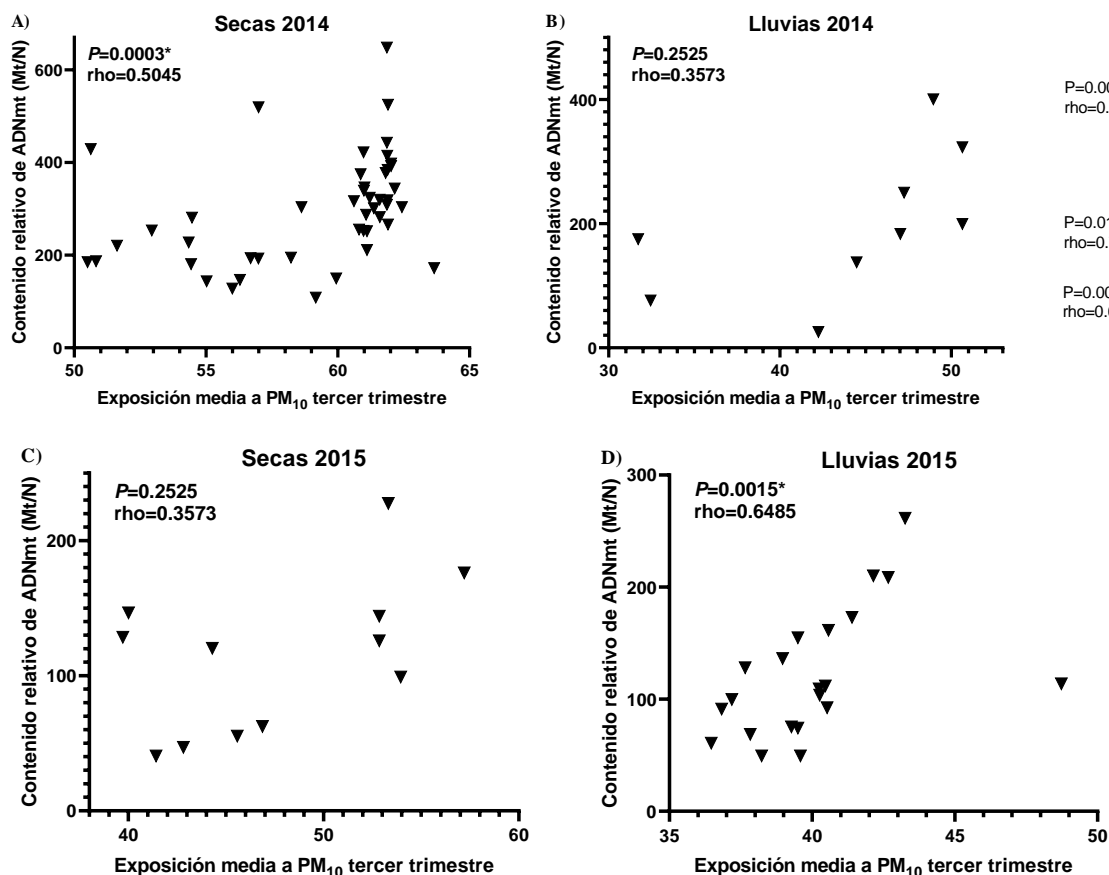


Figura 8. Correlación entre los niveles de exposición a PM_{10} en el tercer trimestre del embarazo, con contenido relativo de ADNmt placentario agrupado por temporadas. A) Secas 2014, B) Lluvias 2014, C) Secas 2015. D) Lluvias 2015. *Valor estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$). Tamaño muestral: Seca 2014= 46, Lluvias 2014= 9, Seca 2015=12, Lluvia 2015= 21. PM_{10} : Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a $10 \mu m$, ADNmt: ADN mitocondrial.

➤ 6.5 Exposición gestacional a contaminación atmosférica (Modelo 2)

La concentración anual a la que estuvieron expuestas las madres a los contaminantes COT, COV, TOX, NOX, PM_{10} y $PM_{2.5}$, estimados por el tipo de fuentes de emisión que las produjo, se muestra en la Tabla 9. Estas concentraciones se calcularon de acuerdo con la localización geo-referenciada del domicilio de las voluntarias y la información disponible del inventario de emisiones modelado. Se tomaron en cuenta tres tamaños de áreas de influencia que podrían estar afectando al biomarcador, correspondientes a radios de 250, 500, y 750m alrededor de sus domicilios.

Tabla 9. Valores de exposición a contaminantes atmosféricos (Toneladas/año)

Contaminante y fuente	Radio del área de influencia (metros)					
	750		500		250	
	Med	RIQ	Med	RIQ	Med	RIQ
PM₁₀						
Fuentes de área	8.228	[5.251, 14.84]	8.075	[4.99, 15.45]	7.072	[4.165, 13.91]
Fuentes puntuales	0.254	[0.008, 1.792]	0.137	[0, 1.341]	0.005	[0, 0.5605]
Fuentes móviles	3.045	[1.557, 6.3]	2.916	[1.505, 6.21]	3.026	[1.416, 6.358]
Fuentes naturales	0.015	[0.002, 0.036]	0.014	[0, 0.035]	0.013	[0, 0.03405]
Total de emisiones	14.76	[8.436, 25.86]	14.02	[8.48, 24.41]	12.24	[7.44, 22.28]
PM_{2.5}						
Fuentes de área	3.014	[2.362, 4.561]	3.020	[2.39, 4.495]	2.918	[2.266, 4.535]
Fuentes puntuales	0.149	[0.005, 1.172]	0.077	[0, 0.684]	0.004	[0, 0.424]
Fuentes móviles	1.675	[0.813, 3.651]	1.566	[0.81, 3.449]	1.655	[0.776, 3.152]
Fuentes naturales	0.004	[0.001, 0.009]	0.003	[0, 0.009]	0.003	[0, 0.008]
Total de emisiones	6.483	[3.863, 10]	5.484	[3.77, 10.04]	5.35	[3.313, 8.625]
COV						
Fuentes de área	125.4	[94.93, 150]	119.3	[98.4, 150.5]	126.7	[95.79, 153.7]
Fuentes puntuales	2.587	[0.449, 35.39]	1.408	[0.03, 10.47]	0.256	[0, 6.798]
Fuentes móviles	34.26	[22.12, 66.9]	35.27	[20.9, 70.24]	35.73	[21.79, 63.47]
Fuentes naturales	0.317	[0.145, 0.702]	0.292	[0.14, 0.643]	0.238	[0.143, 0.625]
Total de emisiones	205.6	[130.5, 249.3]	186.8	[129.2, 242.2]	186	[128.7, 245.6]
TOX						
Fuentes de área	47.02	[37.17, 55.67]	44.62	[37.84, 55.3]	45.93	[36.48, 59.57]
Fuentes puntuales	0.8	[0.044, 9.52]	0.246	[0, 3.205]	0.05	[0, 1.37]
Fuentes móviles	10.24	[5.894, 17.95]	10.26	[5.505, 19.31]	9.477	[6.283, 16.91]
Fuentes naturales	0.077	[0.038, 0.223]	0.075	[0.038, 0.200]	0.064	[0.037, 0.196]
Total de emisiones	70.37	[47.59, 90.66]	62.83	[44.72, 83.07]	66.99	[45.23, 80.86]
COT						
Fuentes de área	153.3	[124.1, 186.7]	147.8	[126, 186.7]	156.1	[123.6, 190.9]
Fuentes puntuales	2.935	[0.499, 35.86]	1.52	[0.029, 13.24]	0.272	[0, 6.949]
Fuentes móviles	35.81	[23.25, 71.05]	36.89	[22.31, 73.85]	38.	[22.87, 66.99]
Fuentes naturales	0.317	[0.144, 0.702]	0.292	[0.144, 0.643]	0.238	[0.143, 0.625]
Total de emisiones	237.8	[158, 290.7]	222	[154.3, 279.9]	229.5	[156.1, 282.7]
NOX						
Fuentes de área	4.441	[3.314, 5.682]	4.087	[3.244, 5.142]	4.2	[2.979, 5.519]
Fuentes puntuales	0.384	[0.043, 3.862]	0.225	[0, 1.726]	0.079	[0, 1.052]
Fuentes móviles	50.71	[27.05, 107.6]	50.71	[26.26, 103.5]	51.21	[24.95, 103.8]
Fuentes naturales	0.056	[0.052, 0.063]	0.055	[0.051, 0.060]	0.055	[0.052, 0.058]
Total de emisiones	62.06	[37.11, 120.8]	59.36	[35.76, 122.5]	60.18	[33.7, 112.5]

RIQ: Rango inter-cuartil [25%, 75%], Med: Mediana, PM₁₀: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 µm, PM_{2.5}: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm, COV: Compuestos orgánicos volátiles, TOX: Compuestos tóxicos, COT: Compuestos orgánicos totales NOX: Óxidos de nitrógeno

➤ *6.6 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 2) y el contenido relativo de ADNmt placentario.*

Los resultados de las diversas correlaciones realizadas entre los contaminantes con sus respectivas fuentes de emisión y el contenido relativo de ADNmt se muestran en la Tabla 10.

Se obtuvieron dos correlaciones marginalmente significativas ($P < 0.06$) entre el número de copias de ADNmt y los niveles de compuestos orgánicos tóxicos provenientes de fuentes naturales ($\rho = -0.1789$), así como de fuentes puntuales de PM_{10} ($\rho = 0.189$), ambas correspondientes al radio de influencia de 500m.

Tabla 10. Correlaciones de Spearman entre los diferentes contaminantes y el contenido relativo de ADNmt placentario.

Contaminante y fuente	Radio del área de influencia (metros)			
	750m rho	500m rho	250m rho	
PM ₁₀	Fuentes de área	0.027	-0.016	0.130
	Fuentes puntuales	0.162	0.189 #	0.022
	Fuentes móviles	0.044	0.058	0.067
	Fuentes naturales	0.034	-0.008	0.011
	Total de emisiones	0.048	0.058	0.113
PM _{2.5}	Fuentes de área	0.090	0.076	0.116
	Fuentes puntuales	0.175	0.167	0.022
	Fuentes móviles	0.044	0.070	0.081
	Fuentes naturales	0.030	-0.021	0.009
COV	Total de emisiones	0.120	0.153	0.088
	Fuentes de área	0.164	0.148	0.067
	Fuentes puntuales	0.109	0.163	0.016
	Fuentes móviles	0.015	0.021	0.032
TOX	Fuentes naturales	-0.178	-0.179	-0.163
	Total de emisiones	0.102	0.162	0.102
	Fuentes de área	0.097	0.120	0.013
	Fuentes puntuales	-0.042	0.111	-0.031
COT	Fuentes móviles	0.030	0.036	0.060
	Fuentes naturales	-0.178	-0.186 #	-0.153
	Total de emisiones	-0.027	0.120	-0.003
	Fuentes de área	0.126	0.114	0.023
NOX	Fuentes puntuales	0.108	0.164	0.015
	Fuentes móviles	0.010	0.017	0.024
	Fuentes naturales	-0.178	-0.179	-0.163
	Total de emisiones	0.081	0.137	0.059
NOX	Fuentes de área	0.110	0.054	0.023
	Fuentes puntuales	0.105	0.118	0.016
	Fuentes móviles	0.031	0.048	0.049
	Fuentes naturales	0.066	0.140	0.173
Total de emisiones	0.102	0.137	0.062	

$P < 0.06$ (Marginal) * $P < 0.05$, PM_{10} : Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 10 μm , $PM_{2.5}$: Material particulado de diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm , COV: Compuestos orgánicos volátiles, TOX: Compuestos tóxicos, COT: Compuestos orgánicos totales NOX: Óxidos de nitrógeno.

7. DISCUSIÓN

➤ 7.1 Comportamiento del PM_{10} $PM_{2.5}$ y O_3 en la ZMVM durante los años de estudio (Modelo 1).

En la ZMVM se alcanzan concentraciones de contaminantes atmosféricos que superan las recomendaciones de la OMS, así como los límites establecidos en la NOM, causando que se clasifique la calidad del aire como mala, la mayoría de los días del año (SEDEMA, 2020). En esta zona se presenta dos épocas marcadas del año, que modifican el comportamiento de los contaminantes atmosféricos; la época de lluvias que comprende de junio a octubre y la época seca que va desde noviembre a mayo.

En la gráfica de comportamiento del PM (Figura 4), se observan diferencias en las concentraciones registradas entre la época de lluvias y secas durante los tres años ($P < 0.001$). Además, no se encontraron diferencias entre las tres temporadas de lluvias o las de secas, es decir que a lo largo de los años se mantiene el comportamiento de mayores concentraciones en secas con medianas similares, y bajas concentraciones en lluvias. Estos datos son acordes a lo reportado por el SIMAT, ya que por las lluvias se da la precipitación del PM, y por ende una menor concentración en el aire (SEDEMA, 2017).

Mientras que en la Figura 5, los valores máximos registrados para el O_3 no superan el límite permitido, debido a que los datos usados para construir la figura corresponden al promedio diario, mientras que el límite para este contaminante se establece en periodos de 1 o 8 horas (NOM-020-SSA1-2014).

Al observar la gráfica (Figura 5) se ve un pico entre los meses marzo a junio todos los años, época donde se registra con mayor frecuencia concentraciones de O_3 que superan los límites permitidos. Esto se debe al origen fotoquímico del contaminante; que se da al exponer NOX, óxidos de azufre (SOX), algunos hidrocarburos, COV, entre otros a radiación ultravioleta (SEDEMA, 2017 y SEMARNAT, 2005) y los días más largos, despejados, con pocos vientos que se dan en estos meses. Es decir que el comportamiento del O_3 no está directamente ligado al régimen de lluvias, sino a la intensidad lumínica y duración de los días, que se presenta en las diferentes épocas del año; razón por la cual no se encontraron diferencias estadísticas para el O_3 entre época de lluvias y secas.

➤ 7.2 Exposición gestacional a PM_{10} $PM_{2.5}$ y O_3 (Modelo 1)

La exposición a contaminación atmosférica durante la gestación y crecimiento del recién nacido causa efectos adversos en el embarazo, en el parto y largo plazo en la salud del infante (Perera, 2018). Los límites impuestos en la NOM para los contaminantes criterios son superiores a los recomendados por la OMS (SEDEMA, 2017). Pese a ello como se puede evidenciar las figuras 3A, 3B, la mayoría de las mujeres embarazadas estuvieron expuestas a concentraciones de PM_{10} superiores al límite, y en la totalidad de las madres a valores superiores al límite de $PM_{2.5}$.

Esto no ocurre con la exposición a O₃ (Figura 5C) ya que como se explicó previamente los datos reportados en este trabajo están calculados en términos de 24 horas, mientras que la norma está establecida en intervalos de tiempo menores (NOM-020-SSA1-2014).

➤ 7.3 *Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 1) y el contenido relativo de ADNmt placentario.*

Nosotros encontramos una modulación positiva del número de copias relativas de ADNmt placentario correlacionado con la concentración de PM₁₀, PM_{2.5} y O₃ a la que fue expuesta la madre durante la gestación en las ventanas de tiempo analizadas; con PM₁₀ en el último mes, últimos dos meses, últimos tres meses y todo el embarazo, con PM_{2.5} último mes, últimos dos meses y último trimestre, así como con el O₃ en el último mes y últimos dos meses (Tabla 7 y Figura 7).

Estos resultados son contrarios a los antecedentes directos de exposición gestacional a contaminación atmosférica, asociados con el contenido de ADNmt de placenta humana reportados por Janssen *et al.* en el 2012; Clemente *et al.*, (2015) y (2017), donde se encontraron asociaciones negativas entre la exposición a PM₁₀ y NO₂ con el biomarcador.

Sin embargo, es coherente con múltiples estudios donde se observaron correlaciones y asociaciones positivas entre contaminantes del aire y el número de copias de ADNmt, en diferentes modelos de exposición y tejidos analizados (Tabla 11). Como los hallazgos de Breton *et al.*, (2019) donde observaron un mayor número de copias de ADNmt en sangre de cordón umbilical asociado con una mayor exposición a contaminantes del aire relacionados con el tráfico. O los resultados de Cao *et al.*, (2020), quienes encontraron una relación positiva entre concentración de HAP en orina materna y mayor número de copias de ADNmt en sangre de cordón umbilical, así como un menor desarrollo neurológico del niño a los dos años.

También se ha observado la misma tendencia en trabajos de exposición ocupacional, como lo hecho por Pavanello *et al.*, (2013) donde los trabajadores polacos expuestos a HAP presentan mayor número de copias de ADNmt en sangre periférica. O el realizado en 2010 por Hou *et al.*, (2010) donde se asoció la exposición a PM con un mayor contenido de ADNmt en leucocitos de sangre periférica de empleados de una fábrica fundidora de acero en Brescia, Italia. También la investigación de Carugno *et al.*, (2012), donde encontró en tres ciudades italianas que los trabajadores expuestos a benceno en bajas dosis presentan un mayor número de copias de ADNmt en sangre periférica.

Aunado a lo mencionado, hay investigaciones realizadas *in vitro* como el trabajo de Eom *et al.*, (2011), donde observaron un incremento del número de copias cuando se exponen a benceno cultivos primarios de células mononucleares periféricas, células madre hematopoyéticas y líneas celulares de leucemia (K562 y MOLT-4). Así como un aumento en la masa mitocondrial y un incremento del potencial de membrana.

Además del estudio de Kim *et al.*, (2014), realizado en la línea celular THP-1 e *in vivo* en embriones de pez cebra, se observó un aumento drástico del número de copias del ADNmt con la exposición a fluoranteno y pireno.

Lee y colaboradores en el 2000 encontraron que el estrés oxidante induce la replicación del ADNmt al exponer a células MRC-5 a H₂O₂, al observar un incremento del contenido del material genético de la mitocondrial, además de un aumento de la masa en las mitocondrias.

Tabla 11. Estudios donde se ha asociado la exposición a contaminantes atmosféricos con el aumento del contenido relativo de ADNmt.

Tipo de exposición	Muestra	Contaminante	Efecto	Referencia
Ocupacional	Sangre periférica	HAP	↑ Contenido de ADNmt	(Pavanello <i>et al.</i> , 2013)
	Sangre periférica	PM	↑ Contenido de ADNmt	(Hou <i>et al.</i> , 2010)
	Sangre periférica	Benceno (bajas dosis)	↑ Contenido de ADNmt	(Carugno <i>et al.</i> , 2012)
Gestacional	Placenta	B-hexaclorociclohexano Arsénico	↑ Contenido de ADNmt	(Vriens <i>et al.</i> , 2017)
	Sangre de cordón umbilical	TRAP	↑ Contenido de ADNmt	(Breton <i>et al.</i> , 2019)
	Sangre de cordón umbilical	HAP	↑ Contenido de ADNmt	(Cao <i>et al.</i> , 2020)
<i>In Vitro</i>	PBMC HCM K562 y MOLT-4	Benceno	↑ Contenido de ADNmt	(Eom <i>et al.</i> , 2011)
	THP-1	Fluoranteno y pireno	↑ Contenido de ADNmt	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
	MRC-5	H ₂ O ₂	↑ Contenido de ADNmt	(Lee <i>et al.</i> , 2000)
<i>In Vivo</i>	Embriones de pez cebra	Fluoranteno y pireno	↑ Contenido de ADNmt	(Kim <i>et al.</i> , 2014)

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno, HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, HCM: Miocitos cardíacos humanos primarios, K562: Línea celular de leucemia mieloide crónica, MOLT-4: leucemia linfoblástica aguda humana de células T, MRC-5: Cepa celular 5 del Consejo de Investigación Médica de Reino Unido, PBMC: Células mononucleares de sangre periférica, PM: Material particulado, TRAP: Contaminantes del aire relacionados con el tráfico, THP-1: Línea celular monocítica de leucemia humana.

Se ha propuesto que este aumento del número de copias del ADNmt se da por dos razones, la primera es fungir como un mecanismo de protección por abundancia, diluyendo el número de lesiones por kilo base, y para compensar las copias dañadas (Dannenmann *et al.*, 2017). La segunda es estimular la proliferación mitocondrial con el fin de satisfacer la demanda energética requerida para la síntesis de proteínas y la reparación de daños inherentes al estrés oxidante. (Lee y Wei., 2000; Carugno *et al.*, 2012).

Sin embargo, dicho aumento de mitocondrias disfuncionales puede conducir a una mayor producción de ROS y finalmente la liberación de señales de muerte celular como el citocromo

C (CytC) y el factor inductor de la apoptosis (AIF) (Lee y Wei, 2005; Van Houten *et al.*, 2006).

Malik y Czajka, (2013) proponen el aumento en el número de copias de ADNmt como biomarcador de disfunción mitocondrial, esto basado en que el daño al material genético por estrés oxidante desemboca en la replicación del ADNmt. Como consecuencia, se da un aumento en la cuantificación de copias funcionales, así como de fragmentos dañados que no se eliminan correctamente. Se ha evidenciado que las copias dañadas del ADNmt en condiciones de estrés oxidativo son liberadas al citoplasma y a la matriz extracelular, estimulando la producción de interleucinas proinflamatorias (Chen *et al.*, 2018).

Adicionalmente, se sabe que la contaminación del aire es fuente de estrés oxidante en las células. Ejemplo de ello, es que el PM puede tener adherido en su superficie diversos compuestos como; radicales libres, HAP, nitro-HAP, metales de transición que catalizan la reacción de Fenton, entre otros materiales que producen directa o indirectamente ROS (Lodovici y Bigagli., 2011). Además, el PM al ingresar al organismo como un cuerpo extraño produce inflamación, factor que contribuye a generar estrés oxidante (Saenen *et al.*, 2019).

También se ha observado que los contaminantes atmosféricos pueden causar estrés oxidante específicamente en el tejido placentario; como lo demuestran los trabajos de Rossner *et al.*, (2011) y Saenen *et al.*, (2016), donde se asoció un incremento de la exposición a PM_{2.5} con una mayor cantidad de 8-OHdG y 3-NT respectivamente.

Adicionalmente, se ha demostrado que el ADNmt es de 3 a 10 veces más susceptible al daño causado por estrés oxidante, que el ADNnuc (Van Houten *et al.*, 2006). Nosotros encontramos en este estudio, que el aumento del contenido relativo de ADNmt se correlaciona positivamente con los niveles de PM, los HAP y el O₃, detectados en el aire atmosférico en los últimos meses del embarazo. Maciel-Ruiz *et al.*, (2019) encontró una correlación positiva y significativa entre las concentraciones de O₃ durante el último mes del embarazo y los niveles de 8-isoprostano prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) en plasma materno; este metabolito es un reconocido biomarcador de estrés oxidante. Además, se sabe que también las partículas inducen estrés oxidante y aductos (Figura 9), lo que en conjunto podrían originar el aumento de copias del ADNmt.

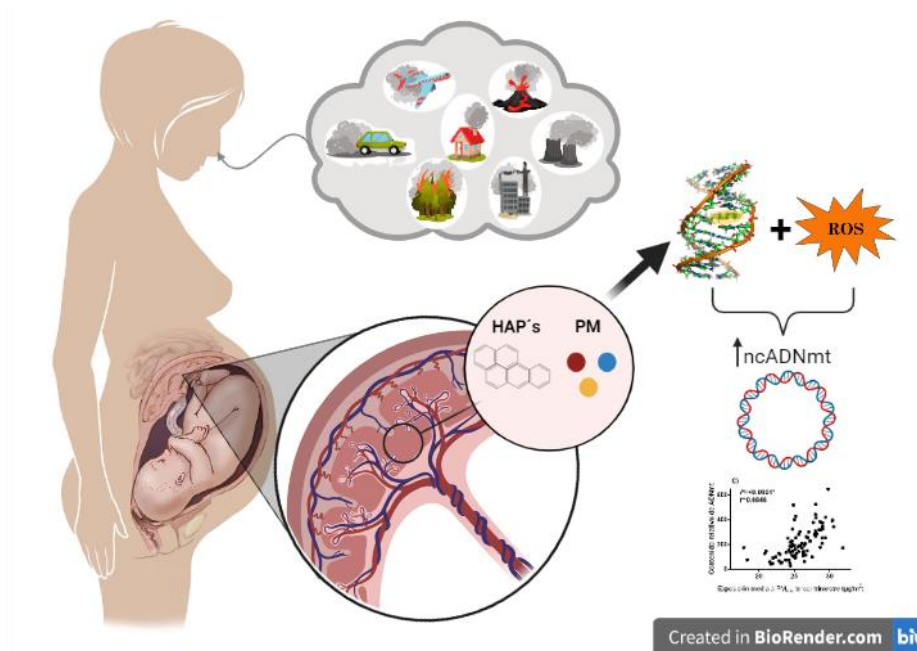


Figura 9. Imagen resumen. Planteamos que el aumento del número de copias de ADNmt placentario se debe a mecanismos compensatorios al daño inducido por la contaminación atmosférica. ADNmt: ADN mitocondrial HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, PM: Material particulado. ADNmt: ADN mitocondrial.

Por otra parte, en investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo donde se empleó una cohorte que incluye las muestras analizadas en el presente estudio. Se encontró una correlación positiva entre los aductos en sangre de cordón umbilical con la exposición a PM₁₀ y PM_{2.5}, presentando la correlación más fuerte con la fracción fina (PM_{2.5}) que esta enriquecida con HAP (Salcido-Neyoy *et al.*, 2015).

Esto sugiere que los HAP presentes en la contaminación atmosférica de ZMVM llegan hasta los tejidos fetales (incluyendo la placenta) y forman aductos. Daño que cobra especial relevancia en la mitocondria, ya que esta carece del mecanismo NER encargado de reparar los daños que causan estas deformaciones del ADN (Lee y Wei, 2000; Lee y Wei, 2005).

En otra investigación de nuestro grupo de trabajo se evidenció la expresión de la proteína CYP1B1 en el tejido placentario, siendo esta mayor en la cara fetal comparado con la materna (Huitrón, 2022). Esta proteína está involucrada en el metabolismo de estrógenos, sin embargo, también puede participar en el metabolismo e inactivación de xenobióticos como los HAPs, por lo cual una alta concentración proteica de este citocromo puede promover la formación de aductos (Sadikovic y Rodenhiser, 2012).

Adicionalmente, se ha observado que los HAP y sus metabolitos tiene una mayor afinidad por el ADNmt en comparación con el ADNnuc, por ejemplo, el B[a]P tiene una afinidad 40 a 90 veces mayor por el ADNmt (Allen y Coombs, 1980; Backer y Weinstein, 1982). Ello podría ocurrir porque en la mitocondria se expresa el citocromo 1B1 asociado a la generación del B[a]P diol-epóxido que se une al ADN generando aductos y a la incapacidad de la mitocondria de reparar estos aductos voluminosos (Lee y Wei, 2000; Lee y Wei, 2005).

Se ha reportado que en la CDMX el B[a]P es el segundo HAP más abundante en la fracción ultrafina del PM (Morales-Rubio *et al.*, 2019). También se sabe que esta misma fracción tiende a acumularse en la mitocondria (Grandjean *et al.*, 2008).

Posiblemente por estas mismas razones, se observa una asociación positiva entre el número relativo de copias de ADNmt placentario con el número de aductos en sangre de cordón umbilical y sangre periférica materna (Tabla 8). Aunque no se cuantificaron los aductos directamente en el ADNmt placentario, los niveles de estos nos sugieren la magnitud del daño causado en el tejido fetal, mismo que se correlaciona con el número de copias de ADNmt. Respaldando el planteamiento: a mayor daño, mayor número de copias de ADNmt

Sin embargo, proponemos que el aumento del contenido del ADNmt no continúa indefinidamente. Existen reportes como el realizado por Li *et al.* (2020), donde se observa que a exposiciones bajas a benceno hay un aumento del contenido del ADNmt, pero a altas concentraciones no se encuentra ninguna asociación, lo que sugiere que llega un punto donde el número de copias no cambia, aunque, se desconoce si varía la relación copias funcionales/copias dañadas.

Finalmente, la exposición prolongada a los contaminantes o concentraciones mayores de estos provoca la muerte celular programada y, por ende, la reducción del número de copias. Lo que podría explicar los trabajos donde se observa una relación negativa entre concentración de contaminante y el contenido relativo de ADNmt placentario.

Por otro lado, el comportamiento del biomarcador correlacionado con la estimación de exposición a PM_{10-2.5} no es el esperado. Ya que se observan correlaciones más fuertes con esta fracción que con la fracción fina (PM_{2.5}) (Tabla 7), la cual por su tamaño es la que ingresa con mayor facilidad al torrente sanguíneo y a la placenta. Este comportamiento nos sugiere que la fracción PM_{10-2.5} tiene altas concentraciones de agentes que pueden dañar y/o modular el contenido de ADNmt placentario.

En cuanto a la comparación entre el contenido relativo de ADNmt placentario en las temporadas del año, al agrupar los partos de la temporada de lluvias y la temporada de secas, encontramos diferencias en número relativo de copias de ADNmt entre los dos grupos ($P < 0.0001$), siendo mayor el contenido en la temporada que presenta niveles superiores de contaminantes atmosféricos (Figura 7). Estos resultados son coherentes con las observaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo por la doctora Garcia-Suastegui *et al.* (2010), donde se encontró variación temporal de la cantidad de aductos presentes en sangre periférica de adultos jóvenes, causada por la estacionalidad en la CDMX. Así como el trabajo del doctor Maciel-Ruiz *et al.* (2019) donde se reporta mayor número de aductos en sangre materna y de cordón umbilical en la época seca.

Continuando con los análisis realizados tomando en cuenta la temporada del año, se denota en la figura 8 una fuerte correlación entre el contenido relativo de ADNmt placentario y PM₁₀ en la temporada de lluvias de los dos años, y menor en la temporada seca. Esto posiblemente se deba a que en esta última temporada hay mayores concentraciones de otros contaminantes atmosféricos que pueden llegar a modular el biomarcador, enmascarando el efecto PM.

Por otro lado, es importante resaltar que el O₃ es un oxidante fuerte, cuyos efectos en el cuerpo están descritos principalmente en sistema respiratorio, al ser es el punto por donde entra al organismo (Contreras *et al.*, 2013). Pese a esto, se encontró una correlación positiva entre exposición promedio a O₃ y el contenido de ADNmt placentario (Tabla 4). Lo que sugiere que existe algún mecanismo por el cual el contaminante podría modular el biomarcador.

Este contaminante no es el único gas que se ha visto correlacionado con el contenido de ADNmt placentario, Clemente *et al.* (2015) y (2017) encontraron una asociación negativa entre el biomarcador con los niveles de exposición prenatal a NO₂, gas cuyos efectos principales también son en el sistema respiratorio.

El mecanismo por el cual gases tan reactivos tienen efectos en la placenta, aún se desconoce, pero podría estar ligado a la producción de moléculas proinflamatorias de los tejidos maternos dañados, las cuales pueden llegar a la placenta (Luyten *et al.*, 2018)

➤ *7.4 Correlación entre la contaminación atmosférica (Modelo 2) y el contenido relativo de ADNmt placentario.*

De las múltiples correlaciones realizadas, solamente se encontraron dos resultados estadísticamente marginales (Tabla 10). Esto contrasta con los datos mostrados anteriormente (Tabla 7) donde se observa una fuerte correlación entre el contenido de ADNmt y la exposición a contaminantes, específicamente al PM en los dos diámetros aerodinámicos analizados.

Esto posiblemente se deba a que el modelo 2 de exposición, tiene una muy buena resolución espacial (Figura 2) pero una baja resolución temporal, dado que los valores de exposición obtenidos están reportados en toneladas promedio por año y no distinguen los cambios estacionales en las concentraciones de contaminantes que ocurren a lo largo del año por la presencia de las lluvias. Y como se discutió en el apartado anterior la temporada afecta el comportamiento del biomarcador empleado (Figura 7)

Además, el ADNmt como lo sugieren los datos presentados en los apartados anteriores, tiene una ventana de sensibilidad en el último trimestre (tabla 7). Siendo esto concordante con lo reportado por Janssen *et al.* (2012), donde reportaron una relación fuerte entre el ADNmt placentario y la exposición PM₁₀ desde la última semana hasta el tercer trimestre, siendo este el punto de mayor asociación, y posteriormente decae abruptamente. Y de manera parcial con lo reportado por Rosa *et al.* (2017), quienes proponen que la ventana de sensibilidad a contaminación ambiental para este biomarcador se da de la semana 35 a la 40.

8. LIMITACIONES

Reconocemos que este trabajo presenta limitaciones. Al momento del parto se recolectó por cada voluntaria el tejido placentario; representando una única muestra por cada madre en la culminación de la gestación. El contenido relativo de ADNmt placentario lo extrapolamos con la exposición estimada a contaminantes en diferentes ventanas de tiempo previas al momento de dar a luz. Sin embargo, en las ventanas de tiempo más grandes, desconocemos si la ausencia de asociaciones se debe a que el biomarcador no es modulado por el contaminante, o porque la muestra no refleja lo ocurrido en dicho momento, dada naturaleza dinámica del ADNmt.

Por otra parte, se emplearon criterios de inclusión para asegurar que todos los recién nacidos del estudio fueran niños sanos, esto pudo causar que no se evidenciaran las asociaciones con el peso y talla, al excluir los nacimientos pretérminos.

También reconocemos que los valores de exposición estimados para cada madre son calculados con información del aire exterior. Este valor va a variar al interior de los hogares dependiendo de los hábitos y cuidados de cada madre.

9. PERSPECTIVAS

Este trabajo explora las correlaciones entre el número relativos de copias de ADNmt placentario con la exposición gestacional a contaminantes atmosféricos y abre la puerta a diversos análisis que complementen y comprueben lo planteado. En primera instancia determinar el daño del ADNmt placentario, además de evaluar la función mitocondrial en las placentas en las muestras empleadas en este estudio, nos daría herramientas para dilucidar porque se está modulando el biomarcador.

También muestra la necesidad de estudios *in vitro*, ya que no encontramos ningún estudio donde se analice el ADNmt en células expuestas a PM de manera aguda o crónica para estudiar la relación dosis-respuesta. Adicionalmente también sería importante realizar estudios *in vivo* en modelos murinos, donde se puedan controlar múltiples variables ambientales que pueden llegar a influir en el biomarcador

10. CONCLUSION

Se encontraron correlaciones positivas entre el contenido relativo de ADNmt y la exposición gestacional a PM_{10} , $PM_{2.5}$ y O_3 . Así mismo con el número de aductos en leucocitos de sangre materna y de sangre del cordón umbilical en. Estos hallazgos sugieren que el aumento de ADNmt placentario podría constituir una respuesta a los daños causados por el estrés oxidante y aductos inducidos por la contaminación atmosférica.

11. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi madre Nubia Moreno Salamanca, que con su gran espíritu y fuerza me motivo a seguir este camino, y me apoyo incondicionalmente durante este tiempo.

A la doctora Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte que me abrió las puertas de su laboratorio y fue una magnífica tutora, que me guio he impulso para desarrollar este trabajo.

A mi pareja Noemi Cindirella Hernandez Flores que compartió junto a mi este proceso, me apoyo y acompaño en cada paso, compartió conmigo varias de las noches de desvelo y corrigió algunas de las barbaridades que escribí bajo la influencia de Morfeo.

Al doctor Jorge Maciel Ruiz que no fungió como mentor y se convirtió en un gran amigo con el que he podido compartir en la vida académica y personal.

A mi hermana Paola Andrea Rodriguez Moreno, que siempre ha estado en los momentos difíciles y que me ha apoyado cuando lo he necesitado.

Al doctor Jesús Espinosa por sus observaciones y correcciones. Y a la doctora Claudia García por sus comentarios y permitirme realizar en su laboratorio una pasantía, fruto de la cual están dos datos del Sistema modelado de emisiones.

A los doctores Pavel Petrosyan y Renato León técnicos del laboratorio que me ayudaron y aconsejaron experimentalmente.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Wendy González, Erik Castillo, Luis Ángel Albarrán y Claudia Huitrón, que respondieron mis dudas y me acompañaron en los días de trabajo.

12. REFERENCIAS

- Allen, J. A. y Coombs, M.M. (1980). Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature*, 287(5779), 244-245.
- Backer, J. M., & Weinstein, I. B. (1982). Interaction of benzo (a) pyrene and its dihydrodiol-epoxide derivative with nuclear and mitochondrial DNA in C3h10t½ cell cultures. *Cancer research*, 42(7), 2764-2769.
- Bateson, T. F., & Schwartz, J. (2007). Children's response to air pollutants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(3), 238-243.
- Bové, H., Bongaerts, E., Slenders, E., Bijmens, E. M., Saenen, N. D., Gyselaers, W., ... & Nawrot, T. S. (2019). Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta. *Nature communications*, 10(1), 1-7.
- Breton, C. V., Song, A. Y., Xiao, J., Kim, S. J., Mehta, H. H., Wan, J., ... Cohen, P. (2019). Effects of air pollution on mitochondrial function, mitochondrial DNA methylation, and mitochondrial peptide expression. *Mitochondrion*, 46, 22-29.
- Cao, X., Li, J., Cheng, L., Deng, Y., Li, Y., Yan, Z., ... & Tang, D. (2020). The associations between prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites, umbilical cord blood mitochondrial DNA copy number, and children's neurobehavioral development. *Environmental Pollution*, 265, 114594.
- Carugno, M., Pesatori, A. C., Dioni, L., Hoxha, M., Bollati, V., Albetti, B., ... & Baccarelli, A. (2012). Increased mitochondrial DNA copy number in occupations associated with low-dose benzene exposure. *Environmental health perspectives*, 120(2), 210-215.
- Chen, Y., Zhou, Z., & Min, W. (2018). Mitochondria, oxidative stress and innate immunity. *Frontiers in physiology*, 9, 1487.
- Clemente, D. B., Casas, M., Vilahur, N., Begiristain, H., Bustamante, M., Carsin, A. E., & Janssen, B. G. (2015). Prenatal ambient air pollution, placental mitochondrial DNA content, and birth weight in the INMA (Spain) and ENVIRONAGE (Belgium) birth cohorts. *Environmental health perspectives*, 124(5), 659.
- Clemente, D. B., Casas, M., Janssen, B. G., Lertxundi, A., Santa-Marina, L., Iñiguez, C & Vrijheid, M. (2017). Prenatal ambient air pollution exposure, infant growth and placental mitochondrial DNA content in the INMA birth cohort. *Environmental research*, 157, 96-102.
- Contreras, A. M., García, V. G., Hernández, B. I. (2013). Calidad del aire: una práctica de vida. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ciudad de Mexico.
- Dannenmann, B., Lehle, S., Lorscheid, S., Huber, S. M., Essmann, F., & Schulze-Osthoff, K. (2017). Simultaneous quantification of DNA damage and mitochondrial copy number by long-run DNA-damage quantification (LORD-Q). *Oncotarget*, 8(68), 112417.
- Desai, G., Chu, L., Guo, Y., Myneni, A. A., & Mu, L. (2017). Biomarkers used in studying air pollution exposure during pregnancy and perinatal outcomes: a review. *Biomarkers*, 22(6), 489-501.

- Druzhyina, N. M., Wilson, G. L., & LeDoux, S. P. (2008). Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mechanisms of ageing and development*, 129(7-8), 383-390.
- Eom, H. Y., Kim, H. R., Kim, H. Y., Han, D. K., Baek, H. J., Lee, J. H., ... & Shin, M. G. (2011). Mitochondrial DNA copy number and hnRNP A2/B1 protein: biomarkers for direct exposure of benzene. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(12), 2762-2770.
- Fetterman, J. L., Sammy, M. J., & Ballinger, S. W. (2017). Mitochondrial toxicity of tobacco smoke and air pollution. *Toxicology*, 391, 18-33.
- Garcia-Suastegui, W. A., Huerta-Chagoya, A., Carrasco-Colin, K. L., Pratt, M. M., John, K., Petrosyan, P., ... & Gonsebatt, M. E. (2010). Seasonal variations in the levels of PAH-DNA
- Gonzalez-Hunt, C. P., Rooney, J. P., Ryde, I. T., Anbalagan, C., Joglekar, R., & Meyer, J. N. (2016). PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. *Current protocols in toxicology*, 67(1), 20-11.
- Grandjean, P., Bellinger, D., Bergman, Å., Cordier, S., Davey-Smith, G., Eskenazi, B. & Heindel, J. J. (2008). The faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 102(2), 73-75.
- Hou, L., Zhu, Z. Z., Zhang, X., Nordio, F., Bonzini, M., Schwartz, J., ... & Baccarelli, A. (2010). Airborne particulate matter and mitochondrial damage: a cross-sectional study. *Environmental Health*, 9(1), 1-9.
- Huitrón (2022). Tesis: Expresión de enzimas del metabolismo de xenobióticos y de reparación de ADN en placentas y su relación con los niveles de PM2.5 y PM10 en la Zona Metropolitana del Valle de México. Universidad Nacional Autónoma De México
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012). Benzo[a]pyrene, IARC MONOGRAPHS – 100F. Consultado en <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-14.pdf>
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2013). Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. world health organization. Consultado en https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/pr221_E.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2021). Censo de Población y Vivienda 2020. Consultado en <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/>
- Janssen, B. G., Munters, E., Pieters, N., Smeets, K., Cox, B., Cuypers, A., & Nawrot, T. S. (2012). Placental mitochondrial DNA content and particulate air pollution during in utero life. *Environmental health perspectives*, 120(9), 1346.
- Kim, H. Y., Kim, H. R., Kang, M. G., Trang, N. T. D., Baek, H. J., Moon, J. D., ... & Shin, M. G. (2014). Profiling of biomarkers for the exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons: lamin-A/C isoform 3, poly [ADP-ribose] polymerase 1, and mitochondria copy number are identified as universal biomarkers. *BioMed research international*. 2014
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N., et al (2017). The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, 391(10119), 462–512.

- Landrigan, P.J., Fuller, R., Fisher, S., Suk, W.A., Sly, P., Chiles, T.C., and Bose-O'Reilly, S. (2019). Pollution and children's health. *Sci Total Env.* 650, 2389–2394.
- Lee, H.C., Yin, P. H., Lu, C.Y, Chi, C. W., Wei, Y. H. (2000). Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochemical journal*, 348(2), 425-432.
- Lee, H. C., Wei, Y. H. (2000). Mitochondrial role in life and death of the cell. *Journal of biomedical science*, 7(1), 2-15.
- Lee, H. C., Wei, Y. H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(4), 822-834.
- Li, A., Sun, Y., Wang, T., Wang, K., Wang, T., Liu, W., ... & Xia, Z. L. (2020). Effects of Micronucleus Frequencies and Mitochondrial DNA Copy Numbers among Benzene-Exposed Workers in China. *Environmental and molecular mutagenesis*, 61(3), 355-360.
- Lodovici, M., & Bigagli, E. (2011). Oxidative stress and air pollution exposure. *Journal of toxicology*, 2011.
- LoMauro, A., & Aliverti, A. (2015). Respiratory physiology of pregnancy: physiology masterclass. *Breathe*, 11(4), 297-301.
- Luyten, L. J., Saenen, N. D., Janssen, B. G., Vrijens, K., Plusquin, M., Roels, H. A., ... & Nawrot, T. S. (2018). Air pollution and the fetal origin of disease: a systematic review of the molecular signatures of air pollution exposure in human placenta. *Environmental research*, 166, 310-323.
- Maciel-Ruiz, J. A., López-Rivera, C., Robles-Morales, R., Veloz-Martínez, M. G., López-Arellano, R., Rodríguez-Patiño, G., ... & Montero-Montoya, R. (2019). Prenatal exposure to particulate matter and ozone: Bulky DNA adducts, plasma isoprostanes, allele risk variants, and neonate susceptibility in the Mexico City Metropolitan Area. *Environmental and molecular mutagenesis*.
- Malik, A. N., Shahni, R., Rodriguez-de-Ledesma, A., Laftah, A., & Cunningham, P. (2011). Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(1), 1-7.
- Malik, A. N., & Czajka, A. (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction?. *Mitochondrion*, 13(5), 481-492.
- Morales-Rubio, R. A., Alvarado-Cruz, I., Manzano-León, N., Uribe-Ramirez, M., Quintanilla-Vega, B., Osornio-Vargas, A., & De Vizcaya-Ruiz, A. (2019). In utero exposure to ultrafine particles promotes placental stress-induced programming of renin-angiotensin system-related elements in the offspring results in altered blood pressure in adult mice. *Particle and fibre toxicology*, 16(1), 7.
- Mugica V., Figueroa J. J., & Moreno, A. H. (2010). Evaluación y Seguimiento del Programa para Mejorar la Calidad del Aire en la Zona Metropolitana del Valle de México 2002-2010. Descripción del PROAIRE.

Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.

NOM-021-SSA1-1993. (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.

NOM-023-SSA1-1993 (1993). NORMA Oficial Mexicana NOM-023-SSA1-1993, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al bióxido de nitrógeno (NO₂). Valor normado para la concentración de bióxido de nitrógeno (NO₂) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población.

NOM-020-SSA1-2014 (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

NOM-025-SSA1-2014 (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

NOM-022-SSA1-2019 (2019). NORMA Oficial Mexicana NOM-022-SSA1-2019, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al dióxido de azufre (SO₂). Valores normados para la concentración de dióxido de azufre. Diario Oficial de la Federación (SO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016). La OMS publica estimaciones nacionales sobre la exposición a la contaminación del aire y sus repercusiones para la salud. Consultado en: <https://www.who.int/es/news/item/27-09-2016-who-releases-country-estimates-on-air-pollution-exposure-and-health-impact>

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018). Calidad del aire y salud. Consultado en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)

Pakendorf, B., & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 6, 165-183.

Pavanello, S., Dioni, L., Hoxha, M., Fedeli, U., Mielzynska-Švach, D., Baccarelli, A. A. (2013). Mitochondrial DNA copy number and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*.

Perera, F. (2018). Pollution from fossil-fuel combustion is the leading environmental threat to global pediatric health and equity: solutions exist. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 16.

Rodriguez-Cortes, Y., Mendieta-Zeron, H. (2014). La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. *Revista de medicina e Investigacion*, 2(1), 28-34.

Rosa, M. J., Just, A. C., Guerra, M. S., Kloog, I., Hsu, H. H. L., Brennan, K. J., ... & Baccarelli, A. A. (2017). Identifying sensitive windows for prenatal particulate air pollution exposure and mitochondrial DNA content in cord blood. *Environment international*, 98, 198-203.

Rossner Jr, P., Tabashidze, N., Dostal, M., Novakova, Z., Chvatalova, I., Spatova, M., & Sram, R. J. (2011). Genetic, biochemical, and environmental factors associated with pregnancy outcomes in newborns from the Czech Republic. *Environmental health perspectives*, 119(2), 265-271.

Sadikovic, B., Rodenhiser D I. (2012). Exposures to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En Sahu, S. C. (Ed.), *Toxicology and Epigenetics* (pp. 111-129). Reino unido: John Wiley & Sons, Ltd

Saenen, N. D., Vrijens, K., Janssen, B. G., Madhloum, N., Peusens, M., Gyselaers, W., ... & Nawrot, T. S. (2016). Placental nitrosative stress and exposure to ambient air pollution during gestation: a population study. *American journal of epidemiology*, 184(6), 442-449.

Saenen, N. D., Martens, D. S., Neven, K. Y., Alfano, R., Bové, H., Janssen, B. G., ... & Nawrot, T. S. (2019). Air pollution-induced placental alterations: an interplay of oxidative stress, epigenetics, and the aging phenotype?. *Clinical epigenetics*, 11(1), 1-14.

Salcido-Neyoy, M. E., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A. R., Gonsebatt, M. E., Meléndez-Zajgla, J., Morales-Bárceñas, R., ... & García-Cuellar, C. M. (2015). Induction of c-Jun by air particulate matter (PM10) of Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental pollution*, 203, 175-182.

Saravia, A. (2012). Evaluación de la edad gestacional por el método de capurro en comparación con los métodos de fecha de última menstruación y ecografía obstétrica en el primer trimestre, en los neonatos nacidos en el periodo comprendido entre enero 2009 y diciembre 2010, en el Hospital Quito No 1. Pontificia Universidad Católica Del Ecuador.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA). (2016). *Inventario de Emisiones de la Ciudad de México, Contaminantes Criterio, Tóxicos y Efecto Invernadero*. Ciudad de México.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA). (2017). *Calidad del aire en la Ciudad de México, informe 2016*. Dirección General de Gestión de la Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo Atmosférico. Ciudad de México.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA). (2018). *El monitoreo de la calidad del aire*. Consultado en:
<http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27ZaBhnmI=%27>

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México (SEDEMA). (2018). *El monitoreo de la calidad del aire*. Consultado en:
<http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27ZaBhnmI=%27>

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México. (SEDEMA). (2020). *Calidad del aire en la Ciudad de México, Informe 2018*. Dirección General de Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo de Calidad del Aire.

- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2005). Guía de elaboración y usos de inventario de emisiones. Primera edición Ciudad de México.
- Sordo, M., Maciel-Ruiz, J. A., Salazar, A. M., Robles-Morales, R., Veloz-Martínez, M. G., Pacheco-Limón, J. H., ... & Ostrosky-Wegman, P. (2019). Particulate matter-associated micronuclei frequencies in maternal and cord blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis*.
- Timon, A. (2016). Mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica De Valencia.
- Van den Hooven, E. H., Pierik, F. H., de Kluizenaar, Y., Willemsen, S. P., Hofman, A., van Ratingen, S. W., ... & Jaddoe, V. W. (2012). Air pollution exposure during pregnancy, ultrasound measures of fetal growth, and adverse birth outcomes: a prospective cohort study. *Environmental health perspectives*, 120(1), 150-156.
- Van Houten, B., Woshner, V., & Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA repair*, 5(2), 145-152.
- Venegas, V., Wang, J., Dimmock, D., & Wong, L.-J. (2011). Real-Time Quantitative PCR Analysis of Mitochondrial DNA Content. *Current Protocols in Human Genetics*, 68(1), 19.7.1–19.7.12.
- Vohra, K., Vodonos, A., Schwartz, J., Marais, E. A., Sulprizio, M. P., & Mickley, L. J. (2021). Global mortality from outdoor fine particle pollution generated by fossil fuel combustion: Results from GEOS-Chem. *Environmental Research*, 195, 110754.
- Vriens, A., Nawrot, T. S., Baeyens, W., Den Hond, E., Bruckers, L., Covaci, A., ... & Loots, I. (2017). Neonatal exposure to environmental pollutants and placental mitochondrial DNA content: A multi-pollutant approach. *Environment international*, 106, 60-68.
- Xu, Z., Xu, X., Zhong, M., Hotchkiss, I. P., Lewandowski, R. P., Wagner, J. G., ... & Sun, Q. (2011). Ambient particulate air pollution induces oxidative stress and alterations of mitochondria and gene expression in brown and white adipose tissues. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 1-14.
- Zhang, L., Liu, W., Hou, K., Lin, J., Zhou, C., Tong, X., ... & Zheng, Y. (2019). Air pollution-induced missed abortion risk for pregnancies. *Nature Sustainability*, 1-7.
- Zinovkina, L. A. (2018). Mechanisms of mitochondrial DNA repair in mammals. *Biochemistry (Moscow)*, 83(3), 233-249.