

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/236360073>

Caracterizacion toxicologica de particulas (PM 10) provenientes de tres zonas de la Ciudad de Mexico

Thesis · November 1999

CITATION

1

READS

4

1 author:



[Ernesto Alfaro-Moreno](#)

International Iberian Nanotechnology Laboratory

94 PUBLICATIONS 1,644 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Developing in vitro models to evaluate systemic effects induced by inhaled particles. [View project](#)



In silico evaluation of exposure to components adsorbed to urban particulate matter [View project](#)

11261

1
2ej?



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

"CARACTERIZACION TOXICOLOGICA DE PARTICULAS
(PM 10) PROVENIENTES DE TRES ZONAS DE LA
CIUDAD DE MEXICO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(B I O Q U I M I C A)
P R E S E N T A :
QFB ERNESTO ALFARO MORENO

ASESOR: DR. ALVARO ROMAN OSORNIO VARGAS

272978

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999

10



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de las Divisiones de Investigación Básica e Investigación Clínica del Instituto Nacional de Cancerología, SSA., bajo la dirección del Dr. Alvaro Román Osornio Vargas.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por medio de la beca de maestría (número de registro 87862), durante el periodo de enero de 1994 a marzo de 1996.

Comité Tutorial

Dr. Alvaro Román Osornio Vargas, Tutor

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez

Dr. Rogelio Pérez Padilla

Jurado

Dr. Carlos Santos Burgoa

Dr. Camilo Ríos

Dr. Alvaro Román Osornio Vargas

Dr. Rogelio Pérez Padilla

Dr. Luís Montaña

Dedicatoria

A RODRIGO. Todo mi amor para quien le ha dado un nuevo significado a esta vida.

A PATRICIA. Gracias por todo el amor y apoyo que cada día me das. Sin ti este trabajo no habría sido posible.

A mis Padres. Gracias por el ejemplo de trabajo y rectitud que me han dado toda la vida y gracias por el apoyo incondicional que he recibido bajo cualquier situación.

**A TODOS LOS MAESTROS DEL PASADO, DEL PRESENTE
Y DE SIEMPRE.**

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a Cesar Reyes Domínguez, María Prieto Escobio, Katia Molina Gil, Gabriel R. Avilés Flores, Daniel A. Juárez Ascencio, MVZ Carlos Tena Betancourt y MVZ Verónica Graullera Rivera por su valiosa colaboración y entusiasmo durante el desarrollo de los experimentos de instilación de animales de laboratorio. También quiero agradecer de manera muy especial al personal que labora en los bioterios del Instituto Nacional de Cancerología y del Instituto Nacional de la Nutrición por su colaboración para la evaluación de la calidad de los animales de bioterio en la Ciudad de México. A Geraldine Flores Rojas, Felipe Hartasánchez Frenk, Armando Orozco de la Huerta, Raúl Quintana Belmares y M en C Francisco Arenas Huertero por su participación en el proyecto que nos permitió estandarizar la técnica de anafases anormales. Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas, Sebastián García Saisó, Bart vanHartingsveldt, Samanta Trujillo Rueda y Sheila Castro Alfaro por su ayuda para montar la técnica de "cometas". También agradezco a M en I Patricia Domínguez Taylor, Dra. Irma Rosas Pérez, Dr. Rogelio Pérez Padilla, Dr. Carlos Santos Burgoa, Dr. Camilo Ríos y Dr. Luís Montaña, por sus valiosos comentarios a la presente tesis. Al Instituto Nacional de Cancerología por todas las facilidades prestadas, así como el apoyo para la realización de esta tesis, en especial al Dr. Gerardo Sánchez Mejorada y al Dr. Alejandro Mohar Betancourt.

De manera muy especial a la Dra. Irma Rosas Pérez ya que sin su apoyo y su guía no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Mi mas sincero agradecimiento y reconocimiento al Dr. Alvaro Osornio por todos estos años de guía y amistad.

INDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	
• Generalidades	5
• Contaminantes atmosféricos de la Ciudad de México	6
• Efectos biológicos de la contaminación por partículas	9
• Métodos utilizados para explorar el efecto tóxico de partículas	11
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	
• Obtención de las partículas	18
• Determinación de la presencia de elementos y endotoxinas	18
• Ensayos <i>in vitro</i>	19
Obtención de cultivos primarios	19
Preparación de las partículas para los ensayos <i>in vitro</i>	21
Determinación de la citotoxicidad y genotoxicidad de las partículas	21
RESULTADOS	
• Composición de las partículas	27
• Evaluación toxicológica <i>in vitro</i>	
Potencial citotóxico de las partículas	30
Anafases anormales	35
Inducción de cometas por partículas	35
DISCUSION	
• Composición de las partículas	40
• Evaluación toxicológica <i>in vitro</i>	41
Evaluación de citotoxicidad	42
Evaluación de daño al material genético	44
CONCLUSIONES	48
APENDICE	50
BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Asbesto crisótilo	AC
Bióxido de azufre	SO ₂
Centro	C
Ciudad de México	CM
Cristal violeta	CV
Cuarzo	Q
Cuerpos ferruginosos	CF
Dimetil sulfóxido	DMSO
Distrito Federal	D.F.
Embrión de hamster sirio	SHE
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Fibroblastos de pulmón de rata	RLF
Hierro Carbonilo	FeC
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez	INCICH
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán	INNSZ
Interleucina 1 beta	IL-1 β
Medio esencial mínimo de Dulbecco	DMEM
Monóxido de carbono	CO
Norte	N
Óxidos de nitrógeno	NO _x
Ozono	O ₃
Partículas con diámetros aerodinámicos menores de 10 μ m	PM10
Partículas suspendidas totales	PST
Plomo	Pb
Red Automática de Monitoreo Ambiental	RAMA
Solución amortiguadora de fosfatos	PBS
Suero Fetal de Bovino	SFB
Sur	S

RESUMEN

Los eventos de altas concentraciones de contaminación atmosférica por partículas ha sido relacionada con un incremento en la mortalidad y en el número de visitas a salas de emergencia en diferentes ciudades del mundo. La ciudad de México presenta un grave problema de contaminación por partículas y se sabe que existen diferencias en la composición dependiendo de la zona de la ciudad en la que estas sean colectadas. Se ha planteado la posibilidad de que la composición juegue un papel importante en el efecto de las partículas por lo que el presente estudio tiene por objetivo el evaluar en cultivos celulares el efecto citotóxico y genotóxico de las partículas con un diámetro aerodinámico menor a $10\ \mu\text{m}$ (PM10) colectadas en tres diferentes zonas de la ciudad. Se colectaron PM10 en el Norte, Centro y Sur de la ciudad y se determinó la presencia de algunos elementos así como de endotoxina. Se evaluó el efecto citotóxico en cultivos de células confluentes (Balb c, RLF y 34Lu) y en proliferación, tanto en alta (Balb c) como en baja (Balb c, RLF y SHE) densidad celular. Los cultivos de células Balb c fueron expuestos en condiciones de alta densidad celular y a concentraciones subletales para valorar la capacidad de inducir alteraciones tanto en el proceso de disyunción cromosómica, como rompimientos al material genético por medio del ensayo de cometas. En cultivos confluentes ninguna de las partículas fue capaz de inducir efectos citotóxicos. En cultivos en proliferación se encontró que las partículas del Norte son mas citotóxicas que las del Centro y Sur, después de tres días de exposición. Las partículas no fueron capaces de inducir alteraciones en el proceso de disyunción cromosómica, pero por otra parte, todas las partículas fueron capaces de inducir rompimientos en el material genético, siendo mas genotóxicas las partículas del Norte y Centro que las del Sur.

ABSTRACT

Particle air pollutants have been related with an increase in mortality and emergency room visit after days with high levels of these pollutants. México city presents high concentrations of particles and it is known that differences in composition exist in relation to the zone of the city where the particles were collected. There is a hypothesis that suggests that the effect of particles could be related with their composition. The objective of this study is to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of particles with an aerodynamic diameter less than 10 μm (PM10) collected in three different zones of Mexico city. PM10s were collected in the North, Center and South of Mexico city, and the presence of some elements and endotoxin was measured. Cytotoxic effects were evaluated on cultures of confluent (Balb c, RLF and 34Lu) cells and in proliferative cultures, at high (Balb c) and low (Balb c, RLF and SHE) cell density. Balb c cells were exposed under high density and sublethal concentrations conditions to PM10s. Alterations in chromosome disjunction and DNA breaks were evaluated by abnormal anaphase and comet assay, respectively. In confluent cultures no toxic effect was found under evaluated conditions. In proliferating cells particles from North present greater toxic effect than particles from the Central and Southern zones, after three days. PM10 do not induce chromosome disjunction alterations, but PM10 from the three zones induced DNA breaks. Northern and Central particles induced a greater genotoxic effect than Southern particles.

INTRODUCCION

La Ciudad de México (CM) es considerada como una de las mas grandes del mundo y también como una de las mas contaminadas. Esto se debe a las características climatológicas, geográficas y antropológicas que presenta esta ciudad.

La CM se localiza en una cuenca a una altura de 2,240 metros sobre el nivel del mar con una presión atmosférica de 540 mmHg. Se encuentra en una zona tropical y está rodeada por montañas. Los vientos predominantes se dirigen desde el norte hacia el sur y se encuentra edificada en lo que anteriormente era un lago. Esto último provocó que las regiones no urbanizadas presentaran durante muchos años, suelos secos que favorecían la presencia de tormentas de polvo o tolvánicas (1, 2, 3).

El área metropolitana de lo que se conoce como la CM está formada por 16 delegaciones políticas que forman el Distrito Federal (D.F.) y por 27 municipios que rodean al D.F., comprendiendo una superficie de 3,129 km² (1,499 km² corresponden al DF) (4) . En 1990 vivían en la CM 15,047,685 personas (5) según el censo de población de ese año. De estas personas, 8,235,744 vivían en el D.F. y 6,811,941 vivían en los municipios. Para 1997 la población en el DF se estimó en 8,483,000 personas (4).

Diariamente se transportan alrededor de 20.6 millones de personas, lo que requiere del uso de una gran cantidad de automóviles, camiones, microbuses, trolebuses y líneas del Metro. Se calcula que en la CM existen alrededor de 2.5 millones de autos particulares, 83,305 taxis, 25,697 microbuses y alrededor de unos 11,000 camiones (4). Todos estos medios de transporte utilizan gasolina, diesel o gas natural como combustible (6).

El gas licuado es uno de los principales combustibles que se utiliza en la CM, predominantemente en el ambiente doméstico, y del que diariamente se reportan entre 80 y 90 fugas de gas a la atmósfera (4). Blake y Rowland han sugerido que debido a la

composición del gas licuado que se utiliza en México, estas fugas podrían ser responsables de una proporción importante de la generación de ozono (O_3) en la CM (7).

En la CM se encuentran mas de 30,000 industrias, de las cuales alrededor de 250 manejan residuos peligrosos y 4,000 utilizan procesos de combustión o transformación y contribuyen importantemente al problema de la contaminación atmosférica (6).

Como se puede apreciar con los datos presentados anteriormente, el problema de la CM es muy grande, tan solo considerando los datos demográficos. En estos no se contemplan las horas de flujo vehicular, la frecuencia y velocidad de los vientos que dispersan los contaminantes, la frecuencia y duración de inversiones térmicas, las horas de insolación y muchos otros factores climáticos y humanos que afectan a la CM. Todos estos factores reunidos, son los que han hecho de la CM, una de las ciudades con problemas graves de contaminación atmosférica a nivel mundial.

- Contaminantes atmosféricos de la CM

Este es un punto que es necesario revisar para comprender la importancia que tiene la contaminación desde el punto de vista toxicológico. Primero que nada se conoce la presencia de los contaminantes que reciben el nombre de contaminantes criterio, ya que son los que se miden diariamente para determinar la calidad del aire. Dichos contaminantes criterio son: O_3 , óxidos de nitrógeno (NO_x), bióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), partículas suspendidas totales (PST), partículas con un tamaño aerodinámico menor de 10 micrómetros (PM_{10}) y plomo (Pb). Estos contaminantes no son los únicos que se encuentran en la atmósfera, pero son los que se utilizan para determinar la calidad del aire en las principales ciudades del mundo. En la CM estos contaminantes criterio son evaluados diariamente por la Red Automática de Monitoreo Ambiental (RAMA) que está bajo la supervisión del Gobierno del Distrito Federal. Los datos que se dan a

conocer a la población, y que definen la calidad del aire son aquellos que se colectan cada día (promedio de 24 horas) y en algunos casos, cada hora (máximo diario). Algunos de los contaminantes criterio son producto de las emisiones de diferentes tipos de fuentes, mientras que otros como el caso del O_3 son producto de reacciones fotoquímicas asociadas a diferentes contaminantes primarios (7).

De estos contaminantes criterio, el O_3 es aquel que sobrepasa la norma de calidad del aire con mayor frecuencia. Para tener una idea del problema asociado al O_3 , durante 1997, este contaminante se encontró en concentraciones por arriba de la norma (0.11 ppm durante una hora) en el 83% de los días de ese año (8). Debido a esto, los mayores esfuerzos han sido dirigidos al estudio de las causas de la presencia del O_3 y sus efectos, siendo dejados los demás contaminantes en un segundo plano.

Algo que vale la pena notar en el caso de los contaminantes criterio es que el O_3 , el CO, los NO_x , el Pb y el SO_2 solo varían en concentración en cualquier ciudad del mundo en la que se encuentren o sean emitidos, mientras que las PST y las PM_{10} no van a presentar una misma composición de una ciudad a otra, e incluso se pueden encontrar diferencias en la composición de las partículas de una región a otra dentro de una misma ciudad (9, 10, 11). Este último punto es de gran importancia ya que la norma de calidad del aire para PST y PM_{10} en todo el mundo y en particular en la CM es una norma gravimétrica, y no toma en cuenta la composición de dichas partículas.

Debido a la extensión de la CM, las fuentes de emisión que encontramos en diferentes zonas de la ciudad van a conferir propiedades especiales a las partículas. Por tal motivo, la ciudad puede ser dividida en tres grandes zonas, que son: zona norte, la cual presenta una cantidad importante de industrias como fuentes de emisión fijas, así como un movimiento vehicular importante; zona centro, la cual tiene como principal fuente de

emisión, a los automóviles y camiones; zona sur, en la cual se encuentran emisiones por vehículos, pero también es de gran importancia la presencia de componentes de origen biológico (pólenes, bacterias, esporas, etc.) (11, 12). Ya que las fuentes de emisión en las tres zonas son tan diferentes, se plantea la hipótesis de que tanto la composición, como los efectos de estas partículas en las personas expuestas, van a ser diferentes. Un factor importante a considerar en las diferencias presentes en las fuentes de emisión es el que las personas no van a estar expuestas a un solo tipo de partículas, ya que esto se va a encontrar afectado por la movilidad de las personas en la ciudad y su tiempo de permanencia en cada sitio.

Dentro del análisis de la composición de las partículas se han realizado estudios en los que se ha determinado la presencia de componentes de origen biológico como pueden ser proteínas, bacterias, hongos microscópicos, y endotoxinas (9, 10, 13, 14, 15, 16, 17). También se han medido la presencia de algunos elementos, como puede ser el caso de metales pesados y azufre entre otros (18, 19, 20, 21). En estos estudios se ha encontrado que existen variaciones en las concentraciones de diferentes componentes de las partículas dependiendo de la zona de la ciudad en la que fueron colectadas, e incluso en el caso de algunos microorganismos se encontraron variaciones horarias.

En algunos estudios no se ha analizado la composición o la fuente de los contaminantes atmosféricos, pero los autores, basados en los resultados obtenidos, infieren la presencia de diversos componentes en la fracción particulada. Dentro de estos estudios encontramos el de Villalobos y col. (12) en el cual se reporta que extractos orgánicos de partículas del centro de la ciudad tienen un potencial mutagénico mayor al encontrado en extractos de partículas del norte y estos mayor que los extractos del sur. Esto hace suponer a los autores que el contenido de hidrocarburos asociados a la

combustión de gasolinas y diesel es mayor en el centro. En otro estudio, Arenas y col (22) encuentra que en los últimos veinte años ha habido un incremento en el número de cuerpos ferruginosos (CF) en pulmones de autopsias de habitantes de la CM. Dicho incremento se asocia con una mayor concentración de partículas inorgánicas del tipo del asbesto. Por ultimo, Fortoul y col. (23) encontraron la presencia de diversos metales de transición en pulmón en casos de autopsias de habitantes de la CM. Estos autores encontraron un incremento en la cantidad de metales al comparar la concentración de metales en los pulmones de pacientes de los años 50 con pacientes de los años 80, por lo que proponen que esto se debe a un incremento de aquellos en la atmosfera. Si bien en estos estudios no se analiza la composición de las partículas o las fuentes que las generaron, nos permite suponer que ha habido cambios en los últimos años en la concentración de algunos posibles componentes de las partículas.

- Efectos biológicos de la contaminación atmosférica por partículas:

El estudio de los efectos del O₃ ha sido evaluado por diversos grupos, y existen diferentes modelos tanto experimentales como epidemiológicos, en los que se han estudiado los efectos de este contaminante (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30). Poco se conoce de las propiedades toxicológicas de las partículas suspendidas (31, 12), y la mayoría de los estudios realizados en este campo son de tipo epidemiológico (32, 33, 34, 35, 36).

Dentro de los estudios epidemiológicos en los cuales se ha evaluado el efecto que tienen las partículas, se ha podido establecer que cuando se presentan eventos de altas concentraciones de partículas, hay un incremento en las visitas a las salas de emergencia (25, 34), así como un incremento en la mortalidad (32, 36), aunque en este campo existe una gran controversia ya que estudios realizados en algunas de estas poblaciones han obtenido resultados contradictorios (37). También existen evidencias recientes que

sugieren que la contaminación atmosférica por partículas, posiblemente se encuentre relacionada con cáncer pulmonar (38, 39, 40, 41).

Poco se sabe de los efectos biológicos que tienen las partículas de la CM tanto *in vivo* como *in vitro*. Dentro de los estudios realizados en torno a los efectos biológicos se ha demostrado que las partículas de la CM no son capaces de inducir hemólisis en células expuestas *in vitro*, lo cual sugiere que este tipo de partículas presentan mecanismos de acción diferentes a los tradicionalmente demostrados para las partículas de origen mineral (42). Esto puede deberse a que la composición compleja de las partículas atmosféricas de una ciudad pueden estar enmascarando algunas de las características de los componentes minerales, como puede ser la presencia de compuestos con cargas que se adsorban en la superficie. Se ha demostrado que extractos no polares de las partículas son mutagénicos (12) y esto podría asociarse a un incremento en los casos de cáncer pulmonar (38). Estudios epidemiológicos han mostrado que la presencia de altas concentraciones de partículas se encuentran asociados a un incremento en la mortalidad en la CM (32, 33). Se sabe que la exposición a algunos tipos de partículas como el asbesto o el cuarzo representa un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis pulmonar, por lo que también se han realizado estudios para evaluar si las partículas de la CM son capaces de inducir la expresión de factores asociados a los mecanismos de fibrosis pulmonar, como es el caso del receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o la interleucina 1- β (IL-1 β) y se ha encontrado que las partículas de la CM son capaces de inducir la expresión de estas dos proteínas (43).

Si bien no hay muchos estudios en los que se demuestren de forma experimental o epidemiológica, los efectos que las partículas de la CM tienen sobre los habitantes, la

evidencia que se ha logrado acumular (12, 43, 32) sugiere de manera importante que los habitantes de esta ciudad se encuentran expuestos a partículas que inducen diferentes efectos biológicos.

- Métodos utilizados para explorar el efecto tóxico de partículas:

Dentro de los estudios de tipo experimental que se han realizado a nivel mundial para evaluar los efectos que tienen las partículas, podemos encontrar dos grandes grupos: a) estudios *in vivo* y b) estudios *in vitro*. Dentro de las evaluaciones *in vivo* existen diferentes tipos de estudios, que van desde la medición de biomarcadores presentes en sangre de voluntarios expuestos en cámaras en las que se conoce la concentración de las partículas en el aire, hasta la exposición de animales por inhalación o instilación (44, 45, 46, 47). Los estudios realizados *in vivo* por exposición a través de la vía inhalatoria presentan la ventaja de que la exposición se realiza bajo condiciones en las cuales las barreras y mecanismos de limpieza del tracto respiratorio se mantienen, pero tienen la desventaja de que se requieren de grandes cantidades de partículas, y no se conoce con precisión la cantidad de partículas que fueron inhaladas por el animal (46). Por otra parte, la exposición de los animales por instilación permite conocer con precisión la cantidad de partículas que entran al tracto respiratorio del animal, no se requiere de grandes cantidades de partículas, pero desafortunadamente este método requiere de suspender las partículas en un vehículo (generalmente una solución salina) y no se puede tomar en cuenta la participación de las barreras del tracto respiratorio (44, 45, 47, 48).

El método de exposición por instilación de los animales ha sido ampliamente utilizado para evaluar el efecto que tienen diferentes tipos de partículas en el tracto respiratorio (44, 45, 47, 48). Dentro de las partículas que han sido evaluadas por este método encontramos al cuarzo (Q), diferentes tipos de asbesto, minerales diversos de los

que se sospecha estén induciendo procesos inflamatorios, así como para evaluar los efectos de diferentes productos de combustión, como es el caso de las partículas que se colectan tras la combustión de aceites, diesel e incluso partículas de ciudades (44, 45, 46, 47, 48, 49). Estos estudios son de gran utilidad ya que se puede evaluar el fenómeno de la respuesta de un individuo a la exposición por partículas desde muy diversos puntos de vista. En un animal expuesto se puede analizar la presencia de diversos marcadores que nos permitan evaluar el proceso inflamatorio. Dentro de estos marcadores se pueden considerar a los de tipo bioquímico, como es el caso de la presencia de proteínas, albúmina o enzimas en un lavado bronquioalveolar (LBA), a los de tipo celular, como la cantidad de células presentes en el LBA, así como la cuenta diferencial que permite determinar los tipos celulares presentes, y los marcadores tisulares, que permiten evaluar la presencia de un proceso inflamatorio en cortes histológicos (44, 45, 46, 47, 48).

La evaluación toxicológica *in vitro* es de gran utilidad, ya que permite conocer efectos a diversos niveles, los cuales van desde la determinación de citotoxicidad, hasta la evaluación de daños a nivel molecular, así como la determinación de mecanismos de daño. Dentro de los diferentes estudios que pueden realizarse *in vitro*, cabe destacar la importancia de algunos de ellos como es el caso de la evaluación de la citotoxicidad (46), la inducción de la expresión de citocinas (31) y el daño al material genético (12, 50).

En los ensayos *in vitro*, la citotoxicidad inducida por una partícula puede ser medida:

- 1) por medio de un ensayo enzimático, en el cual se determina la cantidad de enzimas citoplásmicas que se liberan al medio (46), como es el caso de la lactato deshidrogenasa;
- 2) por medio de un ensayo metabólico, en el cual se evalúa alguna función (51), como el ensayo de MTT;
- 3) por medio de un ensayo de tinción celular, en el cual se fijan las células que se encuentran adheridas a la superficie de una caja y se tiñen con un colorante del

tipo del cristal violeta o el azul de metileno (52). Cada uno de los métodos presenta ventajas y desventajas. Las ventajas de los métodos enzimáticos es que son fáciles de realizar, y en un período corto de tiempo se puede estimar si un agente tóxico es capaz de provocar la muerte celular. Se pueden asociar a inducción de daños a nivel de membrana citoplásmica que provocan lisis celular (42, 46). La desventaja de este método en el caso de estudios con partículas, es que las partículas tienden a adsorber proteínas en su superficie, lo que provoca que se pueda subestimar el efecto de éstas. Los ensayos metabólicos tienen la ventaja de que las partículas no secuestran a las enzimas involucradas en dicho proceso y también se obtienen resultados en períodos de tiempo cortos, pero presentan la desventaja de que muchos agentes tóxicos inducen un estrés metabólico, por lo que se puede subestimar o sobrestimar el efecto de un agente tóxico. Por último los ensayos en los que se evalúa la presencia de células adheridas a la superficie de la caja de cultivo tienen la ventaja de que se evalúa el número de células. Desafortunadamente este método no permite discriminar si las células adheridas se encuentran vivas o en proceso de muerte celular. Por otra parte, tanto los ensayos metabólicos como la cuantificación de células adheridas no permiten conocer si la disminución en el número de células en cultivos en proliferación, se debe a que se ha inducido la muerte celular, o a un efecto citostático del agente tóxico que se desea evaluar.

Para evaluar la inducción de la expresión de citocinas, los modelos *in vitro* han sido ampliamente utilizados en el estudio de los efectos tóxicos de diferentes tipos de partículas. Este tipo de estudios se ha realizado principalmente con partículas inorgánicas, como es el caso del Q, los asbestos, etc., y recientemente se han empezado a utilizar en la evaluación de partículas asociadas a procesos de combustión y a partículas provenientes de ciudades (31). Este tipo de estudios permiten evaluar el tipo de citocinas que se expresan por la

exposición a una partícula en diferentes estirpes celulares, así como la secuencia en la cual se expresan. Esto permite proponer diferentes mecanismos que pudieran explicar la capacidad proinflamatoria de algunas partículas. Evidentemente este tipo de análisis puede realizarse a diversos niveles que van desde la detección de la citocina (31, 43), la evaluación del RNA mensajero (43) e incluso la utilización de inhibidores de componentes específicos de las partículas (43, 53) como la polimixina B en el caso de la endotoxina.

La determinación *in vitro* de la inducción de daño al material genético es de gran ayuda, ya que por medio de ensayos sencillos podemos determinar si las partículas que se desean evaluar son capaces de alterar el material genético de una célula, ya sea en calidad o en cantidad. Dentro de los ensayos para determinar daño al material genético por partículas, tradicionalmente han sido utilizados modelos en los que se evalúa la capacidad para inducir alteraciones cromosómicas, ya sea de tipo estructural o numérico (50), así como evaluar si se producen alteraciones en el proceso de disyunción cromosómica (54, 55). En el caso de partículas que presentan composiciones complejas y especialmente aquellas que presentan una fracción que puede ser solubilizada, se han utilizado los ensayos de Ames para determinar la capacidad mutagénica (12).

Recientemente ha ganado popularidad una técnica para determinar daño al material genético que es la técnica de electroforesis celular o ensayo de cometas (28, 29, 30, 56, 57). Este tipo de estudios permite evaluar rápidamente si es posible inducir alteraciones en el DNA de células de mamífero al someter a electroforesis a una célula que ha sido inmovilizada en un gel de agarosa y posteriormente digerida. Cuando el DNA ha sufrido algún daño, los fragmentos de DNA son capaces de migrar y por lo tanto, al momento de teñir el DNA se puede observar una imagen que recuerda a un cometa, ya que se ve una tinción abundante en donde se encuentra el núcleo, y un barrido de DNA que semeja a la

cola del cometa. Este ensayo es fácil de realizar y nos permite comparar el efecto que pueden tener diferentes agentes tóxicos *in vivo* e *in vitro*. Los ensayos *in vitro* han servido para evaluar daño inducido por luz UV (58) o por sales y fármacos (59, 60), mientras que *in vivo* ha sido utilizado para evaluar daño en DNA de células de alguna persona expuesta a contaminantes (28, 29, 30).

Otro ensayo que ha sido utilizado en la evaluación genotóxica de las partículas es el de inducción de anafases anormales (54, 55). Este tipo de estudios se han realizado para tratar de determinar por que algunas partículas inorgánicas son capaces de inducir aneuploidías. Se ha encontrado que aquellas partículas que inducen cambios en la ploidía, son capaces de inducir alteraciones en la disyunción cromosómica e incluso ha sido posible relacionar el tipo de alteración en la disyunción con la presencia de hiper o hipo-diploidías (50, 55).

El estudio de las partículas contaminantes atmosféricas requiere de un esfuerzo multidisciplinario. Esto se puede deducir fácilmente después de revisar algunos de los principales factores relacionados con este problema.

El análisis de la composición absoluta de las partículas es un área de trabajo en la cual sería necesario realizar un trabajo de química analítica y de aerobiología sumamente complejo. Sería también necesario realizar un análisis elemental de las partículas para detectar los elementos que se encuentran en éstas, así como una especiación de dichos elementos y una identificación de los compuestos presentes, tanto orgánicos como inorgánicos. Sería necesario el análisis de cada uno de los hidrocarburos presentes en la mezcla y por supuesto la presencia de sustancias de origen biogénico como las proteínas y las endotoxinas. A esto hay que añadir el análisis y caracterización de las partículas biológicas, tales como bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, algas, esporas o

pólenes que pueden encontrarse en la atmósfera. Como se puede ver, el análisis de la composición requiere de la interacción de diferentes grupos de trabajo, especializados en diferentes áreas. Debido a esto, en el presente trabajo no se buscó realizar un análisis exhaustivo de las partículas, y se recurrió al análisis cuantitativo de algunos componentes representativos como son algunos metales de transición, las endotoxinas y la presencia de azufre y sulfatos, como un indicador de que existen diferencias en la composición de las PM10 de tres zonas de la CM.

El mismo grado de complejidad encontramos al querer evaluar toxicológicamente a las partículas. Existen muchas estrategias y modelos *in vivo* e *in vitro*, cada una de ellas diseñada para obtener una respuesta específica, por lo que el análisis se torna sumamente complicado. Debido a esto se escogieron algunas de las técnicas que permitan obtener información clara acerca de cuales son los efectos que estas partículas producen. Las estrategias escogidas fueron: la exposición de animales de laboratorio por instilación para evaluar efectos inflamatorios, efecto citotóxico en cultivos celulares y daño al material genético por medio del ensayo de anafases anormales y el ensayo de cometas. Los animales de laboratorio utilizados para los ensayos de instilación presentaron niveles elevados de los marcadores de inflamación, incluso en aquellos animales que no fueron expuestos a partículas, por lo que se decidió comparar la calidad de dos bioterios, uno con ventilación pasiva y el otro con aire filtrado. Los resultados de los animales expuestos por instilación y de la comparación de dos diferentes bioterios se muestran en el apéndice.

HIPÓTESIS

La composición de las partículas de la CM dependerá de la zona en la que estas sean colectadas.

Las partículas de la CM son citotóxicas y genotóxicas a concentraciones entre 2.5 y 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

La citotoxicidad y genotoxicidad de las aeropartículas de la CM se encuentra relacionada con la zona en la que son recolectadas dichas partículas.

OBJETIVOS

1) Determinar la presencia de algunos elementos y endotoxinas en partículas PM10 y ver si existe alguna diferencia en la composición dependiendo de la zona de la ciudad de la que provengan las partículas.

2) Obtener cultivos primarios de células de embrión de hámster Sirio y de pulmón de rata, para realizar ensayos de citotoxicidad.

3) Evaluar la citotoxicidad de las partículas de la CM en diferentes líneas celulares.

4) Determinar la capacidad de las partículas de la CM para inducir alteraciones anafásicas en células en cultivo.

5) Determinar la capacidad de las partículas de la CM para producir rompimientos en el material genético por medio del ensayo de cometas.

Material y Métodos

A) Obtención de las partículas:

- Obtención de las partículas:

Se colectaron partículas menores de $10\ \mu\text{m}$ (PM10) durante 1991 con un colector PM10 de grandes volúmenes (Sierra Andersen/GMW Model 1200 VFC HVPM10 sampler). Las muestras fueron colectadas a un flujo de $1.13\ \text{m}^3/\text{min}$ usando un módulo de control G313, en un filtro de fibra de vidrio. El muestreo se realizó en tres diferentes zonas de la CM, utilizando como criterio de selección la diferencia existente en el grado de urbanización. Las muestras fueron colectadas en el norte en la zona de Xalostoc (zona industrial), en el centro en la Merced (zona comercial) y en el sur en la Ciudad Universitaria (zona residencial). Se tomó un filtro al azar, de un día de cada semana del año de 1991 para recuperar las partículas. Los filtros fueron sometidos a ultrasonido en seco (Bath Sonicator 5200, Branson Ultrasonic, Co., USA) durante 60 minutos en un vaso de precipitados previamente horneado a 200°C durante 4 horas. El filtro se sometió a un "barrido" con un pincel suave y las partículas fueron guardadas en un vial de vidrio previamente horneado. Las muestras de todo el año fueron mezcladas y guardadas en un desecador a 4°C , hasta el momento de su uso.

B) Determinación de la presencia de elementos y endotoxinas

- Determinación de elementos en las partículas:

El análisis de elementos presentes en las partículas fue realizado en extractos acuosos (hidrosolubles) e hidrolizados con HCl 1 M (totales). El análisis se realizó por medio del método de detección de emisión de plasma (Plasma 40, Perkin Elmer, Norwalk CT), en el cual se detecta el espectro de emisión de los elementos presentes en la muestra comparando con los espectros de emisión de estándares puros. El instrumento fue

calibrado utilizando una curva de cinco puntos de elementos estándar puros (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI). Los elementos evaluados fueron: Fe, Ni, V, Zn, Pb, Cu y S. Dicho análisis fue realizado por la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos (48).

- Determinación de los niveles de endotoxina presente en las partículas:

La determinación de endotoxina total fue realizada por medio del ensayo de lisado de Limulus ameobocyte siguiendo las especificaciones del fabricante (Bio Whittaker, Inc., Walkersville, MD). La lectura se realizó en un lector de placa QCL acoplado a una computadora personal. Para esto se tomó 1 mg de partículas de cada una de las diferentes zonas y se resuspendieron en un amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M y trietilenamina al 0.01%, pH 7.5 y se sonicaron durante 60 minutos a 20°C (Bath Sonicator 5200, Branson Ultrasonic, Co., USA) para extraer las endotoxinas. El método de Limulus ameobocyte utilizado es cinético y colorimétrico, por lo que la concentración de endotoxinas presentes es directamente proporcional a la intensidad de color generada durante la reacción entre la endotoxina y el lisado de Limulus.

C) Ensayos *In vitro*

Se trabajó con las líneas celulares Balb c, 34 Lu (ATCC) y con los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de rata y con células de embrión de hámster sirio (SHE).

- Obtención de los cultivos primarios:

1) Fibroblastos de pulmón de rata (RLF):

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 8 a 10 semanas. Se inyectó una sobredosis de nembutal intra peritoneal. Mientras el animal presentaba función cardio-respiratoria, se introdujo una cánula intra traqueal y se abrió el tórax. El ventrículo derecho se puncionó para introducir amortiguador de fosfatos (PBS) y la aorta abdominal se seccionó. La

perfusión de los pulmones se realizó en 5 ocasiones. Los pulmones se removieron del animal y se colocaron en una caja de Petri estéril, con PBS y antibióticos (penicilina 100 $\mu\text{g/mL}$; estreptomycin 150 $\mu\text{g/mL}$; fungizona 750 ng/mL). Se eliminaron las vías aéreas y los principales vasos y posteriormente se lavaron los pulmones con PBS. Los pulmones se cortaron en pedazos pequeños (1-2 mm). Los fragmentos fueron transferidos a un tubo de 50 mL y se centrifugaron por 5 minutos a 100 X g (Beckman GPR). Se recolectaron los fragmentos flotantes y se les agregó un medio de digestión previamente calentado (DMEM, collagenasa 1 mg/mL, tripsina 2.5 mg/mL y DNase 1 mg/mL). Se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos con agitación suave. Este proceso se repitió 2 veces más y los sobrenadantes fueron colectados en tubos de 50 mL. Los sobrenadantes se pasaron por una gaza para eliminar los fragmentos gruesos y lo recobrado se centrifugó a 500 X g para recuperar las células. El paquete celular fue resuspendido en 50 mL de DMEM adicionado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) y antibióticos y fueron sembradas en cajas de 75 cm^2 a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 -aire. Al alcanzar la confluencia las células fueron cosechadas y congeladas en nitrógeno líquido en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Para realizar los experimentos con estas células, se procedió a descongelar y siempre se trabajó con cultivos terciarios.

2) Células SHE (61):

Hembras de hámster Sirio fueron sacrificadas después de 12-14 días de gestación por medio de una sobredosis de nembutal. Se removió el útero y se colocó en 50 mL de PBS y antibióticos, en una caja de Petri. Los embriones fueron removidos y se trasladaron a otra caja de Petri con PBS tibio. Después de lavar dos veces los embriones, estos fueron transferidos nuevamente a una caja de Petri limpia y fueron cortados en pequeños pedazos. Después de esto, los trozos fueron suspendidos en PBS y se trasladaron a un

vaso de precipitados estéril y se sometió a agitación para remover la presencia de eritrocitos. Se dejó sedimentar por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se agregó PBS adicionado con tripsina (0.05%) y se dejó a 37°C por 20 minutos. El sobrenadante fue eliminado. Se adicionó nuevamente PBS-antibióticos-tripsina y se dejó actuar a la enzima por 10 minutos a 37°C. Se decantó el sobrenadante y la tripsina se inactivó con SFB. Este procedimiento se repitió 3 veces. Los sobrenadantes recolectados se centrifugaron a 500 X g por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10 mL de medio DMEM adicionado con 10% de SFB y antibióticos y se sembraron en cajas de 75 cm² a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂-aire. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron cosechadas y congeladas en nitrógeno líquido en presencia de 10% de DMSO. Para realizar los experimentos con estas células, se procedió a descongelar y siempre se trabajó con cultivos terciarios.

- Preparación de las partículas para los ensayos *in vitro* :

Las partículas fueron esterilizadas por autoclave inmediatamente antes de cada experimento. Se agregó medio suficiente para tener una suspensión concentrada de partículas, la cual se sometió a ultrasonido durante 20 minutos para disgregar las partículas. Antes de agregar las partículas a las células se hicieron diluciones con medio de cultivo hasta alcanzar las concentraciones requeridas.

- Determinación de la citotoxicidad y genotoxicidad de las partículas:

1) Ensayos de viabilidad:

Se evaluó la citotoxicidad bajo tres diferentes condiciones. El primer tipo de experimentos se realizó una curva concentración-respuesta en células confluentes en ausencia de factores de crecimiento y solamente se evaluó citotoxicidad a las 24 horas; en el segundo tipo de experimentos se realizó una curva dosis-respuesta con células en

proliferación de la cual se realizaron evaluaciones de citotoxicidad cada 24 horas durante 7 días. Por último se realizaron experimentos de citotoxicidad en cultivos expuestos durante siete días en condiciones de baja densidad celular. El método en cuestión para cada tipo de experimento se describe a continuación.

a) Evaluación citotóxica en células confluentes.

Se sembraron las células en cajas de 96 pozos a una densidad de 5,000 células por pozo en presencia de medio DMEM adicionado con 10 % de suero, penicilina (33 $\mu\text{g/mL}$), estreptomycin (50 $\mu\text{g/mL}$) y fungizona (250 ng/mL) a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 -aire. Se dejaron las células hasta alcanzar 100% de confluencia y entonces se cambió el medio de cultivo y se agregó medio libre de suero. Veinticuatro horas después de eliminar el suero, las células fueron expuestas por 24 horas a concentraciones de 0, 20, 40, 80, 160 y 320 $\mu\text{g/cm}^2$ de partículas de la CM. Al término de este tiempo se determinó la viabilidad por medio del método de cristal violeta (CV) (52). Para tal efecto, las células fueron lavadas con una solución amortiguadora de fosfatos con calcio y magnesio (PBS) y posteriormente fueron fijadas por 24 horas con formol neutro. Después de este tiempo se lavaron las células con PBS y se adicionó una solución de CV al 0.1 % por 20 minutos. El CV fue eliminado y las cajas fueron lavadas con PBS y posteriormente el CV unido a las células presentes en el pozo fue solubilizado con ácido acético al 33 %. Se determinó la densidad óptica en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm (LabSystem Multiscan, MCC/340). Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células expuestas a partículas en comparación a las células que no fueron expuestas.

b) Evaluación de citotoxicidad de las partículas en células proliferando durante un curso temporal de siete días.

Las células fueron sembradas a una densidad de 5,000 células por pozo, en cajas de 96 pozos. Las células se dejaron adherir por 24 horas en presencia de medio DMEM adicionado con 1% de suero a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂-aire, y transcurrido este tiempo se adicionaron las partículas en concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y se agregó suero a una concentración final de 10 % v/v. Cada 24 horas se determinó la viabilidad de las células por medio del método de CV.

c) Evaluación de citotoxicidad en células expuestas por siete días a partículas en condiciones de baja densidad celular (62):

Para evaluar el papel que juega la relación entre número de células y la concentración de partículas se decidió determinar el efecto citotóxico de las partículas en cultivos con una baja densidad celular. Para esto las células fueron sembradas a una densidad de 150 células por pozo, en cajas de 96 pozos. Las células se dejaron adherir por 24 horas en presencia de medio DMEM adicionado con 1% de suero a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂-aire, y transcurrido este tiempo se adicionaron las partículas en concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y se agregó suero a una concentración final de 10 % v/v. Se determinó la viabilidad de las células por medio del método de CV después de siete días de exposición.

Las curvas obtenidas de la evaluación de citotoxicidad para células en proliferación, tanto a alta como a baja densidad, fueron ajustadas por medio de regresión lineal para calcular la CL-50. Se realizó un análisis de ANOVA para las CL-50 y se tomó a un valor de $p < 0.05$ como presencia de significancia estadística.

2) Inducción de anafases anormales (54, 55):

Las células se sembraron en una caja de cultivo de 150 cm² con medio DMEM (10 % de SFB; 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina) (medio completo). Las células se

dejaron llegar a confluencia y se cosecharon utilizando tripsina a una concentración de 0.05 % en PBS-EDTA 10 mM. Posteriormente se sembraron las células en cajas Slide Flask (NUNC) de 7.5 cm² a una densidad de 100,000 células por caja con medio completo. Se dejaron adherir y crecer las células por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂-aire, antes de proceder con la exposición a partículas.

Después de las 24 horas se retiró el medio y se agregó medio con SFB al 1 % para disminuir la velocidad de crecimiento de las células y se dejó en este medio durante 36 horas. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el medio y se agregó medio completo con 0.32 mM de hidroxurea para detener a las células en la fase G1 del ciclo celular. Se agregaron las partículas en las siguientes concentraciones por cada caja:

- PM10 N, C y S: 20, 40 y 80 µg/cm².
- Asbesto crisótilo (AC): 20, 40 y 80 µg / cm², y
- Un control, el cual no fue expuesto a partículas.

Transcurridas 12 horas, se eliminó el medio y se agregó medio completo. Se dejó que progresaran en el ciclo celular por 7 horas y se fijaron con metanol-ácido acético (3:1) (4 mM de cloruro de magnesio y 1.5 mM de cloruro de calcio), dos veces durante 15 minutos.

Se dejaron secar las cajas durante toda la noche y se les agregó ácido perclórico al 5%, dejándolas a 4°C por 24 horas. Se lavaron y se tiñeron con Safranina-O al 0.5 % por 24 horas.

Las laminillas fueron codificadas para ocultar (cegar) la identificación del tipo de partículas a las que se expusieron las células y se evaluaron al microscopio 100 anafases al azar. Cada laminilla fue evaluada y verificada por un observador diferente. Se registraron en base a los criterios propuestos por Hesterberg y Barret (54) las siguientes

anormalidades: anafases multipolares, cromosomas en retraso y puentes cromosómicos. El experimento fue realizado en 3 ocasiones y se muestran los resultados de las 300 anafases analizadas en total.

-Análisis estadístico:

Los resultados fueron agrupados como proporción de alteraciones anafásicas, y se analizaron por medio de la prueba de χ^2 .

3) Detección de daño genético por el método de electroforesis celular en geles de agarosa (ensayo de cometas):

Se determinó la capacidad de las PM10 para producir rompimientos en el material genético por medio del ensayo de cometas, siguiendo el método descrito por Singh y col (63).

Se sembraron 20,000 células por pozo en cajas de 24 pozos. Las células fueron expuestas a concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM10 de cada una de las zonas siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para el manejo de partículas. Después de 72 horas de exposición, las células fueron cosechadas y se determinó la viabilidad por exclusión de azul tripano. Las células fueron centrifugadas y lavadas en 2 ocasiones con solución salina de fosfatos. Las células se resuspendieron en 1 mL de solución amortiguadora de Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.4 (amortiguador de corrida) y se tomó una alícuota con 10,000 células. Dichas células fueron mezcladas con una solución de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración final de 1%. Las células fueron depositadas en una capa de agarosa previamente solidificada. Se dejó solidificar la mezcla de agarosa-células a 4°C. La muestra fue digerida (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2 M, Tritón X 100 1%, pH 10) por 30 minutos y después se lavó en una solución de

NaCl 100 mM, EDTA 1mM. Se sometió a una electroforesis durante 30 minutos a 50 volts. La muestra fue lavada en amortiguador de corrida frío durante 5 minutos y posteriormente se agregó bromuro de etidio ($10 \mu\text{g/mL}$), se colocó un cubreobjetos y se analizaron 30 cometas al azar por laminilla. A cada cometa se le determinó el área y la longitud. Se realizó una correlación entre longitud y área para determinar cual de las dos mediciones utilizar como parámetro de daño al material genético.

-Análisis estadístico:

Los datos se organizaron por mediana y rangos y se determinaron los siguientes parámetros: 1) Longitud de los cometas por arriba del percentil 75 del control; 2) Proporción de cometas con una longitud por arriba del percentil 75 del control (análisis de χ^2) y 3) Proporción de la longitud de los cometas por arriba del punto de corte, agrupados en rangos en los que se incrementa la longitud en $20 \mu\text{m}$.

Resultados

Composición de las partículas:

- Presencia de metales de transición en las partículas:

Se encontraron diferentes cantidades de metales de transición en las muestras evaluadas, dependiendo de la zona de la que provenían las partículas presentando un gradiente de concentración que va del *N* al *S*. En la zona *N* se encontraron 12.5 μg de metales por cada mg de polvo, mientras que en el *C* se encontraron 6.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de polvo y en el *S* 5.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de polvo. Al evaluar la cantidad total de metales de transición se encontró que en el *C* y en el *S* el componente principal es el hierro seguido por el plomo, mientras que en el *N* el zinc es el que ocupa el primer lugar, seguido por el hierro y el plomo (Figura 1). Tanto el vanadio como el níquel se encuentran en pequeñas cantidades en todas las muestras (menos de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$) sin embargo existe un gradiente en la cantidad de vanadio que va de una mayor cantidad en el *N* seguido por el *C*, para encontrar una menor cantidad en el *S* (Figura 1). Al medir únicamente la fracción hidrosoluble se encuentra que el principal componente de este tipo en todos los casos es el zinc, presentando cantidades muy pequeñas de los demás metales (Figura 2). Las cantidades de vanadio siguen el gradiente encontrado al medir el contenido total de metales (Figura 3).

Al evaluar la presencia de S y SO_4 presentes en las partículas se encontró que estos componentes presentan un gradiente de concentración similar al observado para los metales, encontrando una mayor cantidad de S y SO_4 en el *N*, seguido por el *C* y en menor cantidad en el *S* de la ciudad (Figura 4). Este gradiente en la concentración de S y SO_4 sugiere que en el *N* de la ciudad se presenta una mayor actividad combustión de combustibles fósiles.

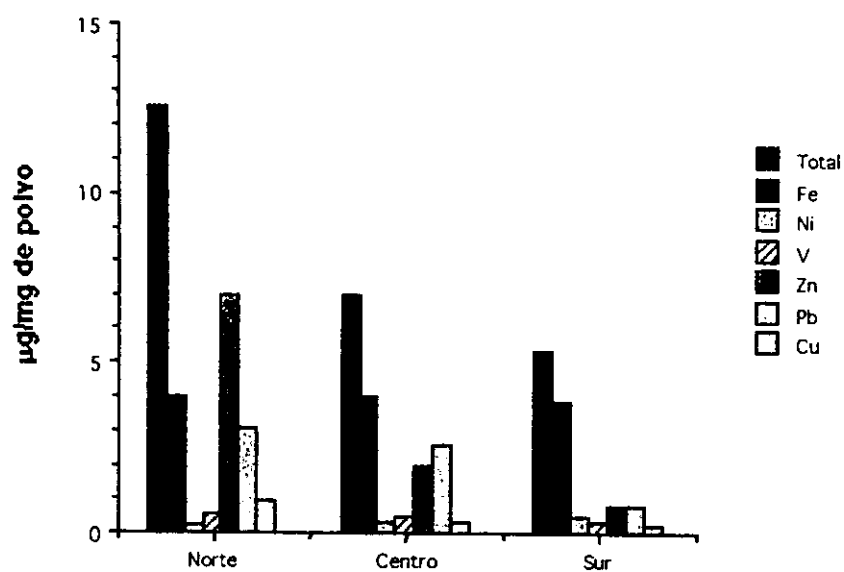


Figura 1. Concentración de metales en muestras de PM10 de la Ciudad de México utilizando la técnica de espectroscopía emisión de plasma

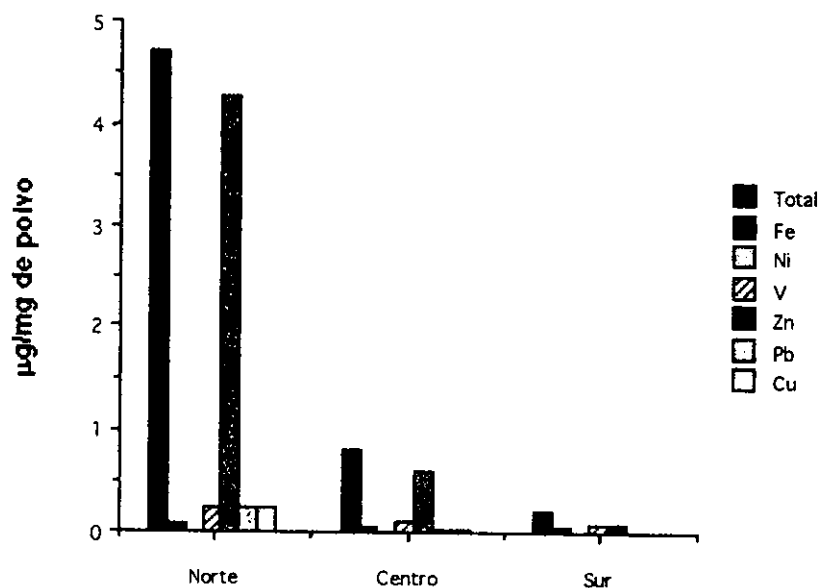


Figura 2. Determinación de metales solubles en muestras de PM10 de la Ciudad de México utilizando la técnica de espectroscopía de de plasma

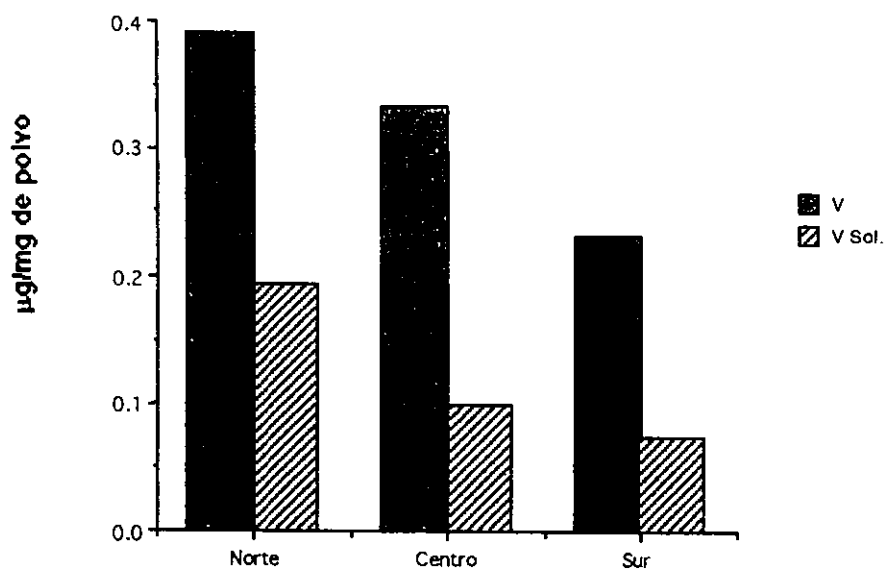


Figura 3. Concentraciones de vanadio total y vanadio soluble presentes en muestras de PM_{10} de la Ciudad de México

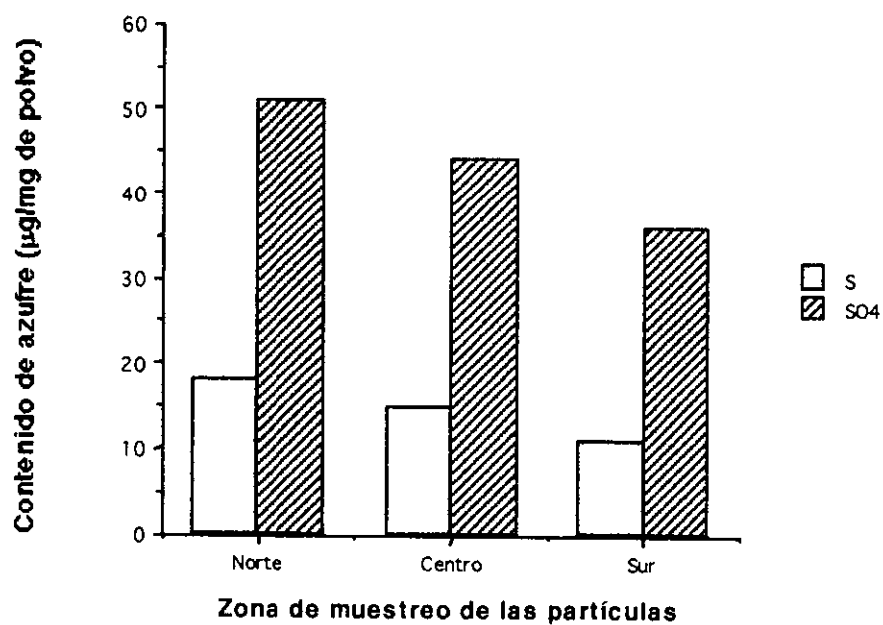


Figura 4: Contenido de azufre en partículas PM_{10} de tres diferentes zonas de la Ciudad de México

- Presencia de endotoxina en las partículas:

Se encontró que existen diferencias en los niveles de endotoxina en la partículas, ya que las partículas del *N* presentaron 15.3 ng/mg de polvo, mientras que en el *S* se midieron 5.3 ng/mg de polvo y en el *C* se encontraron 4.1 ng/mg de polvo (Cuadro 1).

Cuadro 1) Concentración de endotoxinas presentes en la partículas de la ciudad de México.

PM10	[ng/mg]
Norte	15.3
Centro	5.3
Sur	4.1

Evaluación toxicológica in vitro:

- Potencial citotóxico de las partículas:

+ Citotoxicidad en células confluentes:

Se determinó la citotoxicidad en células confluentes en las líneas celulares Balb c, RLF, y 34 Lu. En estas condiciones se encontró que las células son muy resistentes al efecto citotóxico de las partículas, independientemente del tipo de partícula de la que se trate. En el caso de todas las líneas celulares se puede ver que conforme se incrementa la concentración de partículas se observa un incremento en la absorvancia, lo cual se expresa como un incremento en la viabilidad (Figura 5). A pesar de que el comportamiento es similar se encontró que en el caso de las células 34Lu el incremento en la absorvancia fue mayor que para las células Balb c y RLF.

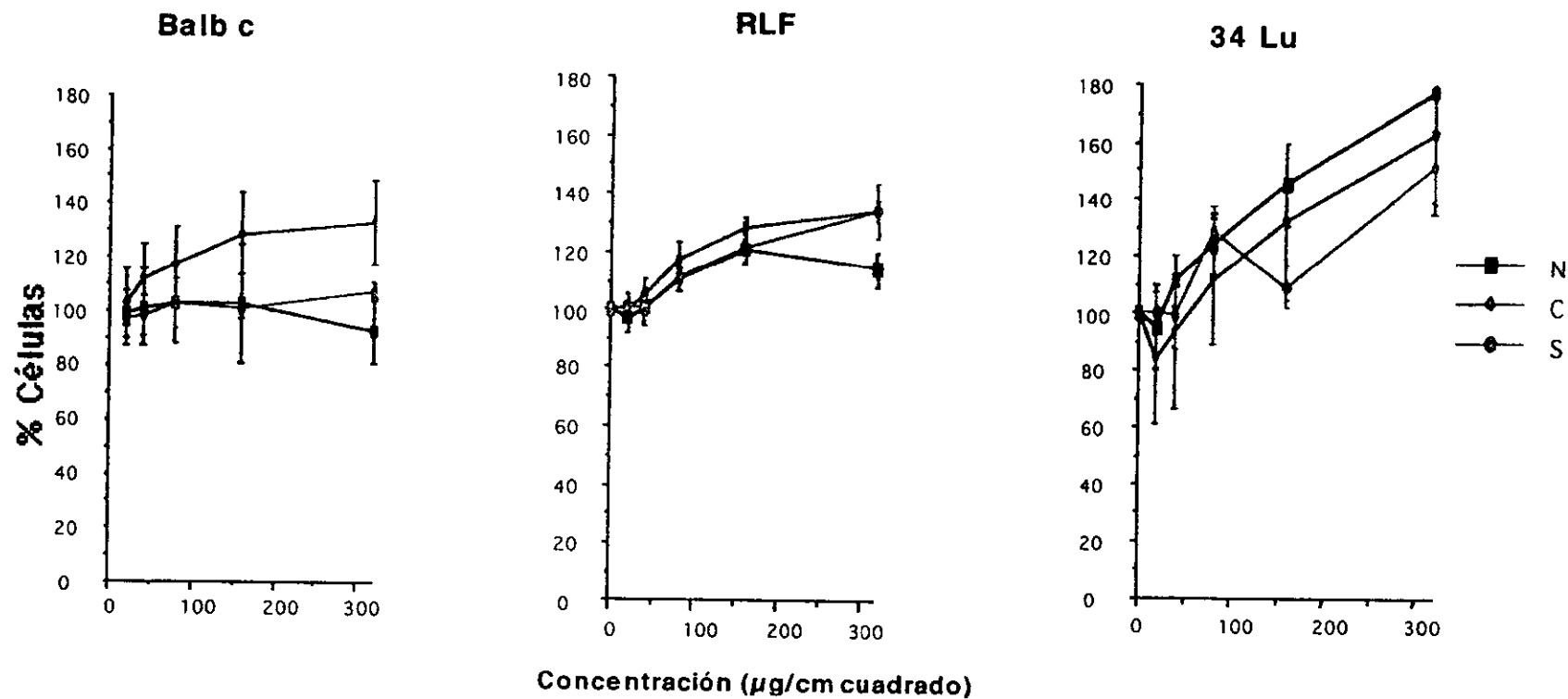


Figura 5: Curva concentración-respuesta de células Balb c, RLF y 34Lu expuestas por 24 horas a partículas del Norte, Centro y Sur de la Ciudad de México. (Células confluentes)

+ Citotoxicidad evaluada en un curso temporal:

Al evaluar la citotoxicidad de las partículas en células Balb c en proliferación se encontró que la viabilidad disminuye y tres días después de la exposición hay una CL-50 de $160 \pm 32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las partículas del N, mientras que a este mismo tiempo la CL-50 para el C y S es de 276 ± 42.4 y $292 \pm 22.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente (Figura 6) siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre el N contra C y S (ANOVA $p < 0.05$). A los 7 días la CL- 50 del N baja a $99 \pm 4.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las partículas del N, mientras que las del C y S alcanzan su viabilidad mas baja en este día con una CL-50 de 138 ± 3.8 y $139 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente (Figura 6).

+ Citotoxicidad en células en proliferación a baja densidad celular:

Al determinar la citotoxicidad en células en crecimiento no se encontraron diferencias en los niveles de citotoxicidad en las diferentes líneas celulares estudiadas. En el caso de las células Balb-c la CL-50 fue de 30 ± 1.25 y $32 \pm 0.80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las partículas del C y S respectivamente, mientras que el la CL-50 de las partículas del N se encontró a $36 \pm 3.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En el caso de las células RLF, la CL-50 fue de $27 \pm \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las partículas del N, de $31 \pm 0.89 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las partículas del C y $22 \pm 3.43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las partículas del S (Figura 7). Las células SHE resultaron ser mucho mas sensibles pero no fue posible calcular la CL-50 ya que no se pudo ajustar la curva.

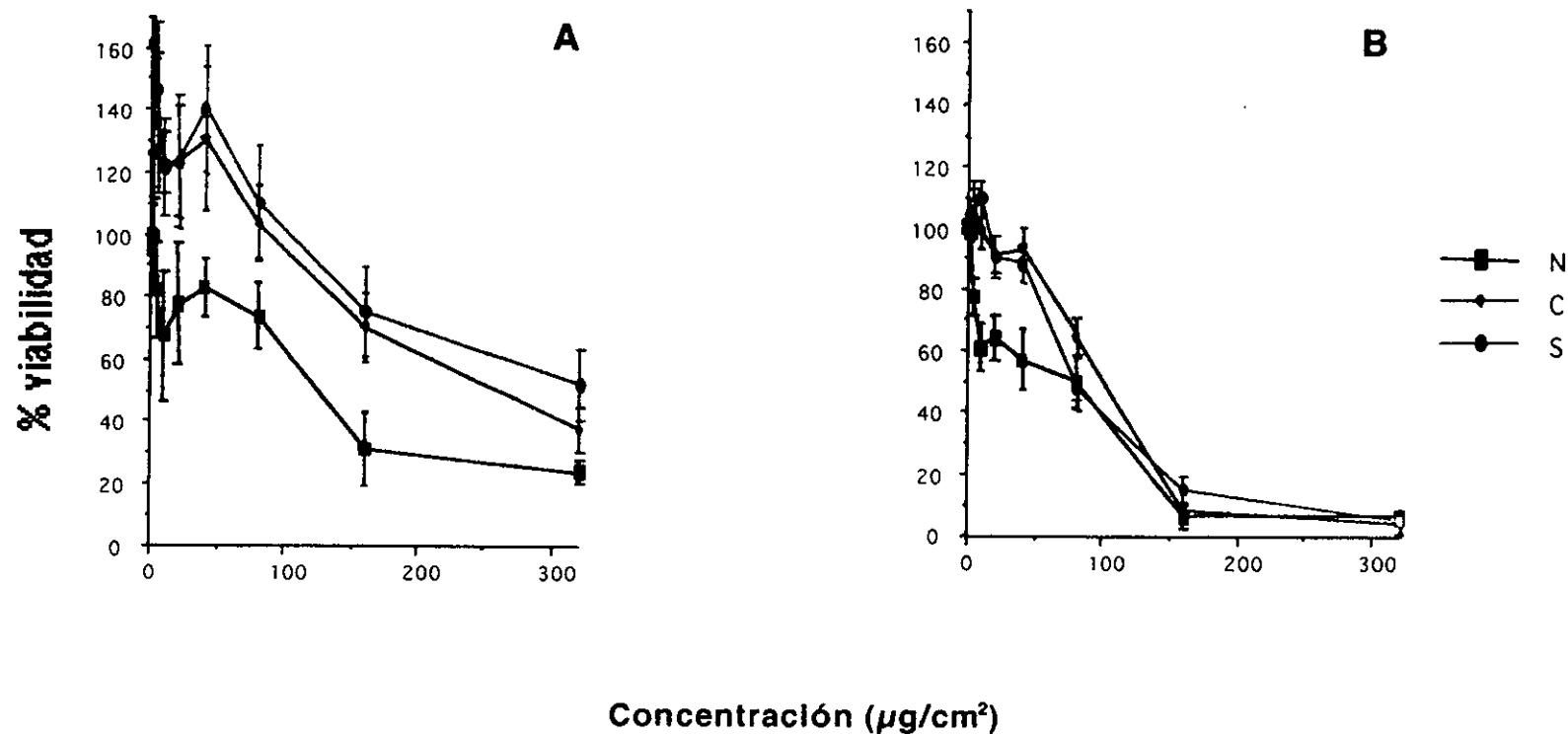


Figura 6: Curva concentración-respuesta de células Balb c expuestas a partículas del Norte, Centro y Sur de la Ciudad de México. Resultados después de 3 (A) y 7 (B) días de exposición. Las ecuaciones para la regresión lineal de cada una de las curvas son las siguientes: A) N ($y = 87.796 - 0.22925x$); C ($y = 126.83 - 0.28926x$); S ($y = 134.98 - 0.27993x$). B) N ($y = 77.110 - 0.27450x$); C ($y = 98.953 - 0.35228x$); S ($y = 99.069 - 0.35235x$). (Células en proliferación)

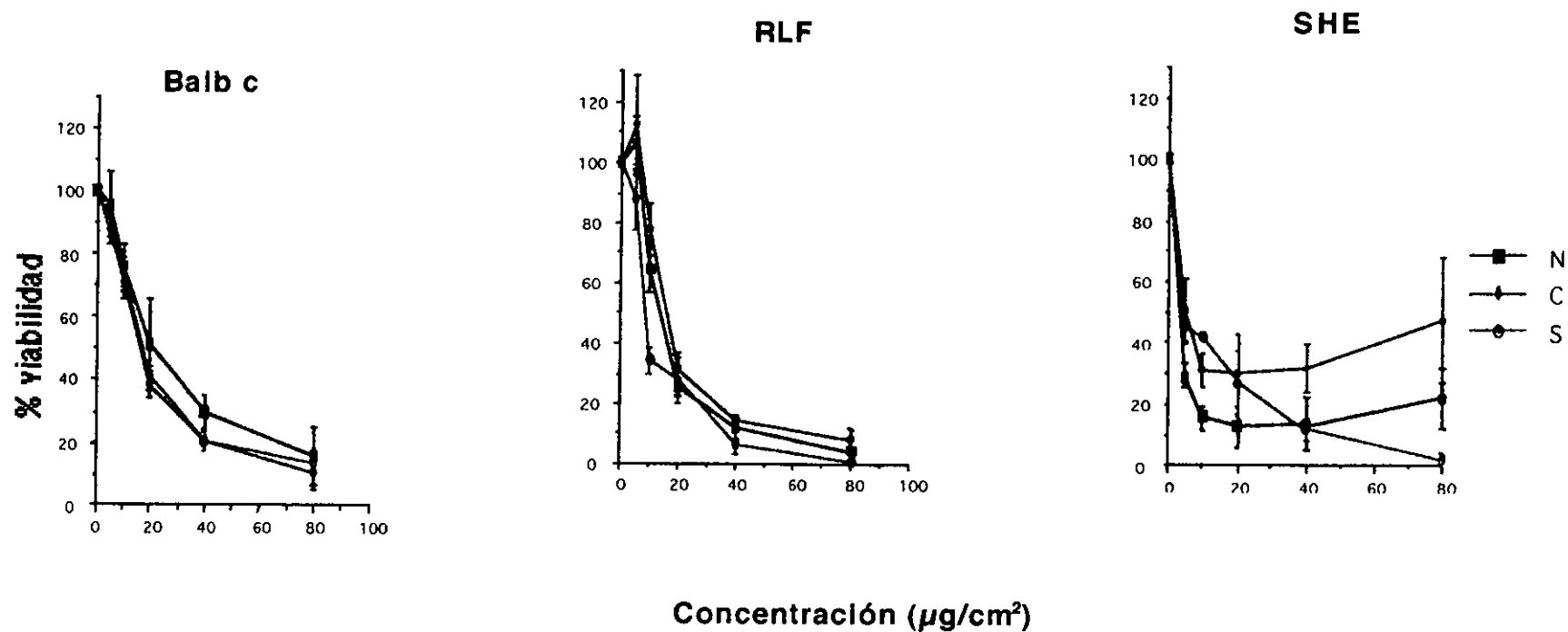


Figura 7: Curvas concentración-respuesta de células Balb c, RLF y SHE expuestas durante siete días a partículas del Norte, Centro y Sur de la Ciudad de México. (Células proliferando a baja densidad)

- Anafases anormales:

Las partículas de la CM no fueron capaces de inducir anafases anormales. En los ensayos evaluados se encontró que a todas las concentraciones utilizadas, las células expuestas a partículas de la CM no presentaron un mayor número de anafases anormales que lo encontrado en el cultivo sin exponer a partículas (Cuadro 2). El AC fue capaz de incrementar la proporción de anafases anormales a las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, pero a la concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no muestra diferencia con el control, debido a que a esta concentración el número celular se ve disminuido probablemente debido al efecto citotóxico del asbesto.

Cuadro 2) Proporción de anafases anormales en cultivos de células expuestas a partículas de la ciudad de México o Asbesto Crisótilo. El cultivo testigo no fue expuesto a partículas.

Porcentaje			
PM10	20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
N	1	0	2
C	4	2	2
S	2	0	1
AC	14	13	4
Testigo	2	2	2

- Inducción de cometas por partículas PM 10:

Las células obtenidas para el ensayo de cometas no mostraron variación en la viabilidad entre las células expuestas a diferentes concentraciones de partículas y los cultivos control. El análisis de correlación de longitud contra área mostró que las dos determinaciones proporcionan una información similar ($r=0.91$) (Figura 8) , por lo que se decidió utilizar la medida de longitud como parámetro para evaluar el efecto de daño al material genético.

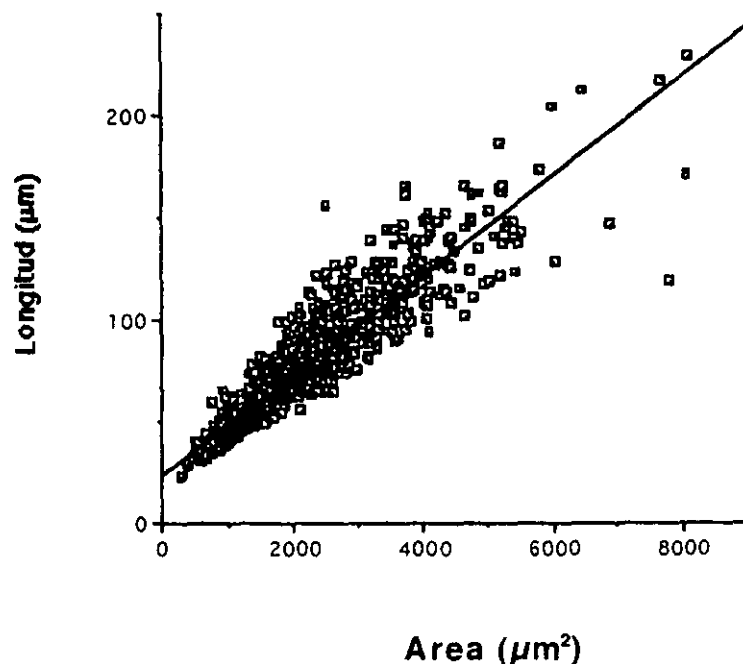


Figura 8: Correlación entre la longitud y el área de los cometas de células expuestas a diferentes concentraciones de partículas del Norte de la Ciudad de México. ($r=0.91$)

Al evaluar las longitudes de los cometas se observa que las partículas del N y el C presentan en general una inducción de cometas de una longitud mayor que los inducidos por las partículas del S. En los tres casos se puede ver que en las concentraciones mas bajas se presenta una relación de tipo concentración-respuesta, la cual se pierde en las concentraciones mas altas. En la figura 9 se muestran la mediana, el percentil 25 y 75, así como el valor máximo y mínimo para cada una de las partículas evaluadas. Las longitudes de los cometas por arriba del percentil 75 del control tienden a ser mayores conforme se incrementa la concentración, por lo que los posteriores análisis se realizaron tomando en cuenta el percentil 75 del control como punto de corte, asumiendo que por debajo del punto de corte las longitudes corresponden a las de células normales

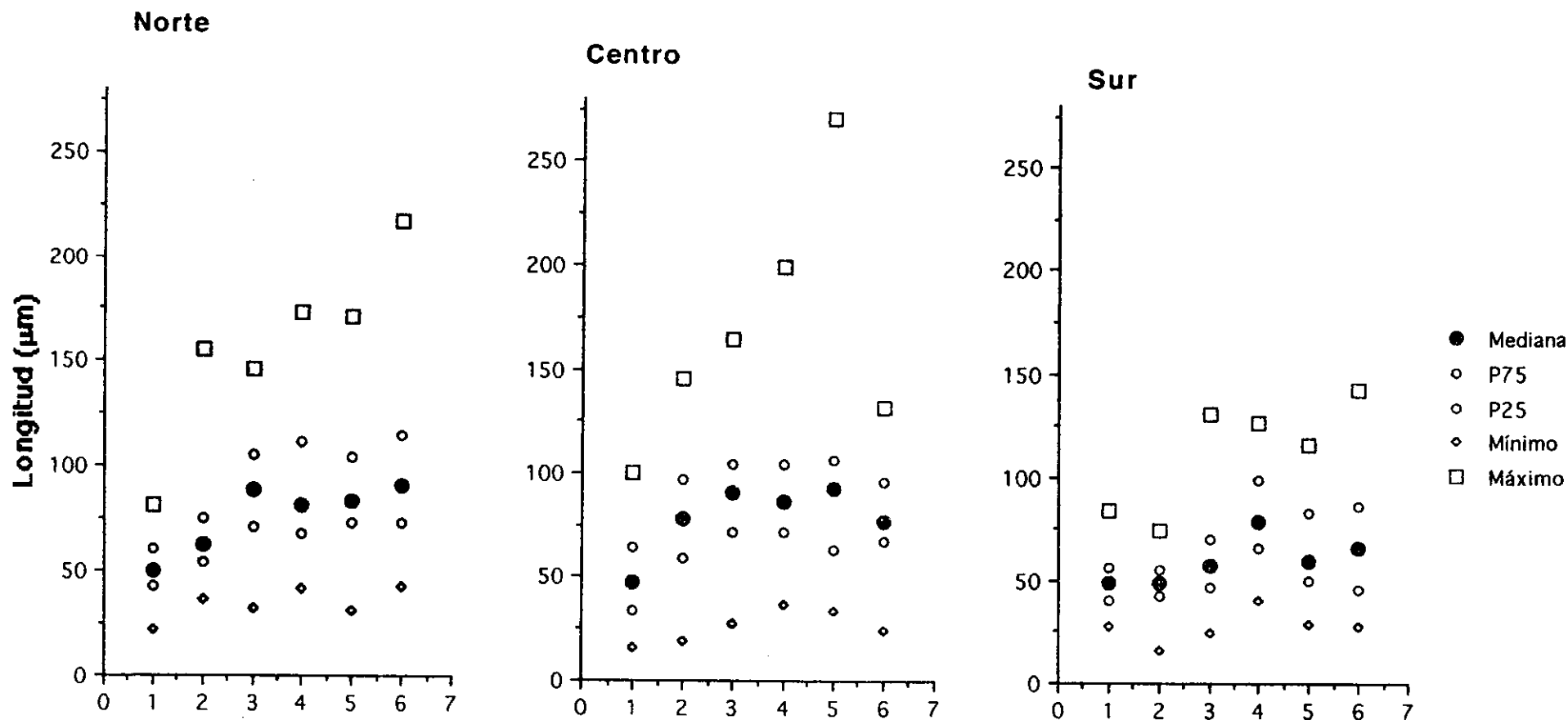


Figura 9: Longitudes de los cometas de células expuestas a partículas del Norte, Centro y Sur de la Ciudad de México. Las longitudes mostradas corresponden a la Mediana, percentil 25 (, percentil 75, mínimo y máximo. Los grupos mostrados son: 1) control; 2) $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 3) $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4) $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 5) $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 6) $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Cuando se determinó el porcentaje de cometas por arriba del percentil 75 del control, se encontró que a partir de la concentración de $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, las partículas del N y C muestran en promedio, entre el 70 y el 80% de cometas con una longitud por arriba del punto de corte ($p < 0.001$ vs control). Por otra parte se observa que a la misma concentración, las partículas del S solo han inducido en promedio un 43.7% de cometas por arriba del punto de corte (Cuadro 3) ($p < 0.01$ vs control). Es interesante observar que a partir de la concentración de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ todas las partículas provocan que la mayoría de los cometas se encuentren por arriba del punto de corte ($p < 0.001$ vs control). Al comparar la proporción de cometas por arriba del percentil 75 de las tres diferentes zonas se observa que a la concentraciones de $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, las partículas del N y C presentan una mayor proporción de cometas largos que lo que se encuentra en las partículas del S ($p < 0.001$).

Cuadro 3) Proporción de células que presentaron cometas con una longitud superior al punto de corte (percentil 75) del cultivo control.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Proporción		
	N	C	S
0	27	25.7	25.3
2.5	78.4	73.3	43.7
5	92.2	82.7	85.5
10	85.6	84.7	92
20	80	82.3	76.5
40	75	91.5	75.5

Al analizar las proporciones de los cometas por longitud se observa que las partículas del N y C de la CM, inducen una proporción mayor de cometas largos, mientras que las partículas del S inducen cometas con una longitud menor (Cuadro 4). En este ejemplo la longitud correspondiente al corte del percentil 75 del control es de $58.2 \mu\text{m}$

Cuadro 4) Porcentaje de cometas agrupados por rango de longitud. Se presentan los datos de un experimento representativo.

A) Partículas del Norte

Rangos de longitud

[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	<P75 < 58.2	(P75- P75+20 μm) 58.3-78.2	(P75+20 μm)- (P75+40 μm) 78.3-98.21	> (P75+40 μm) >98.2
Blanco	75	25	0	0
2.5	18	89	3	0
5	27	55	18	0
10	3	22	40	35
20	7	35	27	31
40	26	5	34	35

B) Partículas del Centro

[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	< 58.2	58.3-78.2	78.3-98.21	>98.2
Blanco	73.5	16.5	10	0
2.5	31	31	30	8
5	28	12	20	40
10	7	25	35	33
20	7	2	21	70
40	6	34	43	17

C) Partículas del Sur

[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	< 58.2	58.3-78.2	78.3-98.21	>98.2
Blanco	70	30	0	0
2.5	48	45	7	0
5	28	33	27	12
10	20	32	17	31
20	20	22	38	20
40	20	22	27	31

Discusión

- Composición de las partículas:

En los últimos años se han realizados múltiples estudios en los cuales se señala que la exposición a concentraciones elevadas de partículas contaminantes se encuentra relacionada con un incremento en las visitas a salas de emergencia en los hospitales, así como un aumento en la tasa de mortalidad. Algunos autores señalan que la composición de las partículas no es un factor determinante para que estas relaciones se presenten (64). Esto ha hecho suponer que el efecto tóxico de las partículas está dado por su naturaleza de partícula y no por lo que contienen (31, 64).

Si consideramos que el número y variedad de fuentes fijas y móviles que emiten partículas es muy grande, y si tomamos en cuenta que en la CM se presentan zonas con diferentes actividades económicas muy marcadas, es lógico suponer que dichas partículas presentarán diferencias en su composición (11). La mezcla es tan compleja que realizar un análisis completo de la composición requeriría de una gran cantidad de trabajo de química analítica y de aerobiología para evaluar la composición precisa de éstas. Debido a esto, se decidieron tomar dos grupos importantes dentro de los componentes de las partículas, siendo estos los metales de transición y sulfatos, así como las endotoxinas. Los metales de transición son de gran importancia ya que la presencia de estos nos puede dar una idea del origen de las partículas, ya que la presencia de metales como el vanadio y el níquel al igual que la presencia de S y SO_4 nos sugieren importantes emisiones por parte de motores de combustión interna, ya sea presentes en vehículos o en la industria. La presencia de endotoxinas se encuentra relacionada directamente con la presencia de contaminación biológica, ya que esta biomolécula es un componente estructural en bacterias gram negativas. Los resultados obtenidos durante el estudio muestran que tanto

los metales de transición como los sulfatos se presentaron en mayor concentración en el N de la CM que lo encontrado en el C y menor aún en el S. En el caso de la endotoxina se presentó una concentración mas alta en el N, seguido del C y por último del S. Estas diferencias podrían estar asociadas a la diferencia en los índices de urbanización de cada una de estas zonas.

Estos resultados muestran que dentro de una misma ciudad se pueden encontrar variaciones importantes en la presencia de diversos componentes, lo cual podría estar reflejado en los efectos que estas partículas pueden tener en la población. Anteriormente se demostró que extractos orgánicos de las partículas tienen diferentes potenciales mutagénicos (12). Si bien en ese estudio no se realizó un análisis de los componentes orgánicos que podrían ser responsables del potencial mutagénico, al encontrar que los extractos de partículas del C indujeron una mayor cantidad de mutaciones que las del N y estas que las del S, los autores atribuyeron esta diferencia a la presencia de mas automóviles en la zona C. La composición de las partículas es algo que no se conoce con precisión, pero los resultados encontrados hasta este momento nos permiten suponer que en diferentes ciudades e incluso en diferentes zonas de una misma ciudad, se van a encontrar composiciones diferentes, lo cual seguramente estará relacionado con diferencias en los efectos tóxicos. Si bien en los estudios epidemiológicos estas diferencias en la composición no ha sido relacionada con diferentes efectos en la salud, posiblemente esto se deba a que estos estudios han sido realizados midiendo efectos agudos después de 24 a 72 horas de exposición a concentraciones altas de partículas.

- Evaluación toxicológica *in vitro* :

Las partículas utilizadas en el presente estudio también fueron evaluadas por Bonner y col (43) para medir la capacidad de éstas para inducir la expresión del receptor

alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr). En dicho estudio se observó una relación entre el tipo de partícula que se evaluó y la capacidad de dicha partícula para inducir la expresión del PDGFr. En el presente estudio se decidió evaluar el efecto tóxico en cultivos celulares, y se determinó la presencia de daño genético en cultivos de células de mamíferos.

+ Evaluación de citotoxicidad:

Los resultados encontrados en los ensayos de citotoxicidad muestran que las células que se encuentran en confluencia son menos susceptibles al efecto tóxico que aquellas que se encuentran en proliferación (Figuras 5, 6 y 7). Cuando las células se encuentran confluentes no se observa una disminución en el número celular, mientras que en células en proliferación se observa un claro efecto citotóxico.

En células confluentes en ausencia de factores de crecimiento se observa que conforme se incrementa la concentración de partículas hay un incremento en el número de células. Esto puede deberse a que las partículas induzcan la proliferación de las células, como ya ha sido demostrado para otras partículas como el asbesto, pero algunos ensayos de proliferación por medio de incorporación de bromo deoxiuridina o de timidina tritiada en una línea celular de monocitos (J744) y en células han mostrado resultados que indiquen que las partículas inducen proliferación. Debido a que en este estudio se utilizó un ensayo colorimétrico, es posible que la presencia de las partículas en el fondo de la caja absorban parte de la luz, pero desafortunadamente no existe forma de eliminar estas partículas sin dañar la monocapa de células. La alternativa de utilizar otros métodos existe, pero como ya se mencionó anteriormente, los ensayos en los que se miden enzimas como la lactato deshidrogenasa o ensayos de actividad de algún organelo, presentan problemas

metodológicos debido a que las partículas pueden adsorber a las enzimas a su superficie, o inducir estrés metabólico.

El efecto observado en células en proliferación muestra una diferencia entre los efectos de las partículas de las tres diferentes zonas de la ciudad. Dichos experimentos muestran que las partículas del *N* son mas tóxicas que las del *C* y las del *S*. Esto concuerda con que dichas partículas son las que contienen una mayor cantidad de metales de transición y endotoxina. Bonner y col encontraron que las partículas del *N* eran las que inducían mayores niveles de expresión del PDGFr (43) por lo que estos resultados apoyan dicha observación.

Dentro de los experimentos realizados con células en proliferación se encontró que la densidad celular juega un papel importante, ya que el efecto tóxico se hace mas evidente cuando se tiene una densidad celular baja. El que las partículas sean mas citotóxicas al exponer cultivos celulares en baja densidad puede asociarse a una relación existente entre el número de células y la cantidad de partículas por centímetro cuadrado (65). Estos resultados refuerzan las observaciones de una relación tipo concentración-respuesta y permiten determinar que la cantidad de partículas a la que esté expuesta una célula será determinante en la intensidad del efecto evaluado.

Las diferencias encontradas en la citotoxicidad dependiendo del estado de proliferación de las células muestran que las partículas son tóxicas cuando las células en cultivo se encuentran proliferando. A la fecha se desconocen los mecanismos mediante los cuales una partícula puede tener un efecto tóxico. Incluso en partículas tan bien caracterizadas como el asbesto, no se conoce a fondo el mecanismo de toxicidad. El que las células requieran de que la célula esté proliferando para presentar un efecto tóxico

señala hacia la posibilidad de que se requiera de la presencia de duplicación del material genético, el cual puede ser susceptible de daño durante la fase S del ciclo celular.

+ Evaluación de daño al material genético:

La evaluación del daño al material genético es un aspecto que puede ser evaluado a muy distintos niveles. Dentro de los ensayos mas utilizados encontramos el análisis de metafases (66, 50) y anafases (54, 55), la presencia de aductos (67), la inducción de mutantes en bacterias (12), la detección de mutaciones puntuales en genes específicos, así como la detección de rompimientos del material genético por medio del ensayo de cometas (63, 30). Cada una de estas estrategias proporciona información diferente y se puede considerar que la información obtenida mediante un método complementa a lo encontrado mediante las otras estrategias. En el presente estudio se decidió determinar la presencia de anafases anormales, así como la inducción de rompimientos al material genético por medio del ensayo de cometas. Estos ensayos nos permiten realizar el análisis en células de mamíferos y no es necesario realizar extracciones del material genético lo cual puede introducir la detección de falsos positivos debido a la presencia de las partículas en el medio.

En este estudio se encontró que las partículas de la CM no son capaces de provocar alteraciones en el proceso de disyunción cromosómica (Cuadro 2). Este tipo de alteraciones han sido reportadas cuando se han evaluado partículas de tipo inorgánico como el asbesto crisótilo (54) o el polvo de Mexicali (55). Debido a que se sabe que en los últimos años se ha incrementado la presencia de CF en los habitantes de la ciudad de México (22), y debido a que este tipo de cuerpos se asocian a la presencia de asbesto, se decidió determinar si las partículas de la ciudad compartían alguna característica genotóxica similar a la de las partículas de origen mineral. Los resultados sugieren que la

cantidad de partículas inorgánicas presentes en las PM10 de la CM no son suficientes para generar un daño similar al provocado por partículas inorgánicas puras. Otra posible explicación es que una de las causas por las cuales las partículas inorgánicas son capaces de provocar este tipo de daños es por una interacción de cargas (54) y el que las PM10 sean ricas en hidrocarburos podría provocar que estos últimos enmascaren la carga de los minerales, impidiendo una interacción entre las partículas y el material genético. El efecto citotóxico no parece tener relación con este resultado negativo ya que en comparación con lo observado con el asbesto, la baja frecuencia de anafases anormales es similar en todas las concentraciones (Cuadro 2) y no se encontró un efecto citotóxico elevado a las concentraciones utilizadas para esta evaluación (Figura 6).

Para realizar el ensayo de cometas se usaron condiciones de cultivo similares a las utilizadas en los ensayos de citogenética para evaluar metafases (50) y se utilizaron concentraciones que se encontraran por abajo de la CL-50 encontrada para las partículas después de 72 horas de exposición (Figura 6), por lo que se trabajó a concentraciones entre 2.5 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Al determinar el daño genético por medio del ensayo de cometas, se encontró que las partículas de la CM son capaces de producir alteraciones en el material genético de células expuestas en cultivo. La utilización del ensayo de cometas presenta la ventaja de que permite identificar rompimientos presentes en una cadena de DNA lo cual hace que el ensayo sea muy sensible. Otra ventaja de este método es su rapidez, ya que el analizar la longitud y área de un cometa se puede realizar con la ayuda de un analizador de imágenes. Durante el ensayo de cometas se evalúa la integridad del material genético, pero los daños encontrados por este método pueden ser alteraciones que posteriormente puedan ser reparadas o no, mientras que al determinar la presencia de rompimientos

cromatídicos o cromosómicos por medio de la evaluación de metafases se observa un daño que no ha podido ser reparado.

En el presente trabajo se decidió utilizar la longitud de los cometas como parámetro de daño al material genético. En algunos trabajos se ha sugerido que el área es la medida que es mas representativa del daño genético evaluable (58), pero por otro lado, existes diversos trabajos en los que se utiliza esta técnica para evaluar el efecto de agentes contaminantes en los cuales se utiliza a la longitud como parámetro (28, 29, 30). Debido a la diferencia de opiniones, se decidieron realizar las dos mediciones en el primer tipo de partícula evaluada (partículas del *M*). Con los datos de tres experimentos-se realizó una correlación en la que encontramos que tanto la longitud como el área, bajo las condiciones experimentales utilizadas, aportan la misma información (Figura 8). Estos datos muestran que se pueden utilizar cualquiera de los dos parámetros, y debido a que la longitud ha sido utilizada en estudios de daño al material genético como consecuencia de la exposición a contaminación (28, 29, 30), se decidió utilizar esta última medida como parámetro de daño, además de que es una medida mas directa que no depende de cálculos adicionales.

Como se puede ver en la figura 9 la longitud de los cometas presenta una tendencia a aumentar conforme se incrementa la concentración de partículas. Si se toma a la mediana como parámetro para evaluar el cambio presente en la longitud de los cometas se encuentra que hay un incremento en la longitud en las primeras concentraciones y se mantiene constante. Sin embargo, si se evalúa el cambio en la dispersión de los datos por arriba del percentil 75, se encuentra una clara relación del tipo concentración-respuesta para todas las partículas. También es en esta zona de la distribución de los resultados en donde se aprecia una diferencia mas clara entre los grupos que fueron comparados. Debido a esto se decidió utilizar al percentil 75 de la longitud de los cometas de células no

expuestas a partículas, como punto de corte. Otro motivo por el que se utilizó al percentil 75 como punto de corte fue que el cultivo celular no se realizó en condiciones de sincronización celular, por lo que la presencia de células en fase S podrían presentar cometas largos debido a que las zonas de replicación del DNA podrían producir colas similares a las que induce un agente genotóxico. Debido a que solo una fracción de las células se encuentra en esta fase, se consideró que en un cultivo de células debía de existir una proporción de células que presentaran cometas largos.

Con base en este punto de corte se tomaron los siguientes parámetros: 1) Longitud de los cometas por arriba del percentil 75 del control; 2) Proporción de cometas por arriba del percentil 75 del control y 3) Proporción de la longitud de los cometas por arriba del punto de corte, agrupados en rangos en los que se incrementa la longitud en 20 μm .

Los resultados muestran una clara diferencia entre las partículas del N y C de la ciudad con respecto a las partículas del S. En el cuadro 2 se muestra que a la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, las partículas del N y C alcanzan un 70-80 % de cometas por arriba del punto de corte, y dicha proporción se mantiene a lo largo de todas las concentraciones. Las partículas del S, a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentan un 43.7% de cometas por arriba del punto de corte, incrementándose dicha proporción a un 85 % a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y manteniéndose elevada en las demás concentraciones. Este dato por si solo, sugiere que existe alguna diferencia importante en el efecto genotóxico que pudieran estar induciendo las partículas de diferentes zonas de la CM.

Cuando se analiza la longitud de los cometas por arriba del punto de corte, se puede ver que las partículas del N y C de la CM tienden a inducir cometas de mayor longitud que los que se encuentran en el caso de las partículas del S (Figura 9). Cuando se

analiza este parámetro, se observa que en todos los casos se presenta una relación de tipo concentración-respuesta.

Por último, al evaluar la proporción de la longitud de los cometas, se puede apreciar que a concentraciones bajas, los cometas inducidos por las partículas del N y C de la ciudad se presentan en mayor proporción como cometas largos, mientras que los cometas de las partículas del S tienden a ser mas cercanos al tamaño del punto de corte (56 a 64 μm) (Cuadro 4), aunque estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En concentraciones altas se observa que las partículas de todas las zonas presentan un patrón similar de daño al material genético.

El daño al material genético inducido por las partículas evaluado en el presente estudio muestra dos características importantes: 1) las partículas no alteran el proceso de disyunción cromosómica como lo hacen las partículas de tipo inorgánico y 2) las partículas son capaces de inducir rompimientos en el DNA de células expuestas. Esto muestra que las partículas de la CM presentan propiedades genotóxicas diferentes a las observadas para las partículas inorgánicas, ya que tradicionalmente éstas partículas son capaces de inducir los dos tipos de alteraciones (50, 54, 55, 66).

- Conclusiones:

Los resultados aquí presentados, muestran que las partículas de la CM presentan diferentes propiedades toxicológicas, dependiendo de la zona de la ciudad en la que fueron colectadas. Bonner y col. (43), previamente demostraron que las diferencias en la composición de estas partículas inducen diferentes respuestas celulares asociadas a respuestas inflamatorias. Los resultados presentados aquí refuerzan dicha observación, y hacen evidente que la citotoxicidad y genotoxicidad esta relacionada con la composición.

analiza este parámetro, se observa que en todos los casos se presenta una relación de tipo concentración-respuesta.

Por último, al evaluar la proporción de la longitud de los cometas, se puede apreciar que a concentraciones bajas, los cometas inducidos por las partículas del N y C de la ciudad se presentan en mayor proporción como cometas largos, mientras que los cometas de las partículas del S tienden a ser mas cercanos al tamaño del punto de corte (56 a 64 μm) (Cuadro 4), aunque estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En concentraciones altas se observa que las partículas de todas las zonas presentan un patrón similar de daño al material genético.

El daño al material genético inducido por las partículas evaluado en el presente estudio muestra dos características importantes: 1) las partículas no alteran el proceso de disyunción cromosómica como lo hacen las partículas de tipo inorgánico y 2) las partículas son capaces de inducir rompimientos en el DNA de células expuestas. Esto muestra que las partículas de la CM presentan propiedades genotóxicas diferentes a las observadas para las partículas inorgánicas, ya que tradicionalmente éstas partículas son capaces de inducir los dos tipos de alteraciones (50, 54, 55, 66).

- Conclusiones:

Los resultados aquí presentados, muestran que las partículas de la CM presentan diferentes propiedades toxicológicas, dependiendo de la zona de la ciudad en la que fueron colectadas. Bonner y col. (43), previamente demostraron que las diferencias en la composición de estas partículas inducen diferentes respuestas celulares asociadas a respuestas inflamatorias. Los resultados presentados aquí refuerzan dicha observación, y hacen evidente que la citotoxicidad y genotoxicidad esta relacionada con la composición.

De todo lo anterior podemos concluir lo siguiente:

1) El contenido de algunos componentes de las partículas (metales pesados, azufre, sulfatos y endotoxinas) va a depender de la zona en la que estas sean colectadas, presentando una mayor concentración las partículas del N de la CM

2) El efecto citotóxico de las partículas en cultivo celular va a depender del estado de proliferación en el que se encuentren las células, presentando un efecto citotóxico cuando la célula se encuentra en proliferación, y no presentando efecto cuando la célula se encuentra quieta.

3) Las partículas del N de la CM son mas citotóxicas que las del C y S en condiciones de proliferación a concentraciones entre 2.5 y 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4) Las partículas de la CM no son capaces de producir alteraciones en el proceso de disyunción cromosómica.

5) Las partículas del N y C son mas genotóxicas que las del S a la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

6) La técnica de cometas para evaluar el daño genético generado por las partículas no permitió determinar si existen diferencias entre las partículas del N y el C.

7) Queda por identificar cual o cuales de los principales componentes de las partículas participa en los efectos citotóxico y genotóxico.

8) Queda por evaluar los diferentes mecanismos por los cuales las partículas están generando el efecto genotóxico.

9) Queda por evaluar si estos efectos citotóxicos y genotóxicos se presentan en condiciones *in vivo*.

Apéndice

Introducción

Uno de los objetivos originales del presente estudio era el evaluar la capacidad de las partículas de la CM para inducir procesos inflamatorios en animales expuestos por instilación. Para esto se utilizaron animales provenientes del Instituto Nacional de Cardiología (INCICh), se estandarizaron las condiciones de las maniobras a realizar en los animales y se realizaron experimentos en los que los animales fueron expuestos a diferentes concentraciones (0.75 a 3 mg/100 g de peso) de partículas de la CM, cuarzo o hierro carbonilo y se determinó la presencia de diferentes marcadores de inflamación como: concentración de proteínas, concentración de lactato deshidrogenasa (LDH), conteo celular y cuenta diferencial. En todos los experimentos se incluyó tanto un control expuesto al vehículo de las partículas (PBS), así como un control el cual únicamente fue anestesiado y sometido a la cirugía necesaria para realizar la instilación. Los resultados obtenidos tanto en los animales expuestos al vehículo como aquellos que únicamente fueron sometidos a la cirugía presentaron concentraciones elevadas de los marcadores de inflamación y en ocasiones estas fueron mas elevadas que las encontradas en los animales expuestas a partículas de la CM o incluso a aquellas presentes en los animales expuestos a cuarzo. Algunos animales fueron sacrificados sin realizar maniobra previa y se examinó macroscópicamente los pulmones encontrando algunos animales con procesos hemorrágicos. Debido a esto se decidió comparar la calidad de los animales provenientes del INCICh con animales del bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición (INNSZ), el cual cuenta con aire filtrado y las condiciones de manipulación de los animales tiene un control mas estricto (Rosas, comunicación personal). Se encontró que los animales del INNSZ son

de mejor calidad que los del INCICH, sin embargo presentan niveles mas elevados de los marcadores de inflamación que los reportados en la literatura. A continuación se presentan algunos de los datos encontrados tanto en la evaluación de los animales expuestos a partículas, así como de la comparación realizada entre los animales de dos diferentes bioterios.

Material y métodos

- Instilación de animales:

Para determinar si las PM10 de la CM son capaces de inducir procesos inflamatorios, se decidieron realizar estudios de instilación en ratas, en los cuales utilizó al cuarzo (Q) como control positivo, al hierro carbonilo (FeC) como control negativo y una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) como testigo del ensayo (46).

Con base en estudios realizados previamente (68) se determinó que la dosis óptimas a utilizar fuera de 3.0 mg/100 g de peso.

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar de 140 a 160 g de peso. Se trabajaron seis grupos de animales expuestos a: N, C, S, Q, FeC y PBS. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Quetamina-Rompun e instilados por la tráquea y sacrificados 1, 2 y 7 días después, con una sobredosis de nembutal (50 mg/100 g de peso). Se expuso la tráquea y se sometió a lavado los pulmones (44, 45, 47). El lavado bronquioalveolar (LBA) se realizó con PBS. El LBA fue centrifugado por 10 minutos y el sobrenadante fue usado para la cuantificación de proteínas y determinación de lactato deshidrogenasa, y en el botón celular se realizó un conteo celular y cuentas diferenciales (46).

- Cuantificación de proteínas y lactato deshidrogenasa presentes en LBA

La cuantificación de proteínas se realizó por medio del método de Bradford, (69).

La concentración de LDH se determinó con base en la medición de la generación de NADH, utilizando un KIT comercial.

- Conteo celular y cuenta diferencial:

Después de que el sobrenadante fue decantado, el botón fue resuspendido y se determinó el número celular por medio del método de exclusión de azul tripano (46).

De la misma suspensión se prepararon frotis para realizar una cuenta diferencial para determinar la cantidad de células polimorfonucleares presentes en el LBA (46).

- Análisis estadístico de los ensayos *in vivo*:

Los resultados se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, y se consideró que existía una diferencia estadísticamente significativa cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

Comparación de la calidad de bioterios de la CM

- Determinación del número celular, concentración de proteínas totales y LDH en LBA de ratas libres de tratamiento con partículas:

Debido a que los animales utilizados para la realización de los experimentos antes mencionados, provenían de un bioterio con ventilación pasiva, se decidió comparar la calidad de estos animales con otros provenientes de bioterios con aire acondicionado. Se utilizaron 6 ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio INCICH y 6 animales de las mismas características del bioterio del INNSZ. Los dos grupos de animales fueron sacrificados con una sobredosis de nembutal y procesados como se mencionó anteriormente para la obtención de LBA. En estos lavados se determinó el número celular, la concentración de proteínas totales, así como la concentración de lactato deshidrogenasa con los métodos antes mencionados.

RESULTADOS

+ Cuantificación de proteínas y lactato deshidrogenasa (LDH) en LBA.

Los resultados de la cuantificación de proteína, no presentaron relación entre el tiempo de exposición y la cantidad de proteína encontrada (15 a 18 mg/ml para el N, 15 a 15.5 en el C, 11.6 a 13.5 en el S, 12.8 a 16.9 para el Q, 10.5 a 14.2 para el FeC y de 5.6 a 11 para el PBS) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a ninguno de los tiempos evaluados. En cuanto a la concentración de LDH en los LBA, solo el Q fue capaz de inducir un incremento en la concentración de esta enzima 24 horas después de la exposición ($p < 0.05$)

+ Número de células y cuenta diferencial.

El número de células presentes en el LBA mostró que 24 horas después de la exposición, el Q indujo un mayor número que lo encontrado en los grupos expuestos a partículas de la CM y que lo encontrado en los animales control, pero no se encontraron diferencias entre los controles y los animales expuestos a partículas de la CM.

La cuenta diferencial arrojó resultados similares a lo observado en el conteo celular

- Comparación entre bioterios:

+ Determinación del número celular, concentración de proteínas totales y LDH en LBA de ratas libres de tratamiento con partículas:

Los animales de bioterio con ventilación pasiva no mostraron diferencias significativas en las cantidades de células presentes en el LBA y en la concentración de proteínas totales en comparación con los animales de bioterio con aire acondicionado (Cuadro A1). Por otra parte, al medir la concentración de LDH presente en el LBA los animales del laboratorio con ventilación pasiva presentaron concentraciones muy por arriba de lo encontrado en los animales del bioterio con aire acondicionado ($p < 0.05$).

Cuadro A1) Comparación de marcadores inflamatorios en LBA de animales provenientes de dos diferentes bioterios. ($p < 0.05$)

	Aire acondicionado	Ventilación pasiva
# de Células	1.1×10^5 (0.76-1.3)	4.4×10^5 (3-7.1)
Cuenta diferencial PMN	1 (0-8)	2 (1-3)
Macrófagos	98 (92-100)	98 (97-99)
Concentración de proteínas (mg/mL)	9.8 (8.3-23.3)	10.8 (5.7-14.9)
LDH (U/mL)	0.39 (0.05-0.45)	2.7 (0.675-3.7)*

DISCUSION

Los ensayos en animales de laboratorio han sido ampliamente utilizados desde hace muchos años para evaluar el efecto de partículas en el aparato respiratorio (44, 45, 46, 47). Este tipo de estudios ha demostrado ser sumamente valioso ya que nos permite ver a varios niveles que es lo que sucede cuando un animal es expuesto a partículas, ya sea por inhalación o por instilación. Dentro de los parámetros que se han medido tradicionalmente encontramos principalmente a la dinámica de depósito de las partículas (70, 46) y también a la presencia de biomarcadores de inflamación (44, 45, 47). El presente estudio planteó como uno de sus objetivos originales determinar el efecto que tienen las partículas de la CM en animales de laboratorio expuestos por instilación por medio de la medición de biomarcadores de exposición. Los resultados encontrados no permitieron ver si las partículas de la CM son proinflamatorias, ya que los animales utilizados presentaron elevados niveles de estos biomarcadores incluso en los animales expuestos a los controles negativos o aquellos no expuestos.

Los animales de laboratorio mostraron niveles muy elevados de los biomarcadores de inflamación en comparación a lo observado en Estados Unidos (44, 45, 47). Como ejemplo basta con citar lo que observamos en la concentración de proteínas y LDH. En el

caso de nuestro animales encontramos que la concentración de proteínas en los animales expuestos al vehículo de las partículas presentó de 5.6 a 11 mg/mL, mientras que en los estudios de los Estados Unidos los animales expuestos a solución salina presentaron alrededor de 0.1 mg/mL. En el caso de la LDH observamos algo similar, presentando los animales de la CM concentraciones de alrededor de 65 U/mL, mientras que en los estudios de Estados Unidos se encontraron alrededor de 10 U/mL.

El hecho de que los animales utilizados para este estudio provenían originalmente de un bioterio con ventilación pasiva, y considerando que los bioterios en Estados Unidos cuentan con aire acondicionado, se decidió comparar la calidad de los animales de diferentes bioterios de los cuales la diferencia era la presencia de ventilación pasiva y de aire acondicionado. Ya se había demostrado una diferencia en cuanto a la calidad del aire de los bioterios (Rosas, comunicación personal) dependiendo del tipo de ventilación presente, siendo el bioterio con aire acondicionado el que presentó mejores condiciones. Los resultados obtenidos nos mostraron que tanto los animales provenientes de bioterios con ventilación pasiva como de aquellos que tienen aire acondicionado presentaron niveles elevados de biomarcadores de inflamación en las vías respiratorias. Esto hace pensar que las condiciones en las cuales se tienen a los animales de laboratorio en los bioterios evaluados no son las adecuadas para realizar estudios de efectos de contaminantes en las vías respiratorias. Esto puede deberse por que existe un intercambio de aire entre el interior y el exterior del bioterio sin que dicho aire sea filtrado, o bien al tipo de cama utilizado para los animales. Si dicha cama libera partículas o el cambio se hace enfrente de los animales generando suspensiones de partículas en el aire, entonces los animales se encontraran expuestos. La presencia de microorganismos presentes en la cama hace que este problemas se vuelva todavía mas complejo.

La utilización de animales de laboratorios es de gran importancia para la investigación biomédica. La calidad de los animales utilizados en este tipo de es un factor que determina la calidad de los resultados obtenidos, especialmente si el órgano que se desea evaluar se encuentra dañado. En el caso del presente estudio se deseaba evaluar el efecto de la presencia de partículas de la CM en el tracto respiratorio, y es evidente que si los animales presentan una enfermedad respiratoria previa, los resultados que se pueden generar no son confiables. Por otra parte es deseable que se pueda contar con animales sanos para realizar cualquier tipo de evaluación, ya que la presencia de enfermedad afecta las observaciones realizadas. Debido a esto es necesario considerar el mejoramiento tanto de la calidad de los bioterios, así como la calidad de los animales que éstos generan.

CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones en las que se encontraban los animales de bioterio en el momento de la realización del presente trabajo no permitió que se evaluaran los efectos *in vivo* de las partículas PM10 de la CM
- 2) Es necesario mejorar las condiciones de los bioterios y la calidad de los animales que estos generan para poder obtener resultados que sean reproducibles y comparables con los generados en otras partes del mundo

Bibliografía

- 1) Jauregui E. *Las tolvaneras de la Ciudad de Mexico. Ing Hidr en Mexico*. 1960; 14(2): 60-66.
- 2) Jauregui E. *La erosión eólica en los suelos vecinos al lago de Texcoco. Ing Hidr en Mexico* 1971; 25: 103-115
- 3) Jauregui E. *The dust storms of Mexico city. Int J Climatol*. 1989; 9: 169-180
- 4) Reforma, Enfoque: *Los números del caos, todo el DF*. Editores Alejandro Junco. Periódico Reforma, 8 de junio 1997.
- 5) INEGI. *Programa integral contra la contaminación atmosférica. Un compromiso común*. Ciudad de México: 1990
- 6) Hernández E, Perez J, Paccagnella A, Piña MA, Munguia M, Catalán M, Rojas M. *Air pollution and respiratory health in Mexico city. JOEM* 1997; 39: 299-307
- 7) Blake D, Rowland S. *Urban leakage of liquified petroleum gas and its impact on mexico city air quality. Science* 1995; 269: 953-956
- 8) Reforma, *Anuario 97*. Editores Homero Fernández. Suplemento Especial, Periódico Reforma, 5 de enero, 1998.
- 9) Calderón M, Lacey J, McCartney A, Rosas I. *Seasonal and diurnal variation of airborne basidiomycete spore concentration in Mexico city. Grana* 1995; 34: 260-268
- 10) Calderón M, Lacey J, McCartney A, Rosas I. *Influence of urban climate upon distribution of airborne Ceuteromycete spore concentrations in Mexico city. Int J Biometeorol* 1997; 40: 71-80
- 11) Rosas I, Ponciano G, Alfaro E. *Contaminación atmosférica y salud en la Ciudad de México. Ciencia y Desarrollo*. 1999; En prensa.

- 12) Villalobos R., Blanco S y Gómez S. *Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico city*. Atmospheric Environ. 1995; 29: 517-524.
- 13) Rosas I, Yela A, Santos BC. Occurrence of airborne enteric bacteria in Mexico City. Aerobiologia. 1994; 10: 39-45
- 14) Rosas I, Calderón C, Escamilla B, Ulloa M. *Seasonal distribution of Aspergillus in the air of an urban area: Mexico City*. Grana 1992; 31: 315-319
- 15) Rosas I, Calderón M, Ulloa M, Lacey J. *Abundance of airborne Penicillium CFU in relation to urbanization in Mexico City*. App Environ Microbiol. 1993; 59(8): 2648-2652
- 16) Rosas I, Escamilla B, Calderón C, Mosiño P. *The daily variations of airborne fungal spores in Mexico city*. Aerobiología. 1990; 6: 153-158.
- 17) Rosas I, Yela A, Salinas E Arregín R, Rodríguez A. *Preliminary assessment of protein associated with airborne particles in Mexico city*. Aerobiologia 1995 a; 11: 81-86
- 18) Rosas I, Belmont R, Jauregui E. *Seasonal variation of atmospheric lead levels in three sites in Mexico City*. Atmósfera 1995 b; 8:157-168
- 19) Miranda J, Morales JR, Cahill T, Aldape F, Flores J. *A study of elemental contents in atmospherisr aerosols in Mexico City*. Atmósfera 1992; 5: 95-108
- 20) Salazar S, Manriquez L, Carrera M, Bravo H. *Elemental and morphological analyses of atmospheric particles from southwestern part of Mexico city*. Bull Environ Contam Toxicol 1993; 51: 247-254
- 21) Vega E, García I, Apam D, Ruiz ME, Barbiux M. *Application of a chemical mass balance receptor model to respirable particulate matter in Mexico city*. J Air Waste Manage Assoc. 1997; 47: 524-529

22) Arenas-Huertero F.J, Salazar-Flores M, Osornio-Vargas A.R. *Ferruginous bodies as markers of environmental exposure to inorganic particles: experience with 270 autopsy cases in Mexico*. Environ Res. 1994; 64:10-17

23) Fortoul TI, Osorio LS, Tovar AT, Salazar D, Castilla ME, Olaiz G. *Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico city residents: Comparision of cases from the 1950s and the 1980s*. Environ Health Perspect. 1996; 104(6): 630-632

24) Vargas M, Segura P, Campos M, Hong E y Montaña L. *Effect of ozone exposure on antigen-induced airway hiperresponsiveness in guinea pigs*. J Toxicol Environ Health. 1994; 42: 435-442.

25) Delfino R, Murphy A, Burnett R, Brook J y Becklake M. *Effects of air pollution on emergency room visits for respiratory illnesses in Montreal, Quebec*. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155: 568-576.

26) Devalia J, Rusznak C, Wang J, Khair O, Abdelaziz M, Calderón M y Davies R. *Air pollutants and respiratory hipersensivity*. 1996; 86: 169-176.

27) Loomis D, Borja V, Bangdiwala S. *Ozone exposure and daily mortality in Mexico City: a time-series analysis*. HEI research report no. 75. Cambridge, MA: Health Effects Institute. 1996.

28) Calderón L, Osnaya N, Ramírez L, Villarreal A. *DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution*. Environ Health Perpect. 1996;104 (2): 160-168

29) Calderón L. *DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution*. Environ Mol Mutagen. 1997;30(1): 11-20.

ESTA TESIS NO
DE LA BIBLIOTECA

ESTA TESIS NO
DE LA BIBLIOTECA

30) Valverde. *DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City*. Environ Mol Mutagen 1997; 30(2): 147-152

31) Li XY, Gilmour PS, MacNee W. *Free radical activity and pro inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro*. Thorax. 1996; 51: 1216-1222.

32) Borja V, Loomis D, Bangdiwala S, Shy C, Rascón R. *Ozone, suspended particles, and daily mortality in Mexico city*. Am J Epidemiol. 1997; 145: 258-268.

33) Borja V, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinsky S, Loomis D. *Mortality and ambient fine particles in southwestern Mexico city*. Environ Health Perspect 1998; 106(12): 849-854.

34) Hoek G, Brunekreef B. *Effect of photochemical air pollution on acute respiratory symptoms in children*. Am J Respir Crit Care Med. 1995;151: 27-32.

35) Ackerman U, Leuenberger P, Schwartz J, et al. *Lung function and long term exposure to air pollutants in Switzerland*. Am J Respir Crit Care Med. 1997; 155: 122-129

36) Schwartz J y Dockery W. *Particulate air pollution and daily mortality in Steubenville, Ohio*. Am J Epidemiol. 1992;135-12-19.

37) Gamble J, Lewis J. *Health and respirable particulate (PM10) air pollution: a causal or statistical association*. Environ Health Perspect. 1996; 104: 838-850

38) Medina F, Barrera R, Morales J, Echegoyen R, Chavarría J y Rébora F. *Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases*. Lung Cancer. 1996; 14: 185-193.

39) Du YX, Cha Q, Chen XW, Chen YZ, Huang LF, Feng ZZ, Wu XF, Wu J. *An epidemiological study of risk factors for lung cancer in Guangzhou, China*. Lung Cancer. 1996;14 (suppl): s9-s37

40) Green L, Fortoul T, Ponciano G, Robles C, Rivero O. *Bronchogenic cancer in patients under 40 years old*. Chest 1993; 104: 1477-1481

41) Beeson WL, Abbey DE, Knutsen SF. *Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: Results from the AHSMOG study.* Environ Health Perspect 1998; 106(12): 813-822.

42) Reyes DC, Mireles BR, Chimal HJ, Carranza EI, Aguirre A, Alfaro ME, . Osornio VAR. *Evaluación de la capacidad hemolítica in vitro de muestras de polvo casero de la delegación Benito Juárez (D.F.).* Rev Inst Nal Enf Resp 1995; 8(2):38-42.

43) Bonner JC, Rice AB, Lindroos PM, O'Brien PO, Dreher KL, Alfaro-Moreno E, Rosas PI, Osornio-Vargas AR. *Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City.* Am J Respir Cell Mol Biol. 1998; 19(4):672-680.

44) Beck BD, Brain JD, Bohannon DE. *An in vivo hamster bioassay to asses the toxicity of particle in lungs.* Toxicol Appl Pharmacol 1982; 8(3):123-132

45) Brain JD, Beck BD. *Bioassays for mineral dusts and other particles.* En *In vitro effects of mineral dusts*, pp 323-335, editado por Beck EG y Bignon. NATO ASI series. 1984. Germany

46) Osornio Vargas AR, Hernandez NA, Yañez AG., Ussler W, Overby LH, Brody A. *Lung cell toxicity experimentally induced by a mixed dust from Mexicali, Baja California, México.* Environ Res 1991; 56:31-47.

47) Brain JD. *Short term in vitro and in vivo bioassay. Their role in estimating the toxic potential of inhaled complex mixture for humans.* Cell Biol Toxicol 1992; 8(3):123-132.

48) Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, Ghio AJ, Costa DL. *Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury.* J Toxicol Environ Health. 1997; 50: 285-305

49) Armenta Carrillo S. *Búsqueda de factores quimiotácticos para macrófagos alveolares en secreción pulmonar de ratas instiladas con asbesto crisótilo*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 1989.

50) Alfaro Moreno E, Arenas HF, Taja CL, Cervantes Peredo, Osornio-Vargas A.R.. *Alteraciones cromosómicas inducidas por un polvo casero de la Ciudad de Mexicali, Baja California*. Rev Inst Nal Cancerol Mex. 1995; 41(4):196-204.

51) Cole SP. *Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay*. Cancer Chemother Pharmacol 1986;17(3):259-263

52) Wilson AP. *Cytotoxicity and viability assays*. En Animal cell culture, a practical approach. Freshney RI (ed). IRL Press. pp 263-303. 1992

53) Becker S, Soukup JM, Gilmour I, Devlin RB. *Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: Effects on oxidant radical generation and cytokine production*. Toxicol Appl Pharmacol. 1996; 141: 637-648.

54) Hesterberg TW, Barret CJ. *Induction by asbestos fibers of anaphase abnormalities: mechanism for aneuploidy induction and possibly carcinogenesis*. Carcinogenesis. 1985; 6 (3): 473-475

55) Alfaro Moreno E, Flores RG, Hartasánchez FF, Orozco HA, Quintana BR, Osornio-Vargas A.R.. *In vitro induction of abnormal anaphases by contaminating atmospheric dust from the city of Mexicali, Baja California*. Arch Med Res. 1997; 28(4):549-553.

56) McKelevey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. *The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review*. Mutation Res. 1993; 288: 47-63

- 57) Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. *The comet assay: a comprehensive review*. Mutation Res. 1995; 339: 37-59.
- 58) Olive PL, Banath JP, Durand RE. *Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay"*. Radiation Res. 1990; 122: 86-94
- 59) DeMéo M, Laget M, Castegnaro L, Duménil G. *Genotoxic activity of potassium permanganate in acid solutions*. Mutation Res. 1991; 260: 295-306.
- 60) Barber CV, Fantle RG. *The role of oxygenation in embryotoxic mechanisms of three bio reducible agents*. Teratology. 1993; 47: 209-223.
- 61) DiPaolo JA, Nelson RL, Donovan PJ. *Morphological, oncogenic and kariological characteristics of syrian hamster embryo cells transformed in vitro by carcinogenic polycyclic hydrocabons*. Cancer Res 1971; 31:1118-1127
- 62) Hesterber TW, Barret JC. *Dependence of asbestos and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture and fiber dimension*. Cancer Res 1984; 44: 217-218
- 63) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res. 1988; 175: 184-191.
- 64) Schwartz J. *Air pollution and daily mortality: a review and meta-analysis*. Environ Res. 1994;64, 36-52.
- 65) Yañez Buruel AG. *Desarrollo de sistemas in vitro que permitan valorar la citotoxicidad de partículas contaminantes (polvo)*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química U.N.A.M. 1985

66) Oshimura M, Hesterberg TW, Tsutsui T, Barret C. *Correlation of asbestos induced cytogenetic effects with cell transformation of syrian hamster embryo cells in culture*. Cancer Res 1984; 44: 5017-5022

67) Binkova B, Lewtas J, Miskova I, Rossner P, Cerna M, Mrackova G, Peterkova K, Mumford J, Meyer S, Sram R. *Biomarker studies in northern Bohemia*. Environ Health Perspect 1996;104 Suppl 3:591-597

68) Alfaro Moreno E, Reyes DC, Avilés FR, Juárez AD, Molina GK, Prieto EM, Tena BC, Rosas PI, Osornio-Vargas A.R.. *Evaluación de la toxicidad de aeropartículas de la ciudad de México. VI semana de ecología y protección del ambiente*. Centro de Estudios Académicos Sobre Contaminación Ambiental, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, 2-6 de mayo, 1994

69) Bradford M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Annal Biochem 1976; 72:24-25

70) Brody AR, Warheit DB, Chang LY, Roe MW, George G, Hill LH. (1984). *Initial deposition pattern of inhaled minerals and consequent events at the alveolar level*. Ann NY Acad Sci. 428, 133-140.