



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Caracterización de la materia orgánica extraída de PM<sub>2.5</sub> y su efecto  
citotóxico en la línea celular de epitelio alveolar humano A549”**

**Tesis que presenta:**

**Biol. Josefina Poblano Bata**

**Para obtener el grado de:**

**Maestría en Ciencias en la Especialidad en Toxicología**

**Directores de Tesis:**

**Dra. Andrea M. G. De Vizcaya Ruiz**

**Dr. Omar Amador Muñoz**

**Ciudad de México**

**Noviembre, 2018**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados el IPN bajo la tutoría de la Dra. Andrea M. G. De Vizcaya Ruiz y en el Laboratorio de Especiación Química de Aerosoles Orgánicos y Atmosféricos y Desarrollo de Tecnologías Verdes del Centro de Ciencias de la Atmósfera bajo la tutoría del Dr. Omar Amador Muñoz.

## Dedicatoria

*Al alma grande y al corazón ardiente de mis padres, de mis hermanos, de mis familiares y amigos,  
gracias por alentarme siempre a ser feliz, sin ustedes esto no sería posible*

## **Agradecimientos**

A mis tutores, Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz y al Dr. Omar Amador Muñoz por invitarme a participar en el proyecto y abrirme las puertas de sus laboratorios, así como toda su atención, orientación, apoyo y motivación que me brindaron durante el desarrollo del proyecto.

A mis asesores, Dra. Luz María del Razo Jiménez y Dr. Adolfo Sierra Santoyo por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A la Biol. T. Marisela Uribe Ramírez por el entrenamiento y supervisión en las técnicas de cultivo celular MTS, LDH, azul de tripano, la determinación de ERO y Western blot, pero sobre todo por su calidad humana y apoyo incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio 26 de toxicología Gama, Verito, Russell, Artur y Aidee por su amistad y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de especiación química Margarita, Alejandra, Alberto, Cesar, Eréndira y Marisa por resolver todas mis dudas, apoyarme en todo momento y brindarme su amistad.

Al Colegio de Profesores del Departamento de Toxicología del Cinvestav por su invaluable aportación a mi formación académica.

A mis compañeros de generación Ceci, Nadia, Sandy, Jonathan, David, Jazz, Janisse, Esmeralda, Manuel, Laura, Arturo y Rosario por todos los momentos que compartimos en estos 2 años.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de la maestría.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	VIII
<b>ABSTRACT</b>	IX
<b>LISTA DE TABLAS</b>	X
<b>LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS</b>	X
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XI
<b>ABREVIATURAS</b>	XIII
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Contaminación atmosférica.	1
1.2 Material particulado.	2
1.2.1 Composición química del PM <sub>2.5</sub> .	4
1.2.2 Compuestos orgánicos contenidos en el PM <sub>2.5</sub> .	4
1.2.3 Propiedades físicas y químicas de los HAP.	6
1.2.4 Métodos de identificación de fuentes de los HAP.	8
1.3 Efecto adversos a la salud por la exposición a PM <sub>2.5</sub> .	10
1.3.1 Toxicocinética del PM <sub>2.5</sub> .	11
1.3.2 Características generales del epitelio alveolar.	12
1.3.3 Efecto adversos a la salud por la exposición a compuestos orgánicos presentes en el PM <sub>2.5</sub> .	13
1.3.4 Mecanismos celulares activados por la exposición a la fracción orgánica del PM <sub>2.5</sub>	14
1.3.4.1 Ingreso de los HAP a las células.	14
1.3.4.2 Metabolismo de los HAP.	15
1.3.4.3 Generación intracelular de ERO.	16
1.3.4.4 Estrés oxidante y el sistema de defensa antioxidante.	19
1.4 Justificación.	24
1.5 Hipótesis.	24
1.6 Objetivo General.	25
1.6.1 Objetivos particulares.	25
<b>2.- MÉTODOLÓGÍA</b>	26
2.1 Determinación la MOE y los HAP en PM <sub>2.5</sub> .	26
2.1.1 Acondicionamiento de filtros para la colecta de HAP.	26
2.1.2 Colecta del PM <sub>2.5</sub> en el norte de la Ciudad de México.	26
2.1.3 Extracción y determinación de los HAP contenidos en la MOE de PM <sub>2.5</sub> .	27
2.1.3.1.1 Fortificación de filtros con HAP-deuterados (HAP-d).	27
2.1.3.1.2 Procedimiento de extracción de MOE.	27
2.1.3.1.3 Calculo de la eficiencia del método en la recuperación de HAP contenidos en el PM <sub>2.5</sub> .	28

2.1.3.1.4	Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).	29
2.1.3.2	Determinación de los HAP en ensayos biológicos.	30
2.1.4	Identificación de fuentes de emisión por correlaciones de los HAP y contaminantes criterio.	32
2.1.5	Identificación de fuentes por tasas de diagnóstico de los HAP	31
2.2.	Evaluación de la toxicidad por la exposición a MOE en células de epitelio alveolar humano A549.	32
2.2.1	Análisis del efecto de la MOE en la viabilidad de las células A549 por el ensayo de MTS y azul de tripano.	32
2.2.2	Medición intracelular de ERO en las células A549 por la exposición a MOE de PM <sub>2.5</sub> .	33
2.2.3	Evaluación de los niveles de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1; enzimas antioxidantes SOD2, HO-1 y γ-GCS tras la exposición a la MOE de PM <sub>2.5</sub> en células A549.	34
2.3	Análisis estadístico.	35
<b>3.-</b>	<b>RESULTADOS</b>	36
3.1	Composición química de PM <sub>2.5</sub>	36
3.1.1	Concentración de PM <sub>2.5</sub> en noviembre-diciembre de 2017.	36
3.1.2	HAP identificados en la MOE de PM <sub>2.5</sub> .	37
3.1.3	Identificación de fuentes de emisión por correlaciones con contaminantes criterio y tasas de diagnóstico de los HAP.	45
3.1.3.1	Contaminantes criterio.	45
3.1.3.1.1	Identificación de las fuentes de emisión de acuerdo a la correlacion con contaminantes criterio.	46
3.1.3.2	Identificación de fuentes de emisión mediante el análisis de las tasas de diagnóstico de los HAP.	48
3.2	Efecto de la exposición de la MOE en células A549.	51
3.2.1	Determinación de la concentración de la MOE en los ensayos biológicos.	51
3.2.2	Identificación y cuantificación de los HAP en la MOE utilizada en los ensayos biológicos.	52
3.2.3	Efecto de la exposición de la MOE en la viabilidad de células A549.	53
3.2.4	Formación intracelular de ERO por la exposición a MOE de PM <sub>2.5</sub> .	55

3.2.5 Inducción de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1; de las enzimas antioxidantes SOD-2, HO-1 y $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM <sub>2.5</sub> en células A549.	56
3.2.5.1 Inhibición de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1	56
3.2.5.1 Inhibición de las enzimas antioxidantes SOD-2, HO-1 y $\gamma$ -GCS	58
<b>4.- DISCUSIÓN</b>	61
4.1 Composición química de PM <sub>2.5</sub> .	61
4.2 Identificación de fuentes de emisión de HAP.	63
4.3 Efecto de la exposición a MOE en la viabilidad de las células A549.	65
4.4 Efecto de la exposición a MOE en la formación de ERO en las células A549.	67
4.5 Inducción de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1; y de las enzimas antioxidantes SOD2, HO-1 y $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM <sub>2.5</sub> en A549.	70
4.5.1 Inducción de las proteínas de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1.	70
4.5.2 Inducción de las proteínas de las enzimas antioxidantes SOD-2, HO-1 y $\gamma$ -GCS.	72
<b>5.- CONCLUSIONES</b>	75
<b>6.- PERSPECTIVAS</b>	76
<b>7.- REFERENCIAS</b>	77

## RESUMEN

Las partículas menores o iguales a 2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) son de interés toxicológico debido a su capacidad para alcanzar los alveolos pulmonares y a los tipos de interacción entre los elementos químicos que constituyen a las partículas y los sistemas biológicos (aditivas, sinérgicas y antagonistas), siendo un factor determinante en el desarrollo de enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón en poblaciones expuestas. Los compuestos orgánicos asociados a  $\text{PM}_{2.5}$  son cientos y poseen una alta capacidad de causar estrés oxidante e inducir el metabolismo a través del sistema P450. Este trabajo se enfocó en identificar y cuantificar los HAP presentes en la materia orgánica extraída (MOE) de  $\text{PM}_{2.5}$  colectadas en la Ciudad de México, inferir sus posibles fuentes de emisión y evaluar la viabilidad, la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) e inducción de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1, y de las enzimas antioxidantes SOD2, HO-1 y  $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE en la línea celular de epitelio alveolar humano A549. La colecta de  $\text{PM}_{2.5}$  se realizó en noviembre de 2017 en las instalaciones del Cinvestav-Zacatenco. Para la identificación y cuantificación de HAP en  $\text{PM}_{2.5}$  se realizaron 2 procesos independientes de extracción utilizando celdas de extracción a microescala asistida por ultrasonido con reflujo (CEMAUF) con reducción por arrastre gentil de nitrógeno. Posteriormente, se determinó la masa de MOE y se realizó el análisis de 38 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por el método de dilución isotópica y curvas de calibración. La identificación de las fuentes de HAP se basó en correlaciones con contaminantes criterio y tasas de diagnóstico de HAP. El efecto citotóxico de la MOE en células A549 se evaluó mediante los ensayos de MTS y azul de tripano a concentraciones de 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g/ml}$  de MOE. Asimismo, la generación de ERO se midió con el ensayo de diclorofluoresceína en tiempos de 1, 6, 12 y 24 h. Finalmente la inducción de CYP1A1, NQO1, SOD-2, HO-1 y  $\gamma$ -GCS se evaluó por la exposición a 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$  de MOE mediante inmunodetección por en tiempos de 6 y 24 h post-exposición. Se identificaron 25 HAP y se determinó que la masa de la MOE representó el 15.5% de  $\text{PM}_{2.5}$ . La comparación de concentraciones por semana permitió observar que 22 HAP presentan concentraciones homogéneas durante el mes y las correlaciones de HAP con contaminantes criterio y tasas de diagnóstico permite inferir que doce HAP se emiten de fuentes primarias por medio de procesos pirogénicos y combustión incompleta de combustibles como diésel y gasolina. Las concentraciones de exposición empleadas a 6, 12 y 24 h no comprometen la viabilidad celular, pero favorece la formación de ERO, induciendo a la enzima del metabolismo CYP1A1 y a la enzima antioxidante  $\gamma$ -GCS. Marcadores celulares como la generación de ERO y la inducción de las enzimas del metabolismo y antioxidantes son inducidos tras la exposición a MOE extraída de  $\text{PM}_{2.5}$ ; la cual está constituida por 25 HAP, cuyas fuentes de emisión son procesos pirogénicos y combustión incompleta de combustibles como diésel y gasolina.



## ABSTRACT

It has been shown that atmospheric pollution by particulate matter (PM) is a determining factor in the development of cardiopulmonary diseases and lung cancer in exposed populations. Particles less than or equal to 2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) are of toxicological interest due to their chemical heterogeneity, their ability to reach the pulmonary alveoli and the interactions between the elements that constitute PM and the biological systems (additive, synergistic and antagonists). The organic elements associated with  $\text{PM}_{2.5}$  are hundreds, and it has been suggested that these compounds have a high capacity to cause oxidative stress and induce the metabolism of PAH through the P450 system when in contact with biological systems. Therefore, the aim of this study was to identify and quantify the PAH present in the extracted organic matter (EOM) of  $\text{PM}_{2.5}$  collected in Mexico City, infer their possible emission sources and evaluate the viability, the formation of reactive oxygen species (ROS) and induction of the enzymes of PAH metabolism: CYP1A1 and NQO1, and of the antioxidant enzymes SOD2, HO-1 and  $\gamma$ -GCS after exposure to EOM in the lung cell line A549. A sampling collection of  $\text{PM}_{2.5}$  was carried out in November 2017 at Cinvestav Zacatenco. Subsequently, the mass of EOM and the analysis of 38 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The identification of sources of PAH was based on correlations with criteria pollutants and using diagnostic ratios of PAH. The cytotoxic effect of EOM in A549 cells was assessed with the MTS and trypan blue assays at concentrations of 20, 40, 60 and 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EOM exposure. The generation of ROS was measured with the DCHF-DA assay after 1, 6, 12 and 24h post-exposure to EOM, finally the induction of CYP1A1, NQO1, SOD-2, HO-1 and  $\gamma$ -GCS was evaluated at 20 and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EOM by immunodetection analysis at 6 and 24 h post-exposure. Twenty-six PAH were identified. It is inferred that twelve PAH are emitted from primary sources through pyrogenic processes and incomplete combustion of fuels such as diesel and gasoline. The concentrations used in the cytotoxicity tests at 6, 12 and 24 h do not compromise cell viability, however induce the formation of ROS with all concentrations used, in addition these compounds induce the CYP1A1 metabolism enzyme and the antioxidant enzyme  $\gamma$ -GCS. Cell biomarkers such as ROS generation and the induction of metabolism enzymes and antioxidants are induced after exposure to EOM extracted from  $\text{PM}_{2.5}$ ; which in this study was constituted by 25 HAP, which emission sources are pyrogenic processes and incomplete combustion of fuels such as diesel and gasoline.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características físicas y químicas del material particulado, tiempos de residencia y transporte en la atmósfera. ....	3
Tabla 2. Compuestos orgánicos atmosféricos Enel PM <sub>2.5</sub> en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. ....	6
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de HAP. ....	7
Tabla 4. Marcadores de fuentes de emisión de HAP. ....	8
Tabla 5. Tasas de diagnóstico entre HAP para asignación de fuentes de emisión. ....	9
Tabla 6. Daños celulares de componentes de PM <sub>2.5</sub> . ....	10
Tabla 7. Promedio de la concentración mensual de contaminantes criterio reportados en Xalostocpor ka RAMA y límites máximos establecidos en normas nacionales. ....	45
Tabla 8. Correlación de Spearman entre HAP y contaminantes criterio, valores en rojo indican correlación estadísticamente significativa p <0.05. ....	47
Tabla 9. Tasas de diagnóstico entre HAP. ....	49
Tabla 10. Límites máximos establecidos para PM <sub>2.5</sub> en normas nacionales e internacionales. ....	61
Tabla 11. Clasificación del potencial carcinogénico de HAP. ....	62
Tabla 12. Ejemplos de la evaluación de la Citotoxicidad celular de MOE. ....	66

## LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria I. Iones característicos y tiempos de retención de HAP, HAP-deuterados (HAP-d) y HAP-fluorados. ....	92
Tabla suplementaria II. HAP cuantificados y estimados con los HAP-d. ....	94
Tabla suplementaria III. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas para el análisis de HAP. ....	95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Activación de las enzimas metabólicas y metabolismo general de los HAP.	15
Figura 2. Sistema antioxidante del GSH.	22
Figura 3. Ubicación del sitio de muestreo y colectores de alto volumen de PM <sub>2.5</sub> .	26
Figura 4. Distribución de las concentraciones de PM <sub>2.5</sub> y de la MOE en nov-dic de 2017 medidas en Cinvestav-Zacatenco.	36
Figura 5. Contribución individual de HAP identificados en MOE de PM <sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017 en Cinvestav-Zacatenco.	38
Figura 6. Variación semanal de HAP identificados en la MOE de PM <sub>2.5</sub> , A) Compuestos que presentan variaciones semanales en su concentración, A) Compuestos que no presentan variaciones semanales en su concentración	39
Figura 7. Promedio $\pm$ DE mensual de HAP identificados en PM <sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.	40
Figura 8. Concentración de HAP de 3 anillos identificados en la MOE de PM <sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.	42
Figura 9. Concentración de HAP de 3 anillos identificados en la MOE de PM <sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.	43
Figura 10. Concentración de HAP de 3 anillos identificados en la MOE de PM <sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.	44
Figura 11. Promedio de HAP identificados en la MOE de PM <sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.	53
Figura 12. Efecto de la exposición a MOE de PM <sub>2.5</sub> en la viabilidad de las células A549 utilizando el ensayo de MTS. Células A549 tratadas con 20, 40, 60 y 80 $\mu$ g de MOE por 6, 12 y 24 h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. No hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (p=0.999), Kruskal- Wallis	54
Figura 13. Efecto de la exposición a la MOE de PM <sub>2.5</sub> en la viabilidad de las células A549, mediante el ensayo de azul de tripano. Células A549 expuestas a 20 y 40 $\mu$ g/mL de MOE por 6 y 24 h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. No hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (p=0.293 a las 6h y p=0.999 a las 24h), Kruskal- Wallis.	54
Figura 14. Formación de especies reactivas de oxígeno por la MOE de PM <sub>2.5</sub> en A549. Ensayo de DCHF-DA. Células A549 expuestas con 20, 40, 60 y 80 $\mu$ g de MOE por 1, 6, 12 y 24 h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 4 experimentos independientes. La línea punteada indica los valores normalizados del control. (*) denota diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (p=0.001) utilizando una prueba de Kruskal- Wallis	55
Figura 15. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de CYP1A1 en células A549. <b>a)</b> y <b>b)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la	

expresión relativa de CYP1A1 a las 6h; <b>c) y d)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de CYP1A1 a las 24h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.	.....	57
Figura 16. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de NQO1 en células A549. <b>a) y b)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de NQO1 a las 6h; <b>c) y d)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de NQO1 a las 24h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.	.....	57
Figura 17. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de SOD-2 en células A549. <b>a) y b)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de SOD-2 a las 6h; <b>c) y d)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de SOD-2 a las 24h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.	.....	59
Figura 18. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de HO-1 en células A549. <b>a) y b)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de HO-1 a las 6h; <b>c) y d)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de HO-1 a las 24h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.	.....	59
Figura 19. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de $\gamma$ -GCS en células A549. <b>a) y b)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de $\gamma$ -GCS a las 6h; <b>c) y d)</b> Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de $\gamma$ -GCS a las 24h. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.	.....	60

## ABREVIATURAS (Cont.)

A549	línea celular de epitelio alveolar humano tipo II
ADN	ácido desoxirribonucleico
AEI	células epiteliales alveolares tipo I
AEII	células epiteliales alveolares tipo II
AhR	receptor aril hidrocarburo
AKR	aldo-ceto reductasa
AO	aerosol orgánico
B[A]P	benzo[a]pireno
B[B]F	benzo[b]fluoranteno
B[K]F	benzo[k]fluoranteno
B[GHI]P	benzo[ghi]perileno
cat	Catalasas
CEMAUF	celdas de extracción a microescala asistidas por ultrasonido con reflujó
CO	monóxido de carbono
Cys	Cisteína
Cu/Zn-SOD	superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre
DCF	Diclorofluoresceína
DCM	Diclorometano
DMEM	medio mínimo esencial fortificado
DMSO	Dimetilsulfoxido
DEP	partículas de emisión de vehículos a diésel
DCHF-DA	2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
EH	epóxido hidrolasa
EPA	Agencia de protección ambiental de estados unidos de america
EPOC	enfermedades pulmonares obstructivas crónicas
ERO	especies reactivas de oxígeno
GC/MS	cromatografía de gases-masas
γ-GCS	gamma-glutamilcisteínsintetasa
Gly	Glicina
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GSH sintetasa	glutación sintetasa
GSH/GSSG	cociente glutación reducido y glutación oxidado
GSSG	glutación oxidado
HAP	hidrocarburos aromáticos policíclicos
HAP-d	hidrocarburos aromáticos policíclicos deuterado
HAP-f	hidrocarburos aromáticos policíclicos fluorado
HO-1	hemoxigenasa 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
IARC	Agencia internacional de investigación de cáncer
I[123CD]P	indeno[1,2,3-cd]pireno
Koc	coeficiente de partición del carbono orgánico
Kow	coeficiente de partición octanol-agua
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
Lys	Lisina

m	Pendiente
$M_{\text{HAP-d}}$	masa del HAP-d, pg
$\mu\text{g /mL}$	microgramo por mililitro
Mn-SOD	superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NADP	dinucleótido de nicotinamín-adenín fosfato
NADPH	dinucleótido de nicotinamín-adenín fosfator educido
n-HAP:	nitro-hidrocarburos aromáticos policíclicos
NPOC	compuestos orgánicos no polares
NO	monóxido de nitrógeno
NO <sub>2</sub>	dióxido de nitrógeno
NO <sub>x</sub>	óxidos de nitrógeno
NQO1	NADPH-quinona oxido reductasa
o-HAP	oxi-hidrocarburos aromáticos policíclicos
O <sub>2</sub>	Oxigeno molecular
O <sub>3</sub>	Ozono
pg /mL	picogramo por mililitro
PM	material particulado
PM2.5	partículas de tamaño aerodinámico $\leq 2.5\mu\text{m}$ o finas
POA	aerosol orgánico primario
Pro	Prolina
RAMA	Red Automática de Monitoreo Atmosferico
ROH	radical hidroxilo
SDS	duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SOA	aerosol orgánico secundario
SOD	superóxido dismutasa
SO <sub>2</sub>	dióxido de azufre
S(y/x)	estimador de los errores aleatorios en la dirección “y”
TEF	factor equivalente tóxico, categoriza el efecto carcinogénico estimado de mezclas complejas de HAP
TPB	1,3,5-trifenilbenceno
TPx	tioredoxina peroxidasa
Trp	Triptófano
V <sub>aire</sub> :	Volumen de aire muestreado, m <sup>3</sup>
ZMCM	Zona Metropolitana de la Ciudad de México

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contaminación atmosférica

La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (2016) define el concepto de contaminación como “la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico” y considera al contaminante como “toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural” (LEGEEPA, 2016).

La contaminación atmosférica se genera por la presencia de sustancias en el aire ajenas a su composición natural y que se encuentran en concentraciones que impliquen molestias o riesgo para la salud de las personas, los seres vivos y daño a los materiales. Si bien la combustión incompleta de hidrocarburos es una de las principales fuentes de emisión de contaminantes a la atmósfera, la evaporación y la resuspensión, son otros procesos que introducen sustancias ajenas a la composición natural del aire (Martínez y Mera, 2004). Por siglos, la contaminación atmosférica en áreas urbanas e industriales se ha considerado peligrosa para la salud humana. Hoy en día se sabe que es carcinogénica para humanos (Lívalova *et al.*, 2018, Valavanidis *et al.*, 2008, IARC 2013).

La contaminación atmosférica deteriora la calidad de vida de las personas expuestas y daña a los ecosistemas (Arruti *et al.*, 2012). Estudios epidemiológicos indican que cuando se incrementan los niveles de contaminación atmosférica aumenta la mortalidad y las hospitalizaciones por funciones pulmonares adversas, la exacerbación de ataques de asma y las enfermedades respiratorias y cardíacas (Valavanidis *et al.*, 2008). La contaminación atmosférica por material particulado (PM, particulate matter) constituye el mayor problema de salud pública y es responsable de miles de muertes prematuras, así como de la pérdida de millones de dólares al año y debido a que sus efectos dependen en gran medida de su composición química es importante su medición, tanto espacial como temporalmente (Abbas *et al.*, 2018, Chow *et al.*, 2015).

## 1.2 Material particulado

El PM atmosférico es un término que se emplea para describir el material sólido y líquido suspendido en el aire, representa una mezcla compleja de partículas que no solo varía en tamaño y morfología; sino también en sus características físicas, químicas y biológicas. Su origen es diverso e impacta en la radiación solar, en la formación de nubes, en la química de la atmósfera y en la salud humana (Gutiérrez-Castillo *et al.*, 2006; Hinds, 1999; US-EPA, 2004).

El PM es de interés toxicológico por la heterogeneidad y complejidad de los elementos que la constituyen, así como, por los tipos de interacción entre estos compuestos y los sistemas biológicos (aditivas, sinérgicas y antagonistas) (Palacios *et al.*, 2016). En función de su diámetro aerodinámico (definido como el diámetro de una esfera con densidad estándar que se instala a la misma velocidad terminal que la partícula de interés) (Hinds, 1999; DeCarlo *et al.*, 2004), se clasifica en: partículas de diámetro aerodinámico  $\leq 10 \mu\text{m}$  (PM<sub>10</sub>), partículas de tamaño aerodinámico  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  o finas (PM<sub>2.5</sub>) y partículas de tamaño aerodinámico  $\leq 0.1 \mu\text{m}$  (PM<sub>0.1</sub>) o ultrafinas (Schwarze *et al.*, 2006, Martinelli *et al.*, 2013). Las características físicas y químicas, así como otras propiedades del material particulado se resumen en la Tabla 1.

Diferentes estudios han observado que el PM<sub>2.5</sub> representa del 28-80% de las partículas totales suspendidas en el aire y como su gran superficie de contacto le permite que una gran cantidad de compuestos con características tóxicas y nocivas sean absorbidas y adsorbidas en su superficie es importante su estudio, además estas partículas pueden alcanzar los alvéolos e ingresar al torrente sanguíneo comprometiendo la salud de las personas expuestas (Zhang *et al.*, 2016); a continuación se describirán algunas de sus características con mayor detenimiento.



**Tabla 1.** Características físicas y químicas del material particulado, tiempos de residencia y transporte en la atmósfera (EPA 2016)

Características	<i>PM<sub>0.1</sub></i>	<i>PM<sub>2.5</sub></i>	<i>PM<sub>10</sub></i>
<b>Solubilidad</b>	No están bien caracterizadas	Muy solubles e higroscópicas	Algunas son solubles
<b>Vida media atmosférica</b>	Minutos	Días a semanas	Minutos a horas
<b>Proceso de remoción</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecen a la moda de acumulación y se difunden en gotas de lluvia y otras superficies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de nubes y lluvia</li> <li>• Precipitación seca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precipitación seca</li> <li>• Eliminación por gotas de lluvia</li> </ul>
<b>Distancia de transporte</b>	De metros a pocos kilómetros	De cientos a miles de kilómetros	De un kilómetro a decenas de kilómetros (de cientos a miles de kilómetros en tormentas de arena)
<b>Composición</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato</li> <li>• Carbón elemental</li> <li>• Compuestos metálicos</li> <li>• Compuestos orgánicos con baja presión de vapor a temperatura ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato, nitrato, amonio, iones de hidrógeno</li> <li>• Carbón elemental</li> <li>• Gran variedad de compuestos orgánicos</li> <li>• Metales como Pb, Cd, V, Ni, Cu, Zn, Mn, Fe, etc.</li> <li>• Agua ligada a las partículas</li> <li>• Bacterias, virus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nitratos, cloruros, sulfatos de reacciones de HNO<sub>3</sub>, HCl y SO<sub>2</sub> con partículas gruesas.</li> <li>• Óxidos de elementos de la corteza terrestre (Si, Al, Ti, Fe).</li> <li>• CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, NaCl, sal marina</li> <li>• Bacterias, polen, moho, esporas de hongos, detritos de plantas y animales.</li> </ul>
<b>Proceso de formación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nucleación de gases atmosféricos, incluidos H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub> y algunos compuestos orgánicos</li> <li>• Condensación de gases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condensación de gases</li> <li>• Coagulación de partículas pequeñas</li> <li>• Reacción de gases en o sobre las partículas</li> <li>• Evaporación de neblina y gotas de agua en las que los gases se han disuelto y reaccionado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos mecánicos (prensado, molienda, abrasión, rompimiento de sólidos/gotas)</li> <li>• Evaporación de aerosoles</li> <li>• Suspensión de polvos</li> <li>• Reacción de gases en o sobre partículas</li> </ul>

### 1.2.1 Composición química de las PM<sub>2.5</sub>

La composición química de PM<sub>2.5</sub> depende de la estación del año, la región, las fuentes de emisión y las interacciones entre sus componentes orgánicos e inorgánicos (Yi-Yang *et al.*, 2017) y que la amplia superficie de contacto que presenta PM<sub>2.5</sub> permite que puedan adsorber y absorber iones, metales, organismos biológicos y compuestos orgánicos (Tabla 1). Debido a que la materia orgánica extraída (MOE) constituye del 17 a 40 % de la masa de las PM<sub>2.5</sub> en la Ciudad de México los compuestos orgánicos contenidos en la MOE podrían tener un papel determinante en su toxicidad, lo cual ya ha sido observado y reportado en estudios recientes (Lippman, 2009, Yi-Yang *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Compuestos orgánicos en PM<sub>2.5</sub>

Investigaciones previas han llegado a la conclusión de que aproximadamente la mitad del PM fino es aerosol orgánico (OA, organic aerosol) (Chow *et al.*, 2002, Salcedo *et al.*, 2006). El OA tiene numerosas fuentes y puede clasificarse como OA primario (POA, primary organic aerosol), material emitido directamente como partículas, o como OA secundario (SOA, secondary organic aerosol), especies formadas en la atmósfera a través de reacciones químicas (Hallquist *et al.*, 2009). Zheng y colaboradores (2000) reportaron que las principales familias de compuestos orgánicos identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub> son: ácidos grasos (46-80%), alifáticos, esteranos y hópanos (10-34%), alcanoles (4-21%), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (1-6%); nitro-HAP y oxi-HAP.

Los alcanos pueden ser emitidos por múltiples fuentes de actividades tanto biogénicas como antropogénicas [Gogou *et al.*, 1996; Kotianova *et al.*, 2008; Simoneit, 1989], los depósitos de combustibles fósiles muestran una mayor abundancia de alcanos C<sub>22</sub>-C<sub>25</sub>, mientras que los alcanos impares  $\geq$ C<sub>29</sub> son emitidos preferentemente por material orgánico vegetativo en descomposición. Los cuales ya han sido caracterizados en la Ciudad de México en diferentes estudios (Tabla 2). Los hopanos y esteranos llegan a la atmósfera por vapores formados de combustibles fósiles no quemados y aceites lubricantes [Cass, 1998; Schauer *et al.*, 2002; Sippula *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2008]. Los que se han identificado en PM<sub>2.5</sub> en la ciudad de México son presentados en la Tabla 2.

Los compuestos orgánicos varían en función de la ubicación, temporada, fuentes de emisión y procesos atmosféricos. Se estima que los compuestos orgánicos no polares en sitios urbanos representan del 10-50% de la masa del PM<sub>2.5</sub>. Esta fracción contiene miles de compuestos orgánicos, que varían desde moléculas orgánicas muy volátiles (por ejemplo, glioxal) hasta mezclas complejas de tipo húmico, estos compuestos se han estudiado ampliamente debido a su uso como indicadores de fuentes de emisión (Wang *et al.*, 2016).

Otros compuestos presentes son los HAP, estos son compuestos orgánicos semi-volátiles (Marr *et al.* 2006) formados por dos o más anillos aromáticos fusionados (Domingo y Nadal, 2015, Srogi 2007), ambientalmente persistentes en aire, suelo y agua (Abdel-Shafya y Mansour, 2016, Samburoba *et al.* 2017). Proviene de fuentes naturales como: erupciones volcánicas, organismos vegetales (procesos de descomposición, estrés hídrico o patológico e incendios forestales) y procesos de biosíntesis de algunos microorganismos, fitoplancton, algas y termitas; aunque se considera que las fuentes naturales no contribuyen significativamente a las emisiones totales de HAP (Kim. *et al.* 2013, Samburoba *et al.* 2017), y en contraste, los HAP se emiten mayoritariamente por la combustión incompleta de combustibles fósiles principalmente provenientes del parque vehicular (Tan *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2011).

Otros compuestos que se han identificado son los nitro-HAP y oxi-HAP. La familia de compuestos nitroaromáticos (nitro-HAP) son contaminantes ambientales ampliamente distribuidos que se encuentran en los gases de escape de los motores diésel, de gasolina y en la superficie del PM. La principal fuente de estos compuestos es la combustión incompleta de los compuestos presentes en el diésel. Sin embargo, también se forman en la atmósfera por reacciones de HAP con óxidos de nitrógeno. Por otro lado, los compuestos oxiaromáticos (oxi-HAP) se forman directamente de la combustión incompleta de materia orgánica, por reacciones fotoquímicas con oxidantes atmosféricos (O<sub>3</sub>, NO<sub>x</sub>, OH<sup>·</sup>), por fotodegradación y fotooxidación de los HAP (Albinet *et al.*, 2007, Bandowe *et al.*, 2014, Eiguren-Fernandez *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2011). Los derivados oxigenados se encuentran principalmente en partículas emitidas por vehículos (Albinet *et al.*, 2007, Burtscher y Schüepp 2012,). Los compuestos orgánicos identificados en la Ciudad de México se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Compuestos orgánicos atmosféricos en el PM<sub>2.5</sub> de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.**

FAMILIAS	COMPUESTOS	REFERENCIA	
✓ Ácidos grasos	C <sub>28</sub> - C <sub>36</sub> alcano C <sub>14</sub> - C <sub>40</sub> alcano Ácido pinónico	17α[H]- 21 β [H]-hopano 22S-homohopano 22R- homohopano	Murillo-Tovar <i>et al.</i> , (2010) Stone <i>et al.</i> , (2008)
✓ Alifáticos	17α[H]-22,29,30-	αββ-20R-C27 colestano	
✓ Esteranos	trisorhopano	αββ-20S-C27 colestano	
✓ Hopanos	17β[H]-21 α[H],30- norhopano	αββ-20R-C29 sitostano αββ-20S-C29 sitostano	
✓ HAP	naftaleno acenaftileno acenafteno fluoreno fenantreno antraceno fluoranteno pireno benzo[a]antraceno criseno trifenileno	benzo[b]fluoranteno benzo[j]fluoranteno benzo[k]fluoranteno benzo[e]pireno benzo[a]pireno perileno dibenzo[a,c]antraceno indeno[1,2,3-cd]pireno dibenzo[a,h]antraceno benzo[ghi]perileno	Amador- Muñoz <i>et al.</i> (2010, 2011, 2013) Gutiérrez-Castillo <i>et al.</i> (2006) Manzano-León <i>et al.</i> (2013) Murillo-Tovar <i>et al.</i> (2010, 2011, 2013) Stone <i>et al.</i> (2008)
✓ nitro-HAP	7,12-quinona 5-12- naftacenoquinona	3-nitrofluoranteno 9-nitroantraceno 9-nitrofenantreno	Manzano-León <i>et al.</i> (2013) Murillo-Tovar <i>et al.</i> (2010) Valle-Hernández <i>et al.</i> (2010)
✓ oxi-HAP	9, 10-dihidrobenczo [a] pireno 7[8H]-ona 1,4-naftoquinona 1,2-benzopirona 9H-fluoren-9-ona	3-nitrofenantreno 2-nitrofluoranteno 1-nitropireno 7-nitrobenzo[a]antraceno 6-nitrocriseno 7H-benzo[de]antraceno-7-ona	

nitro-HAP: nitro-hidrocarburos aromáticos policíclicos

oxi-HAP: oxi-hidrocarburos aromáticos policíclicos

### 1.2.3 Propiedades físicas y químicas de los HAP

Los HAP tienen altos puntos de fusión y de ebullición, bajas presiones de vapor y baja solubilidad en agua (Tabla 3). Las dos últimas propiedades tienden a disminuir al aumentar su masa molecular (Abdel-Shafya y Mansour, 2016; Masih *et al.* 2012). Los HAP se distribuyen ampliamente en la atmósfera antes de que se depositen en suelo, vegetación o agua (Kim *et al.*, 2013).

Los HAP con baja masa molecular (dos y tres anillos) se encuentran en la fase vapor, aquellos con tres y cuatro anillos, entre las fases gaseosa y particulada, mientras que los de cinco anillos o más están unidos a las partículas (Srogi, 2007). Los HAP reaccionan con otros contaminantes como el ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre produciendo dionas-HAP, nitro-HAP y sulfo-HAP que pueden ser más tóxicos que sus precursores (Feilberg *et al.* 2001, WHO 2000).

**Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los HAP**

Nombre	Numero de anillos	Masa Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg/L)	Presión de vapor (Pa/25°C)	TEF
Naftaleno	2	128.17	80	218	31	11	0.001
Acenaftileno	3	152.19	93	280	16	3.87	0.001
Acenafteno	3	154.21	93	279	38	3.07	0.001
Fluoreno	3	166.22	117	298	1.9	1.66	0.001
Fenantreno	3	178.23	99	340	1.1	1.6 x10 <sup>-1</sup>	0.001
Antraceno	3	178.23	217	340	0.045	8.6 x10 <sup>-4</sup>	<b>0.01</b>
Fluoranteno	4	202.25	108	384	0.26	8.6 x10 <sup>-4</sup>	0.001
Pireno	4	202.25	151	400	0.13	5 x10 <sup>-5</sup>	0.001
Benzo[ <i>a</i> ]antraceno	4	228.29	159	437	0.011	5.43 x10 <sup>-5</sup>	<b>0.1</b>
Criseno	4	228.29	258	448	0.0002	4 x10 <sup>-6</sup>	<b>0.01</b>
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno	5	252.31	168	481	0.002	5 x10 <sup>-7</sup>	<b>0.1</b>
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno	5	252.31	200	472	0.008	5.2 x10 <sup>-8</sup>	<b>0.1</b>
Benzo[ <i>a</i> ]pireno	5	252.31	177	495	0.004	6 x10 <sup>-8</sup>	<b>1</b>
dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno	5	278.35	271	524	0.001	1.3 x10 <sup>-8</sup>	<b>1</b>
Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno	6	276.33	280	500	0.003	1.3 x10 <sup>-7</sup>	<b>0.01</b>
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno	6	273.33	162	536	0.002	1.4 x10 <sup>-8</sup>	<b>0.1</b>

TEF: factor equivalente tóxico, se utiliza para categorizar el efecto carcinogénico estimado de mezclas complejas de HAP (Dat y Chang, 2017)

El destino y el transporte de los HAP liberados al ambiente dependen en gran medida de las propiedades físicas y químicas de los HAP individuales, como la solubilidad en agua, la presión de vapor, las constantes de la Ley de Henry, el coeficiente de partición octanol-agua (Kow). La presión de vapor y las constantes de la Ley de Henry indican el potencial del HAP para evaporarse cuando está en su forma pura o disuelto en agua. El valor de Kow refleja la distribución de un compuesto orgánico entre un medio orgánico y un acuoso, siendo un parámetro que se puede asociar con la bioconcentración en los tejidos grasos de los organismos (Abbas *et al.*, 2018; Abdel-Shafya y Mansour, 2016; Masih *et al.* 2012).

#### 1.2.4 Métodos de identificación de fuentes de los HAP

Actualmente no es suficiente con llevar a cabo la identificación y cuantificación de HAP, es importante inferir las fuentes de emisión de estos compuestos con la finalidad de conocer con mayor precisión sus fuentes de emisión. El análisis de correlación de los HAP con otros contaminantes es un método utilizado para determinar fuentes o procesos de formación de estos contaminantes. Por lo que, correlaciones consistentes de los HAP con ciertos contaminantes criterio ayuda a conocer si su fuente de emisión es primaria o secundaria. Otro método, es el uso de tasas de diagnóstico entre los HAP. Existen HAP específicos como indicadores de ciertos procesos, llamados marcadores o trazadores del origen (Tabla 4).

**Tabla 4. Marcadores de fuentes de emisión de HAP**

Marcador	Fuente de emisión	Referencia
Criseno y benzo[b]fluoranteno	Combustión de carbón	Ravindra <i>et al.</i> (2008)
Benzo[ghi]perileno, coroneno, fenantreno	Emisiones vehiculares	Ravindra <i>et al.</i> (2008)
Fenantreno, fluoranteno y pireno	Emisiones de diesel	Harrison <i>et al.</i> (1996)
Altas concentraciones de fluoreno, fluoranteno y pireno. Moderadas concentraciones de benzo[b]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno	Combustión de petróleo	Ravindra <i>et al.</i> (2008)

El uso de tasas se basa en la estabilidad termodinámica relativa de algunos isómeros de HAP. Un isómero está formado por reacciones químicas rápidas y exhibe una baja estabilidad. Estos isómeros generalmente se forman durante los procesos de combustión u otros tratamientos químicos (Biache *et al.*, 2014). Un isómero de estabilidad termodinámica más alta se forma durante procesos que toman períodos más largos, como diagénesis o catagénesis, resultando en materia orgánica fósil como petróleo o carbón, definida como fuentes petrogénicas que están enriquecidas con estos isómeros (Yunker *et al.*, 2002).

**Tabla 5. Tasas de diagnóstico entre HAP para la asignación de fuentes de emisión.**

Relación binaria	Valor	Fuente de emisión	Referencia
ΣBPH/ ΣAPH	<1	Pirogénico	Zhang <i>et al.</i> (2008)
	>1	Petrogénico	
I123cdP/(I123cdP + BghiP)	0.18	Gasolina	Ravindra <i>et al.</i> (2008)
	0.37-0.70	Diesel	Kavouras <i>et al.</i> (2001)
Fno/(Fno+Pir)	>0.5	Diesel	Ravindra <i>et al.</i> (2008)
	< 0.5	Gasolina	
Ant/(Ant+Fen)	>0.1	Petrogénico	Pies <i>et al.</i> (2008)
	<0.1	Pirogénico	Pies <i>et al.</i> (2008)
Flt/(Flt+Pir)	<0.4	Petrogénico	De La Torre-Roche <i>et al.</i> (2009)
	0.4-0.5	Combustible fósil	
	>0.5	Combustion de madera	
BaP/(BaP+Cris)	0.5	Diesel	Guo <i>et al.</i> (2003)
BbF/BkF	0.73	Gasolina	Ravindra <i>et al.</i> (2008)
	<0.5	Diesel	Park <i>et al.</i> (2002)
BaP/BghiP	0.5-0.6	Emisiones de tráfico	Park <i>et al.</i> (2002)
I123cdP/BghiP	< 0.4	Gasolina	Caricchia <i>et al.</i> (1999)
Flt/Pir	0.6	Emisiones vehiculares	Neilson, (1998)

ΣBPH – Suma de HAP de bajo peso molecular (<228 gmol<sup>-1</sup>), ΣAPH - Suma de HAP de alto peso molecular (>228 gmol<sup>-1</sup>), I123cdP – Indeno[1,2,3-cd]pireno, BghiP – Benzo[ghi]perileno, Fno – Fluoreno, Pir – Pireno, Ant – Antraceno, Fen – Fenantreno, BaP – Benzo[a]pireno, Cris – Criseno, BbF – Benzo[b]fluoranteno, BkF – Benzo[k]fluoranteno, Flt – Fluoranteno.

El perfil y la relación entre los isómeros de HAP se utiliza para determinar la contribución de las diferentes fuentes de emisión (Tabla 5) (Ravindra *et al.*, 2008). Las tasas de diagnóstico entre HAP pueden proporcionar una herramienta importante para la identificación de fuentes de emisión de contaminación. Aunque existe incertidumbre en el uso de estas tasas (Galarneau 2008, Katsoyiannis *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2005) debido a la inestabilidad de algunos compuestos, es una herramienta que se complementa con otros métodos para la identificación de fuentes de emisión. Entender el impacto de las fuentes particulares de emisión en los diferentes compartimentos ambientales es crucial para una correcta evaluación del riesgo y su gestión.

### 1.3 Efectos adversos a la salud por la exposición a PM<sub>2.5</sub>

Estudios epidemiológicos muestran que hay un impacto significativo de la exposición a PM<sub>2.5</sub> en la mortalidad y en la salud humana. Los efectos tóxicos de PM<sub>2.5</sub> son atribuidos a los compuestos químicos presentes en la superficie de la partícula (Tabla 6) incluyendo compuestos orgánicos como los HAP que han mostrado efectos genotóxicos y citotóxicos tanto en estudios *in vivo* como en *in vitro* (Livalova *et al.*, 2014, MohseniBandpi *et al.*, 2017, Valavandani *et al.*, 2008).

**Tabla 6. Daños celulares de componentes de PM<sub>2.5</sub>**

<b>Tipo</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Daño</b>
Componentes inorgánicos	Metales	Daño oxidante
	No metales	Reducción de la viabilidad
	Metales de transición	Daño oxidante y efectos inflamatorios
Componentes orgánicos	Carbón	Efectos inflamatorios
	HAP	Genotoxicidad
	Quinonas	Genotoxicidad y efectos inflamatorios

Fuente: Yi-Yang *et al.*, 2017.



La exposición a PM<sub>2.5</sub> puede incrementar la mortalidad entre personas con enfermedades crónicas degenerativas (diabetes mellitus), efectos principalmente en personas con enfermedades cardiopulmonares preexistentes, exacerbación de síntomas en personas con enfermedades pulmonares crónicas y agudas (bronquitis y efisema), incremento en la irritación de ojos y del sistema respiratorio, especialmente ataques de asma, infecciones respiratorias que incrementan las admisiones hospitalarias, además de incidencia de enfermedades pulmonares agudas y crónicas, cáncer de pulmón y arterosclerosis (Livalova *et al.*, 2014, MohseniBandpi *et al.*, 2017, Valavandani *et al.*, 2008).

### **1.3.1. Toxicocinética de PM<sub>2.5</sub>**

La toxicocinética de PM<sub>2.5</sub> es influenciada por factores intrínsecos (de la partícula) y extrínsecos (propios del individuo). Entre los primeros factores se encuentran los físicos e incluyen la forma, el tamaño, la densidad, la higroscopía y la carga de superficie de la partícula (Yi-Yang *et al.*, 2017). Además, su cinética y depósito también se afecta por factores biológicos del organismo que las respira como: el patrón de respiración (volumen y ritmo respiratorio), ruta de respiración (nasal u oral) y anatomía de las vías respiratorias (Debray *et al.*, 2010). El depósito de estas partículas en el tracto respiratorio ocurre principalmente mediante cinco mecanismos: impactación, sedimentación, difusión, intercepción y atracción electrostática (Heyder, 1986).

Siendo la sedimentación el mecanismo de depósito más importante de las partículas en las vías respiratorias de menor diámetro (bronquios, bronquiolos y espacio alveolar), el cual es un proceso influenciado directamente por la gravedad (Heyder, 1986). La eliminación de sustancias depositadas en el tracto respiratorio tiene lugar por una combinación de varios mecanismos, el mecanismo involucrado en la eliminación del material particulado depende de las propiedades físicas y fisicoquímicas de la partícula. En la región traqueo bronquial y en los alveolos, la actividad fagocítica de los macrófagos es un importante mecanismo de eliminación, las enzimas líticas de los macrófagos contribuyen a la disolución de las partículas, resultando en productos que pueden ser absorbidos directamente en la circulación por difusión; o bien las partículas fagocitadas por los macrófagos pueden pasar con estas células a la circulación linfática. El drenaje linfático de los alveolos representa un mecanismo

de eliminación que puede ser utilizado por macromoléculas, agregados macromoleculares y partículas de ciertas dimensiones (Mao *et al.*, 2005, Proud, 2008).

Por otro lado, la facilidad de absorción de los compuestos químicos que constituyen a PM a través del epitelio respiratorio está directamente relacionada con la solubilidad lipídica de sus constituyentes. Se ha observado que las membranas celulares de las células epiteliales alveolares son la mejor barrera de los compuestos orgánicos no polares (alifáticos, esteranos, hopanos), el ingreso de estos compuestos se ve limitada porque la unión estrecha de las membranas celulares y el diámetro de sus poros (6 a 10 Å) solo permiten el ingreso de moléculas solubles en agua evitando el ingreso de estos compuestos. En lo que respecta a moléculas liposolubles su ingreso al torrente sanguíneo está relacionado con el coeficiente de partición de los compuestos (Proud, 2008).

### **1.3.2. Características generales del epitelio alveolar**

El epitelio alveolar se compone de células tipo I y tipo II. Las células epiteliales alveolares tipo I (AEI) son células especializadas en el intercambio gaseoso que no tienen capacidad metabólica, las células epiteliales tipo II (AEII) son metabólicamente activas, desarrollan funciones fisiológicas y biológicas para sintetizar, secretar y reciclar todos los componentes del surfactante pulmonar (el cual controla la tensión superficial alveolar), regulan el transporte de iones de sodio trans-epitelial para la depuración del líquido alveolar, modulan el equilibrio de la coagulación y la fibrinólisis, contribuyendo así al sistema de defensa. No sólo guían a los neutrófilos en el espacio alveolar durante su migración; sino que también actúan como células efectoras mediante la interacción con células residentes y móviles, ya sea directamente por contacto célula-célula o indirectamente por interferencia ligando-receptor a través de la liberación de citocinas y factores de crecimiento e incluso bajo ciertas condiciones se diferencian en células AEI. Por tanto, una alteración en AEII compromete el correcto funcionamiento de todo el epitelio alveolar, los principales mecanismos propuestos para explicar los efectos tóxicos inducidos por MOE de PM<sub>2.5</sub> sobre los AEII son la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), estrés oxidante e inflamación, esto ha sido estudiado en diferentes líneas celulares, siendo la línea celular A549 ampliamente

utilizada para investigar su diferenciación, estructura, desarrollo, función y respuesta a xenobióticos (Mao *et al.*, 2005, Proud, 2008, Yi-Yang *et al.*, 2017).

### **1.3.3 Efectos adversos a la salud por la exposición a compuestos orgánicos presentes en el PM<sub>2.5</sub>**

Los compuestos orgánicos presentes en PM<sub>2.5</sub> son uno de los factores que más comprometen la salud, debido su alta capacidad pro-oxidativa (Yi-Yang *et al.*, 2017) y son los constituyentes principales de los aerosoles finos en la atmósfera de las zonas urbanas altamente industrializadas (Chai *et al.*, 2005, Cavanagh *et al.*, 2009, Hou *et al.*, 2006). En la Ciudad de México se han identificado 89 compuestos orgánicos en la MOE y estos constituyen del 17 al 40 % de la masa de PM<sub>2.5</sub> (Tabla 2). El PM con estas características potencialmente tóxicas, se deposita en la superficie del alveolo que es un medio acuoso rico en lípidos en el que los componentes solubles del PM pueden ser liberados, esto incluye compuestos orgánicos biológicamente activos, los cuales pueden actuar en las células epiteliales aun cuando el PM no ingrese a la célula. Por tanto, son más propensos a tener efectos adversos a corto y largo plazo, incluyendo el empeoramiento de los síntomas respiratorios y el desarrollo de enfermedades como: asma, inflamación respiratoria, disminución de las funciones pulmonares y cáncer. Otros efectos observados por la exposición a PM<sub>2.5</sub> son mayor morbimortalidad de enfermedades cardiorrespiratorias, neurológicas, reproductivas, disminución de la esperanza de vida de las personas; principalmente en aquellas que padecen enfermedades crónico-degenerativas, aunque estos no se han asociado a la fracción orgánica (Andre, 2005, Salcedo *et al.*, 2006, Valavandani *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2005).

Algunos HAP o mezclas de HAP tienen la capacidad de hacer progresar con mayor rapidez mutaciones que han sido producidos por otras sustancias. En este caso se dice que los HAP son promotores de tumores, o son pro-cancerígenos (Armstrong, 2004). Otros efectos que se han observado después de la exposición a HAP, es el aumento en el daño oxidativo y la secreción de citocinas en células epiteliales bronquiales humanas. Las células con las características de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica tienen menor capacidad para metabolizar los productos químicos orgánicos derivados de la contaminación atmosférica,

como el benzo[a]pireno, mostrando mayor sensibilidad a la formación de aductos de ADN (Abbas *et al.*, 2018). Las ERO formadas pueden causar efectos adversos en las células porque pueden reaccionar con bio-macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA (Palacio *et al.*, 2016), también se sabe que la exposición a altas concentraciones de ERO en los tejidos contribuye a la patogénesis de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular aberrante, hipertrofia y patogénesis de numerosas enfermedades crónicas, muchas de las cuales están asociadas con la destrucción y / o remodelación de tejidos (Shenberger *et al.*, 2002).

Existen informes clínicos de aumento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exhalados y urinarios en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria en adultos, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y en macrófagos alveolares recolectados de lactantes con displasia broncopulmonar (Loukides *et al.*, 1998; Mathru *et al.*, 1994). Se ha propuesto que los compuestos orgánicos son responsables del daño pulmonar agudo y de la muerte celular por apoptosis; la apoptosis epitelial puede conducir a desprendimiento de la mucosa bronquial, hiperreactividad bronquial y exacerbación del asma, además, el desprendimiento de cuerpos apoptóticos de las células moribundas puede tener el efecto de propagar e introducir los químicos a las células fagocíticas espectadoras, que intentan eliminar estos restos (Nel *et al.*, 2001). ); a continuación se describirán algunas de los mecanismos que permiten el ingreso y biotransformación de los HAP en las células con mayor detenimiento.

### **1.3.4 Mecanismos celulares activados por la exposición a la fracción orgánica del PM<sub>2.5</sub>**

#### **1.3.4.1 Ingreso de HAP a las células**

Uno de los grupos orgánicos más importantes de la MOE de las PM<sub>2.5</sub> en cuanto a riesgo para la salud son los compuestos poliaromáticos, que incluye HAP, oxi-HAP, nitro-HAP, amino-HAP, compuestos aromáticos heterocíclicos, entre otros (Ling-Yang *et al.*, 2017). En general, los HAP son compuestos lipofílicos que pueden cruzar fácilmente las membranas celulares a través de la difusión pasiva después de la inhalación. Una vez en el ambiente intracelular se activan procesos de transformación de estos compuestos para su detoxificación o eliminación, siendo el más importante el metabolismo de HAP (Farkas *et al.*, 2004).

### 1.3.4.2 Metabolismo de los HAP

La transformación de los HAP involucra múltiples enzimas metabólicas, se conocen 3 vías principales: la vía de citocromos (CYP1A1/1B1), la vía CYP peroxidasa y la vía aldo-ceto reductasa (vía AKR). Se sabe que la formación de metabolitos (diolepóxidos, cationes y radicales) se lleva a cabo principalmente por los citocromos.

Los citocromos participan en la biotransformación de xenobióticos y se consideran enzimas de biotransformación de fase I, están constituidos por los genes CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, ampliamente relacionados con la biotransformación de HAP a través de reacciones de oxidación, siendo el CYP1A1 quien constituye la mayor fracción de citocromo extrahepático que se expresa principalmente en pulmón, riñón y placenta (Pelkonen *et al.*, 1998).

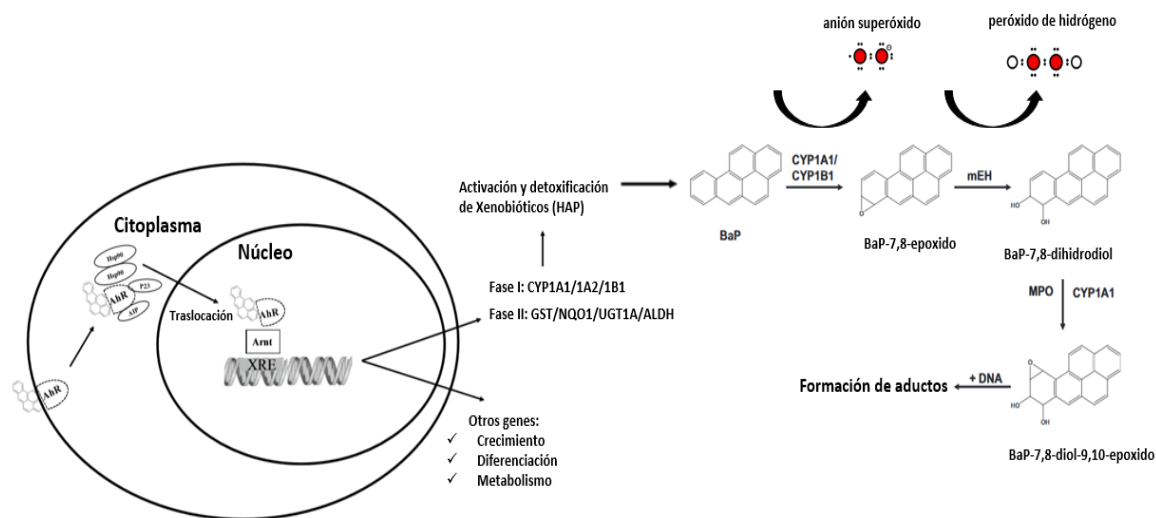


Fig. 1. Activación de enzimas metabólicas y metabolismo general de los HAP (Adaptado de Abbas *et al.*).

El CYP1A1 está asociado al metabolismo de los HAP en células de pulmón humano, se sugiere que el humo de cigarro tiene HAP y se observan altos niveles de CYP1A1 en los pulmones de fumadores (Ionnides, 1996). Los CYP1A1 en el sistema respiratorio biotransforman a los HAP a través de reacciones de oxidación, para originar compuestos más hidrosolubles que se puedan eliminar del organismo, sin embargo, como parte de este proceso

de detoxificación realizado por CYP1A1 se forman ERO (García, 2008; Livalova *et al.*, 2014; Min *et al.*, 2011).

La activación del sistema P450 inicia cuando los HAP interactúan con el receptor de hidrocarburos aromaticos (AhR) activando posteriormente al elemento de respuesta a xenobióticos que activa a factores de transcripción que regula la expresión de genes tales como el citocromo CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, incluyendo otras enzimas de biotransformación de fase II como la glutatión transferasa y NQO1 (Figura 1) (Abbas *et al.*, 2018). Estas enzimas pueden metabolizar a los HAP en el ciclo catalítico de CYP1A1, después de aceptar al primer electrón el CYP1A1 ferroso une una molécula de oxígeno transformándose en un oxicomplejo de CYP1A1, el cual se reduce con la entrada de otro electrón para formar un peroxi-complejo, que con la entrada de protones, puede dar lugar al rompimiento heterolítico del O-O para obtener una molécula de H<sub>2</sub>O, mientras que en el grupo hemo se produce un doble enlace entre el hierro (Fe) y el oxígeno restante (Zangar *et al.*, 2004).

Posteriormente el grupo hemo activado (unido al átomo de oxígeno) se inserta en la molécula del sustrato para liberar finalmente al radical hidroxilo (ROH) y regresar a su estado inicial (Zangar *et al.*, 2004). Además de la generación de ERO, la mayoría de los compuestos padres de los HAP que entran en las células pulmonares se consideran mutagénicos y procarcinogénicos, porque es su transformación a metabolitos los que contribuyen al desarrollo de mutaciones que pueden activar oncogenes y desarrollar cancer (Ling-Yang *et al.*, 2017).

#### **1.3.4.3 Generación intracelular de ERO**

El término especies reactivas de oxígeno por sus siglas ERO, abarca a los radicales libres (átomos, iones, moléculas con uno o más electrones desapareados en el orbital más externo) y a las moléculas derivadas del oxígeno con gran capacidad reactiva. Las ERO se forman constantemente en el organismo para cumplir eventos fisiológicos, como la fosforilación oxidativa, el sistema enzimático P450 y la reducción de ribonucleótidos (Milosevic *et al.*, 1999).

La generación equilibrada de radicales libres en el medio celular está controlada por el sistema de defensa antioxidante. El equilibrio que se establece entre los sistemas oxidantes y antioxidantes constituyen el elemento básico de la defensa antimicrobiana, antitumoral, en la fisiología normal, en los reguladores metabólicos, en la activación e inactivación de biomoléculas, en la transducción de señales, en la obtención de energía metabólica y en el recambio y la activación celular. Sin embargo, dadas las características cinéticas de este equilibrio, la rapidez y persistencia de ERO como los factores pro-oxidantes puede ocasionar que la capacidad antioxidante celular sea superada (García, 2008; Milosevic *et al.*, 1999).

Estudios previos han mostrado que los componentes orgánicos de PM<sub>2.5</sub> pueden inducir la producción de radicales libres para oxidar las células del pulmón, siendo la principal causa de lesiones (Kelly, 2003; Donaldson y Beswick, 1996). El primer mecanismo que conduce a la formación de ERO es la liberación del radical superóxido debido al decaimiento del complejo Fe (II), este radical al protonarse origina peróxido de hidrógeno, otra ERO. El segundo mecanismo productor de ERO es la protonación de peroxi-CYP1A1 con la formación de peróxido de hidrógeno (Zangar *et al.*, 2004).

Un último mecanismo requiere la adición de más de 2 electrones actuando sobre el oxenoido, lo que causa la liberación del segundo átomo de oxígeno en forma de una molécula de agua. La producción de ERO es un resultado inevitable del consumo de NADPH por CYP1A1 microsomal en presencia y ausencia de sustratos exógenos y endógenos (fármacos, contaminantes ambientales como partículas y otros xenobióticos adheridos en su superficie, como pueden ser los HAP). Sin embargo, la presencia o ausencia de las vías generadoras de ROS, depende de muchas condiciones, tales como el tipo de sustrato, el pH, la fuerza iónica, y de concentración de oxígeno entre otros factores (Zangar *et al.*, 2004).

Como se indica que los compuestos orgánicos inducen principalmente al anión superóxido (ERO radicales) y peróxido de hidrógeno (ERO no radicales) se profundizara aún más al respecto a continuación. El anión superóxido es un monoradical con carga negativa que resulta de la reducción monovalente del oxígeno molecular en procesos como la fagocitosis

por acción de la NADPH oxidasa, la respiración celular por la citocromo oxidasa mitocondrial, en el metabolismo de xenobióticos por el sistema P450, y en la isquemia reperusión por la xantina oxidasa. Este anión tiene un tiempo de vida media de milisegundos y es transformado por el superóxido dismutasa (SOD) en  $H_2O_2$  con una constante de reacción muy rápida (Gracy *et al.*, 1999).

Por otro lado, el peróxido de hidrogeno se forma *in vivo* por la transformación espontánea o enzimática del  $O_2$  por la SOD, glucosa oxidasa, diaminoácido oxidasa y otras oxidasas). A bajas concentraciones de  $H_2O_2$  es poco reactivo; sin embargo, a concentraciones altas puede interactuar con los sistemas de generación de energía de las células e inactivarlas, como el gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa por ejemplo, además el  $H_2O_2$  es capaz de oxidar grupos tioles de proteínas. Su efecto más nocivo es la formación de  $\bullet OH$  catalizada por metales de transición. A nivel fisiológico el  $H_2O_2$  es removido por la acción de la catalasa (cat) y peroxidasa. Algunos cetoácidos como el piruvato, aunque reaccionan muy lentamente, alcanzan concentraciones fisiológicas capaces de dar protección *in vivo* (García, 2008; Min *et al.*, 2011).

Se sabe que las células epiteliales de las vías respiratorias sirven como barrera natural, evitando la entrada de los xenobióticos inhalados en los tejidos, la acumulación excesiva de ERO generadas por los HAP disminuye los niveles de proteínas de unión, lo que resulta en una mayor interrupción de la barrera en el epitelio pulmonar. Una barrera epitelial permeable puede favorecer el ingreso de patógenos y xenobióticos inhalados en los tejidos, siendo la permeabilidad de la membrana uno de los primeros signos de enfermedad pulmonar, lo cual ya se ha asociado a la exposición a  $PM_{2.5}$  (Farkas *et al.*, 2004, Ling-Yang *et al.*, 2017). ERO como el anión superóxido, el  $H_2O_2$  y el radical hidroxilo juegan un papel muy importante en el efecto genotóxico de los compuestos orgánicos (Min *et al.*, 2011); la exposición a concentraciones subletales de  $H_2O_2$  alteran la síntesis de proteínas y estos cambios comprometen la proliferación y morfología celular, la exposición a altas concentraciones de ERO en los tejidos contribuye a la patogénesis de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular aberrante, hipertrofia y patogénesis de numerosas enfermedades



crónicas, muchas de las cuales están asociadas con la destrucción y / o remodelación de tejidos (Shenberger *et al.*, 2002).

#### **1.3.4.4 Estrés oxidante y el sistema de defensa antioxidante**

El estrés oxidante se define como un evento celular en el que se altera la homeostasis oxidoreducción debido a un aumento en la velocidad de generación de ERO y/o una disminución de los sistemas de defensa antioxidante. En esta situación de estrés oxidativo, el incremento en la cantidad de los radicales libres, puede desencadenar daño oxidativo en diferentes biomoléculas incluyendo peroxidación de lípidos, disfunción de proteínas, daño al DNA y si es muy extenso puede llevar a la muerte celular y así contribuir a desencadenar enfermedades respiratorias, cardiovasculares o cáncer (Risom *et al.*, 2005).

Los sistemas de defensa antioxidante que controlan las cantidades de ROS en las células pueden ser de tipo enzimático y no enzimático (Molina, 2003). El sistema antioxidante enzimático está conformado por una serie de enzimas que convierten las ERO en moléculas menos perjudiciales antes de que reaccionen con estructuras celulares vitales, o simplemente evitan su producción para tratar de minimizar el daño oxidativo. En este grupo destacan las superóxido dismutasas (SOD, Mn-SOD, Cu/Zn SOD), peroxidasas, catalasas, glutaredoxina, tioredoxina, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Imlay 2003).

En el humano se han identificado tres tipos de SOD, la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular; la Mn-SOD es un homotetrámero de 96kDa que contiene un átomo de Mn en cada subunidad, el átomo metálico cambia su oxidación desde Mn (III) a Mn (II), volviendo nuevamente a Mn (III), durante los 2 pasos que constituyen la reacción de dismutación del radical anión superóxido. El producto de la acción de SOD es el peróxido de hidrogeno, el cual es altamente toxico, pero puede ser rápidamente removido en células procariontes esto implica la acción de dos familias diferentes de enzimas, la glutatión peroxidasa y las catalasas, ambas actúan sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduciéndolo a oxígeno y agua (Imlay, 2003).

Por otro lado, el sistema antioxidante no enzimático está conformado por compuestos de bajo peso molecular que reaccionan directamente con las ROS, lo que las desactiva y evita su reacción en cadena. Estos compuestos son conocidos como apagadores, entre ellos se encuentra la vitamina A, C, E, B<sub>6</sub>, ácido úrico, metalotionina, albúmina, transferrina, ferritina, mioglobina, bilirrubina, carotenoides y glutatión (GSH) (Halliwell y Gutteridge, 1990; Cardoso *et al.*, 1998). El retinol o vitamina A es capaz de inactivar a los ROS con los dobles enlaces conjugados de la cadena insaturada, puede actuar como donante o aceptor de electrones bajo determinadas condiciones (Olson, 1996).

La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol se almacena principalmente en tejido adiposo, por lo que se encuentra asociada a la membrana celular protegiéndola de las ERO, al reaccionar con los radicales libres, se oxida a  $\alpha$ -tocoferol quinona, esta se regenera a  $\alpha$ -tocoferol con la posible intervención del ácido ascórbico y del GSH (Sinha *et al.*, 2002). La vitamina C o ácido ascórbico es un antioxidante soluble en agua (hidrosoluble), figura en la primera línea en la defensa antioxidante del plasma; es un poderoso inhibidor de la oxidación de los lípidos por radicales superóxido e hidroxilo principalmente. Participan en la generación de la vitamina E y se ha reportado como protector del tabaco (García, 2008).

El daño causado por ERO al ADN, proteínas y lípidos está involucrado en efectos adversos sobre la salud, además un desequilibrio en el estado redox de la célula desencadenan respuestas inflamatorias mediante la activación de factores de transcripción que aumentan la síntesis de citocinas proinflamatorias; estas citocinas pueden favorecer las respuestas inflamatorias locales y sistémicas y contribuir al desarrollo de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) y asma, también se ha observado que hay una depleción de enzimas antioxidantes (HO-1, glutatión, SOD-1) por las ERO favoreciendo el desarrollo de EPOC (Yang *et al.*, 2017).

Ya se ha demostrado que la MOE de partículas de emisión de vehículos a diésel (DEP) pueden inducir efectos proinflamatorios en el pulmón debido a su capacidad de causar estrés oxidante (Saldiva *et al.*, 2002; Kumayai *et al.*, 1996). Por otro lado, las quinonas presentes en PM<sub>2.5</sub> pueden actuar como catalizadores y producir ERO directamente por sus ciclos de

oxidación reducción (o redox) catalizando la reducción de oxígeno molecular a anión superóxido e hidroxilo, este comportamiento se ha observado en células broncoepiteliales expuestas a DEP y a extractos orgánicos de las DEP (Monks *et al.*, 1992; Halliwell y Gutteridge, 1990).

Se ha observado que los compuestos presentes en las fracciones aromáticas y polares (HAP y quinonas) de DEP simulan los efectos pro-oxidantes de las partículas en las células epiteliales bronquiales y en macrófagos (Li *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2000). Además, experimentos en animales y humanos confirman que las DEP y HAP derivados de DEP promueven la inflamación alérgica de las vías respiratorias y la inducción de CYP1A1 en los pulmones de ratones expuestos (Tokanu *et al.*, 2002; Miyabara *et al.*, 1998; Tsien *et al.*, 1997).

#### Sistema antioxidante del glutatión

El glutatión es un tripéptido constituido por 3 aminoácidos, el ácido glutámico, la cisteína y la glicina, que contiene un enlace  $\gamma$  peptídico entre el glutamato y la cisteína para prevenir que el enlace sea hidrolizado, es un protector celular sumamente importante debido a que el grupo tiol en su porción de cisteína es un agente reductor, por lo que un ligero desplazamiento del equilibrio hacia la forma oxidada afecta drásticamente el estado de óxido reducción normal indispensable para la sobrevivencia celular (Anderson 1998; Molina 2003; Robinson, 1994).

El GSH se utiliza como cofactor por diversas enzimas como las peroxidasas para desintoxicar peróxido generados del ataque de ERO en moléculas biológicas: transhidrogenasas para reducir centros oxidados en el ADN, proteínas y otras biomoléculas y la glutatión-S-transferasa (GST) para conjugar con GSH sustancias endógenas (Strange *et al.*, 2000). La concentración de GSH puede ser disminuida por conjugación directa o mediada enzimáticamente con radicales libres e indirectamente por la adición de inhibidores a su biosíntesis o regeneración a partir de GSSG (Anderson, 1998). Entre los oxidantes que pueden agotar al GSH están los radicales libres generados en respuesta a la exposición de

agentes físicos (luz ultravioleta, temperatura), xenobióticos, infecciones y deficiencias dietéticas (Klaunig *et al.*, 1998).

La síntesis de GSH ocurre en el citoplasma y es una de las principales vías de desintoxicación celular (Figura 2). Primero la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral de glutamato por la acción de la enzima gamma-glutamil cisteín sintetasa. La acumulación excesiva de GSH actúa inhibiendo esta enzima y de esta manera se controla la síntesis de GSH. La segunda reacción para la síntesis de GSH enlaza a la gamma glutamil cisteína con la glicina para generar GSH, esta reacción es catalizada por la enzima GSH sintetasa (Anderson 1998; Molina 2003).

Una vez que el GSH ha sido oxidado a GSSG, el reciclaje de GSSG a GSH se lleva a cabo por la enzima glutatión reductasa (GR). Esta enzima emplea como fuente de electrones la coenzima NADPH, la cual proviene principalmente de la ruta de las pentosas fosfato. El GSH también contribuye al reciclaje de otros antioxidantes que han sido oxidados como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y los carotenoides (McNee, 1999; Strange y Jones 2000; Hunter, 2001).

La familia de GSH cataliza una gran variedad de compuestos xenobióticos, electrofílicos y carcinógenos mediante la conjugación del GSH originando el primer paso para la formación del ácido mercapturico (Mates, 1999). La figura 2 muestra el sistema antioxidante del GSH (McNee, 1999) donde la GPx ya sea citosólica o mitocondrial reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el  $H_2O_2$  a expensas del GSH (Mates, 1999). Una manera de evaluar el estatus del GSH en las células es por medio de la gamma glutamil cisteína, esto permitiría analizar de forma indirecta el sistema antioxidante del glutatión (García, 2008).

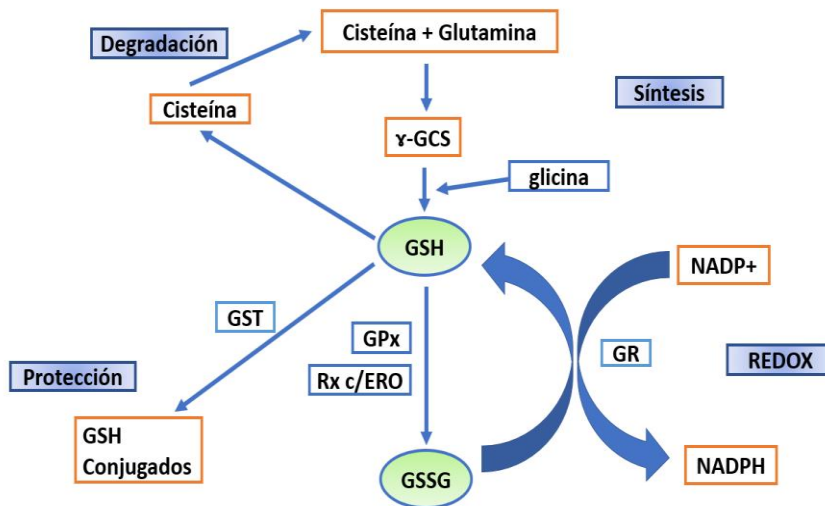


Fig. 2. Sistema antioxidante del GSH (McNee 1998)

Como se mencionó anteriormente, los compuestos orgánicos presentes en  $PM_{2.5}$  son uno de los factores que más comprometen la salud, debido su alta capacidad pro-oxidativa (Yi-Yang *et al.*, 2017) y como en la Ciudad de México se han identificado 89 compuestos orgánicos en la MOE y estos constituyen del 17 al 40 % de la masa de  $PM_{2.5}$  (Tabla 2) es prioritario llevar a cabo la identificación de los compuestos que la constituyen y la evaluación de sus efectos citotóxicos. Este trabajo confirma la presencia de HAP en la MOE de  $PM_{2.5}$ ; que la MOE representa el 15.5% de  $PM_{2.5}$  y que las fuentes de emisión más probables son procesos pirogénicos, emisiones vehiculares, combustión incompleta de gasolina y diésel. También se corrobora la activación metabólica de células epiteliales alveolares y la inducción de la formación de ERO, además se observó que el desequilibrio en el sistema redox producido por la MOE es suficiente para llevar a cabo la activación del sistema antioxidante. Por tanto, este proyecto integrativo permite unificar la información de la composición química analítica de los compuestos orgánicos de  $PM_{2.5}$  con la parte toxicológica.

#### **1.4 Justificación**

El PM en el aire es de interés toxicológico por la heterogeneidad y complejidad de los elementos que la constituyen, así como, por los tipos de interacción entre estos compuestos y los sistemas biológicos. Estudios epidemiológicos han reportado que hay un impacto significativo de la exposición a PM<sub>2.5</sub> en la morbimortalidad por enfermedades respiratorias, cardiorespiratorias, neurológicas, reproductivas y cáncer; disminuyendo la esperanza de vida de las personas expuestas a este contaminante, principalmente de las personas que presentan enfermedades crónicas. Además, investigaciones realizadas sugieren que la composición química de PM<sub>2.5</sub> tienen un papel determinante en los efectos adversos a la salud debido a que los compuestos orgánicos constituyen del 17 a 40% de su masa, por lo que estos podrían ser responsables de su toxicidad. También, se ha descrito que la MOE de PM<sub>2.5</sub> tiene compuestos que poseen una alta capacidad de inducir las enzimas del metabolismo, favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno e incluso inducir algunas enzimas antioxidantes. Se infiere que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) podrían ser algunos de los compuestos responsables de los efectos antes mencionados. Debido a lo anterior en el presente proyecto se consideró necesario llevar a cabo la identificación de los HAP presentes en la MOE, analizar su origen y evaluar su capacidad de inducir citotoxicidad células representativas del tracto respiratorio ya que este representa el mayor sitio de exposición a PM<sub>2.5</sub>, por lo que se utilizó la línea celular de epitelio alveolar humano A549.

#### **1.5 Hipótesis**

La MOE de PM<sub>2.5</sub> contiene compuestos provenientes de combustión incompleta que poseen una alta capacidad de inducir a las enzimas del metabolismo CYP1A1 y NQO1, favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno e inducir las enzimas antioxidantes SOD2, HO-1 y γ-GCS en la línea celular A549.

## **1.6 Objetivo general**

Identificar y cuantificar los HAP presentes en la MOE, inferir sus posibles fuentes de emisión y evaluar la viabilidad, la formación de especies reactivas de oxígeno e inducción de las enzimas del metabolismo CYP1A1 y NQO1; y de las antioxidantes SOD2, HO-1 y  $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub> en la línea celular A549.

### **1.6.1 Objetivos Particulares**

- ✓ Colectar las PM<sub>2.5</sub> en noviembre de 2017 en la zona norte de la Ciudad de México.
- ✓ Determinar la MOE en PM<sub>2.5</sub>.
- ✓ Identificar y cuantificar los HAP en la MOE de PM<sub>2.5</sub>.
- ✓ Analizar y proponer fuentes de emisión de HAP por medio de correlaciones con contaminantes criterio e índices de tasas.
- ✓ Analizar el efecto de la MOE en la viabilidad y en la formación de especies reactivas de oxígeno en la línea celular A549.
- ✓ Evaluar los niveles de las enzimas del metabolismo CYP1A1 y NQO1; y de las antioxidantes SOD2, HO-1 y  $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub> en la línea celular A549.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Determinación de la MOE y de los HAP en $PM_{2.5}$

#### 2.1.1 Acondicionamiento de filtros para la colecta de los HAP.

Se utilizaron filtros de cuarzo cubiertos con teflón para colectar  $PM_{2.5}$ . Los filtros fueron acondicionados previamente en una mufla (CISA) durante 24 horas a 105 °C (temperatura mínima). El objetivo del acondicionamiento fue para compuestos orgánicos presentes en los filtros. Posteriormente los filtros se cubrieron con papel aluminio y se llevaron hasta el lugar del muestreo.

#### 2.1.2 Colecta de $PM_{2.5}$ en el norte de la Ciudad de México

La colecta de muestras se llevó a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad académica Zacatenco, ubicado al norte de la Ciudad de México (Figura 3).

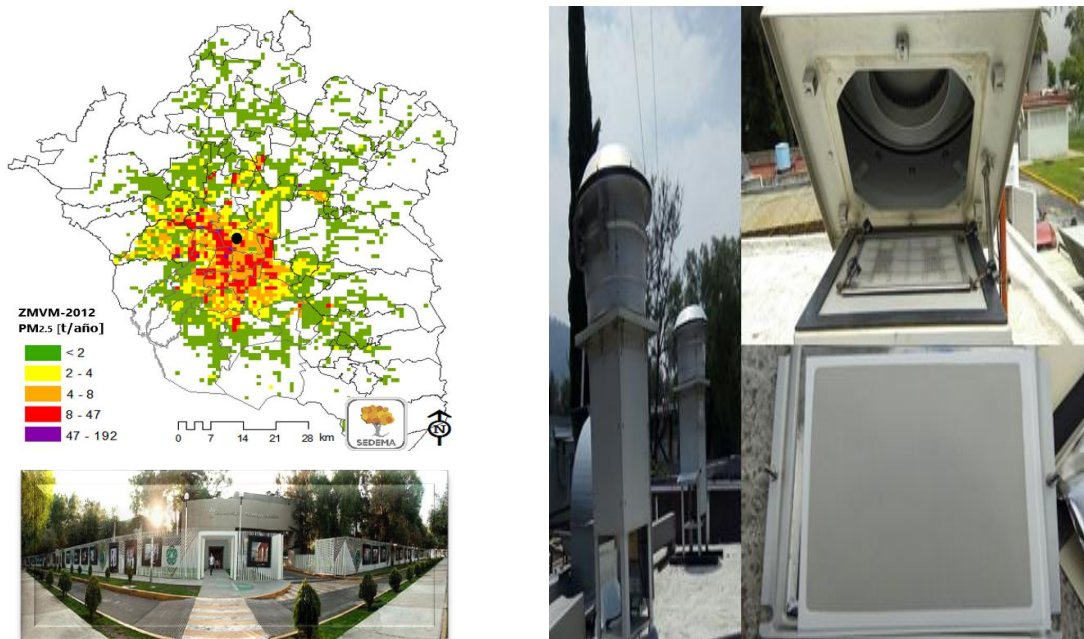


Figura 3. Ubicación del sitio de muestreo y colectores de alto volumen de  $PM_{2.5}$



La colecta se realizó de lunes a viernes del 6 de noviembre al 4 de diciembre de 2017. Se utilizaron colectores de alto volumen (HighVol, con flujo de 1.3 L/m<sup>3</sup>) (Figura 3) durante 24 h de 8:00am a 8:00am del día siguiente.

Los filtros blancos de campo se tomaron cada 15 días. El material particulado se colectó en los filtros acondicionados. Una vez realizada la colecta, los filtros se doblaron a la mitad, se cubrieron con papel aluminio para evitar su fotodegradación y se almacenaron a -20 °C para evitar su evaporación hasta el momento de su tratamiento. En total se colectaron 22 filtros y 2 blancos.

### **2.1.3 Extracción y determinación de los HAP contenidos en la MOE de PM<sub>2.5</sub>**

#### **2.1.3.1 Determinación de HAP en aire**

##### **2.1.3.1.1 Fortificación de filtros con HAP-deuterados (HAP-d)**

Se fortifico 1/10 de cada uno de los filtros con PM<sub>2.5</sub> (n=22) con una disolución isotópica de 16 HAP-d (Tabla suplementaría I) contenidos en una alícuota de 100 µL. La masa de HAP-d adicionada fue 100 ng. Esta disolución se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de 16 HAP y la estimación de otros 16 HAP (Tabla suplementaría II). La fortificación se realizó 24 h previas a la extracción almacenando los filtros fortificados a -20 °C.

##### **2.1.3.1.2 Procedimiento de extracción de MOE**

Los HAP generalmente se encuentran como mezclas complejas en el material particulado (Domingo y Nadal, 2015). Por tanto, para entender los efectos de la exposición a los HAP presentes en su superficie, es necesario contar con métodos de muestreo y análisis confiables que permitan realizar su especiación química de una manera rápida, eficiente, poco contaminante, altamente sensible y sin interferencias (Elmes y Gasparon, 2017). Es por ello, que se decidió utilizar en este proyecto la celda de extracción a microescala asistida por ultrasonido con reflujo (CEMAUF) y la respectiva cuantificación por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas utilizando el método de dilución isotópica.

La extracción de los HAP en PM<sub>2.5</sub> se llevó a cabo en celdas de extracción a microescala asistida por ultrasonido con reflujo (CEMAUF), Patente No. 325624 (Amador-Muñoz *et al.*, 2014a). Se adicionó la cantidad de disolvente necesario para cubrir los filtros (1/10= 3 mL de DCM y 8/10= 15mL). Las celdas con los filtros y el disolvente se colocaron dentro de un baño de ultrasonido (Figura 5) (Elmasonic P). Las condiciones de extracción fueron 30 °C, 15 min, 40% de potencia a 37 KHz, por duplicado (condiciones de extracción validadas por Diosdado-Martínez, 2018).

Una vez terminado el procedimiento de extracción, los extractos orgánicos se filtraron a través de un acrodisco (PTFE 0.2 µm, 13 mm de diámetro), con la ayuda de una cámara de vacío visiprep SUPELCO. Los extractos se colectaron en un vial de 20 mL. Finalmente, los extractos se redujeron con un arrastre gentil de nitrógeno, la pérdida de MOE en este procedimiento se controló utilizando un sistema acoplado de múltiples deflexiones que atrapa a la materia orgánica arrastrada por la corriente de nitrógeno, Patente 325625 (Amador-Muñoz *et al.*, 2014b). La materia orgánica adsorbida a las paredes internas del capilar con deflexiones se recuperó con un volumen mínimo de diclorometano. Todos los extractos se concentraron hasta obtener un volumen de 1mL.

Para el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de gases se adicionaron 80 µL de la MOE extraída y 20 µL de una disolución de HAP fluorado (HAP-f) como estándar interno (Anexo I). Los viales se etiquetaron y almacenaron hasta su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Este procedimiento se repitió con los blancos (n=4).

#### **2.1.3.1.3. Cálculo de la eficiencia del método analítico para la recuperación de HAP-d contenidos en la MOE de PM<sub>2.5</sub>**

Para determinar la eficiencia de la extracción de los HAP, se usó el método por dilución isotópica. Para ello, se utilizaron las áreas relativas de 16 HAP-d, entre los HAP fluorados utilizados como estándares internos. La eficiencia se calculó dividiendo el área relativa de los HAP-d entre la de los HAP-f en la disolución de referencia (ecuación 1).

Las áreas relativas se obtuvieron con la ecuación 1.

$$A_r = \frac{A_x}{A_{EI}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

$A_r$  = Área relativa del HAP-d/HAP-fluorado, adimensional

$A_x$  = Área del HAP, cuentas

$A_{EI}$  = Área de estándar interno (HAP-f), cuentas

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{A_{r \text{ fort}}}{A_{r \text{ ref}}} \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde:

$A_{r \text{ fort}}$  – Área relativa del HAP-d/HAP-fluorado de la muestra fortificada y extraída.

$A_{r \text{ ref}}$  – Área relativa del HAP-d/HAP-fluorado de la disolución de referencia.

Se calcularon los coeficientes de variación de las áreas relativas de cada HAP y HAP-d. Para descartar falsos positivos o errores en el cuantitativo, se estableció un coeficiente de variación  $\leq 15\%$ .

#### **2.1.3.1.4 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

Se analizaron 32 HAP y se inyectaron un total de 48 muestras (24 para la identificación de HAP en aire y 24 para la identificación de HAP en los ensayos biológicos) Los análisis se llevaron a cabo en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (6890) con inyector automático, acoplado a un espectrómetro de masas (5973N) con ionización electrónica de la marca Agilent Technologies y se realizaron las inyecciones por duplicado (n=96). En la tabla suplementaria III se especifican las condiciones de operación del equipo.

La identificación de los 32 HAP en la MOE de PM<sub>2.5</sub>, se realizó considerando los tiempos de retención absolutos del ion principal (pico base) y de dos secundarios en los 96 cromatogramas obtenidos, para ello, se inyectó un estándar de referencia con todos los analitos a 80 pg/μL. El orden de elusión se muestra en la tabla suplementaría I.

La cuantificación por dilución isotópica se llevó a cabo relacionando las áreas del HAP y de su HAP-d correspondiente. Debido a que la inyección se llevó a cabo por duplicado, se calcularon los coeficientes de variación de las áreas relativas de cada HAP con su correspondiente HAP-d (tabla suplementaría II). Para descartar falsos positivos o errores en el cuantitativo, se estableció un máximo en los coeficientes de variación menor o igual a 15 %. La concentración de los HAP en las partículas suspendidas en el aire se calculó empleando la ecuación 3.

$$HAP = \left[ \frac{A_{HAP}}{A_{HAP-d}} * M_{HAP-d} * \frac{1}{V_{aire}} - \text{Blanco} \right] \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde:

$HAP$ : Concentración del HAP en aire, pg m<sup>3</sup>       $M_{HAP-d}$ : Masa del HAP-d adicionado, pg

$A_{HAP}$ : Área del HAP       $V_{aire}$ : Volumen de aire muestreado, m<sup>3</sup>

$A_{HAP-d}$ : Área del HAP-d

### 2.1.3.2 Determinación de HAP en ensayos biológicos

#### 2.1.3.2.1 Curvas de calibración de HAP

La extracción de la MOE para los ensayos biológicos se realizó tomando 8/10 de cada uno de los filtros (n=24) y se repitió el procedimiento previamente descrito de extracción, reducción de muestras y análisis por CG-EM. Para evaluar que la composición de la MOE en los ensayos biológicos no hubiese sido alterada por el procedimiento de extracción y reducción, los HAP en esta MOE se cuantificaron con base en curvas de calibración.

Las curvas de calibración se hicieron con siete niveles de concentración: 6, 15, 31, 63, 125, 250 y 500 pg/ $\mu$ L. Cada concentración se inyectó por duplicado. Se determinó la pendiente y el intercepto ponderados (Miller y Miller 2002). Se calculó linealidad en función del coeficiente de correlación de Pearson, la sensibilidad con la pendiente, los límites de detección y de cuantificación en función de las desviaciones estándar del intercepto y la pendiente correspondiente (Miller y Miller 2002). Además, se evaluó si el cambio de disolvente y el proceso de reducción de muestras afectaban la concentración de los HAP, para evaluar ésto se llevó a cabo la identificación y cuantificación de los HAP de la MOE sin proceso de secado, en MOE llevada a sequedad, disuelta en DCM y MOE llevada a sequedad y disuelta en DMSO.

#### **2.1.4 Identificación de fuentes de emisión por correlaciones de los HAP y contaminantes criterio**

Las concentraciones de los contaminantes criterios primarios como monóxido de carbono (CO), monóxido de nitrógeno (NO), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y material particulado  $\leq$  a 2.5  $\mu$ m (PM<sub>2.5</sub>), así como de los contaminantes criterios secundarios como dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>) y material particulado  $<$  a 2.5  $\mu$ m (PM<sub>2.5</sub>) se obtuvieron de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) de la Ciudad de México. La estación de monitoreo considerada fue Xalostoc porque es la más cercana al sitio de muestreo. Con las bases de datos obtenidas se calcularon las medianas y los promedios de 24 horas únicamente de los días de muestreo y en los horarios de muestreos.

#### **2.1.5 Identificación de fuentes por tasas de diagnóstico de HAP**

Para calcular las tasas de diagnóstico se utilizaron las concentraciones diarias de antraceno, fenantreno, benzo[a]antraceno, criseno, fluoranteno, pireno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno, benzo[ghi]perileno y benzo[a]pireno, se estimaron las tasas propuestas en la tabla 5 de cada día de muestreo, posteriormente se obtuvo un promedio de cada una de las tasas en el mes de muestreo y finalmente la fuente de emisión se infirió al comparar los valores ponderados con los valores obtenidos.

## **2.2 Evaluación de la toxicidad por la exposición a MOE en células de epitelio alveolar humano A549**

### **2.2.1 Análisis del efecto de la MOE en la viabilidad de las células A549 por el ensayo de MTS y azul de tripano**

#### **Cultivo celular**

Las células de epitelio alveolar humano A549 se cultivaron en medio Ham's F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.05 mg/mL de piruvato de sodio (1mM), 2mM de L-glutamina, 50 UI/mL de penicilina en una atmósfera de 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. El cambio de medio de cultivo se realizó cada 3 días. Al obtener una confluencia de 80% las células se desprendieron con una dilución 1:3 de tripsina-EDTA al 0.25% y se transfirieron a una nueva botella para su manutención

#### **Ensayos de evaluación de la viabilidad celular**

Para los tratamientos de viabilidad se sembraron  $1.15 \times 10^4$  células en cada pozo de placas de 96 pozos en un volumen 200  $\mu$ L y se dejaron estabilizar durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, las células se sometieron a tratamientos continuos de 20, 40, 60 y 80  $\mu$ g/mL de MOE diluida al 0.5% de DMSO durante 6, 12, y 24 h. Como la concentración de MOE presenta el 0.12% de HAP, la concentración de HAP en los ensayos biológicos es de 0.024, 0.048, 0.072 y 0.092  $\mu$ g/mL.

#### **Ensayo de MTS**

##### **Principio**

Para determinar si la MOE tiene un efecto sobre el metabolismo de la mitocondria se utilizó el ensayo de MTS. Este ensayo permite cuantificar la capacidad que tiene la mitocondria de las células viables para convertir a la sal soluble de tetrazolium MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) a un producto coloreado (azul-violeta) de formazán. La absorbancia que produce el formazán (el pico máximo de absorbancia es de 570nm) es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas, por lo que a mayor cantidad de absorbancia del formazán en un cultivo mayor número de células metabólicamente activas, que se interpreta como células sanas o vivas (Fotakis y Timbrell, 2006).

## **Procedimiento**

Una vez que se concluyó el tiempo de tratamiento, se retiró el medio y se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de medio fresco y 10  $\mu\text{L}$  de MTS a cada pozo; se incubaron durante 4 h a 37° C sin exposición a la luz. El cambio de coloración de formazan se evaluó midiendo la absorbancia a 490 nm y 690 nm en un espectrofotómetro TECAN Infinite® 2001 (Fotakis y Timbrell, 2006).

## **Ensayo de azul de tripano**

### **Principio**

El método de exclusión con el colorante azul de tripano se utilizó para determinar si la membrana plasmática de las células se ve modificada por la exposición a MOE, las moléculas de azul de tripano son demasiado grandes para penetrar la membrana celular, la inclusión del colorante en la célula indica un aumento en la permeabilidad de la membrana celular debido a un daño celular. Se consideran células viables aquellas que no incluyen al azul de tripano y no viables a aquellas que, si lo incorporan, y se describe el porcentaje de la población de células viables.

### **Procedimiento**

Una vez concluido el tiempo de tratamiento con las distintas concentraciones de MOE, se retiró el medio y se cosecharon las células, se tomó 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y se colocó en un vial que contenía solución (1:1) de azul de tripano y se homogenizó. Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de este homogenizado en una cámara dual para conteo de células y se realizaron las lecturas en el contador automático de células TC10 (TC10 Cell Counter, Laboratorios Bio-Rad, Singapur).

## **2.2.2 Medición intracelular de ERO en células A549 por la exposición a MOE de PM<sub>2.5</sub>**

### **Principio**

La producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) se determinó por fluorimetría usando 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF-DA). La DCHF-DA es un compuesto no fluorescente que ingresa dentro de las células, si estas células están produciendo peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) intracelular después de la exposición a productos que generan ERO,

provocan la oxidación de este compuesto, produciendo diclorohidroxifluoresceína (DCHF), que es un compuesto fluorescente. Por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por las células (Halliwell y Gutteridge, 1984).

### **Procedimiento**

Para la medición de la generación de ERO se sembraron  $1.15 \times 10^4$  células en cada pozo de placas de 96 pozos en un volumen 200  $\mu$ L y se dejaron estabilizar por 24 horas. Previo al tratamiento, el medio de cultivo se cambió por Ham's F12 (sin rojo fenol) suplementado con 1% de SFB. Las células se trataron con 20, 40, 60 y 80  $\mu$ g/mL de MOE. Como control negativo se utilizó DMSO (reactivo en el que se resuspendió la MOE) y el control positivo fue 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se adicionó 4  $\mu$ L/mL DCFH-D (1 mM) y se mantuvieron en total oscuridad durante 1, 6, 12 y 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de cada tratamiento se realizaron las lecturas de fluorescencia a 485 nm de excitación y 510 nm de emisión.

### **2.2.3 Evaluación de los niveles de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1; y de las antioxidantes SOD2, HO-1 y $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub> en células A549**

#### **Principio**

La inducción de las enzimas del metabolismo y antioxidantes por exposición a MOE se determinó por la técnica de Western Blot. Esta técnica permite la identificación de proteínas específicas de una mezcla compleja de proteínas extraídas en un gel de electroforesis. Estas proteínas se transfieren a una membrana absorbente, se incuban con caseína o ASB para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Posteriormente se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, para el reconocimiento de la proteína de nuestro interés. Estos anticuerpos son detectados al revelarse la membrana y el análisis densitométrico permite cuantificar la cantidad de proteína presente (Kumagai *et al.*, 1997).

#### **Procedimiento**

Se sembraron  $3.6 \times 10^4$  células/ cm<sup>2</sup> en placas de 21cm<sup>2</sup> para la evaluación de los niveles de las proteínas. Después de 24 h de cultivo, las células se trataron con 20 y 40  $\mu$ g/mL de MOE



durante 6 y 24 h, el control negativo fue el vehículo (DMSO). Los controles positivos de inducción de enzimas fueron benzo[a]pireno (5  $\mu$ M) para CYP1A1, +fenantrenoquinona (5  $\mu$ M) para NQO1, HEMIN (0.1  $\mu$ M) para HO-1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 $\mu$ M) para SOD2 y  $\gamma$ -GCS. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó la extracción de la proteína total, homogenizando con buffer de lisis Nonidet-P40 (150 mM NaCl, 1% NP40, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) e inhibidores de proteasas COMPLETE, el homogenizado se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min, se recolectó el sobrenadante con proteínas y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Para la desnaturalización, se tomaron 50  $\mu$ g de proteína y se le añadió 5 $\mu$ l de buffer de carga a 95° C durante 5 min. Las muestras se cargaron en geles al 12% de poliacrilamida, los cuales se corrieron a un voltaje constante (100 V) durante 3 horas a temperatura ambiente. Las proteínas resultantes del gel de electroforesis se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol (35 V). Se usó un marcador de peso molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder y la tinción de rojo Ponceau S para verificar la correcta transferencia de las proteínas. Posteriormente, la membrana se lavó con PBS, se bloqueó con leche descremada al 5% durante 1 h, se adicionó el Ab primario y se dejó toda la noche a 4° C. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con 15 mL de PBS Tween (0.1%) durante 5 minutos y se incubó con el Ab secundario conjugado durante 1 h, a temperatura ambiente y agitación constante. Nuevamente, las membranas se lavaron 3 veces con 15 mL de PBS Tween (0.1%) y se revelaron mediante un sistema de detección ECL (Enhanced chemiluminescence) acoplada a peroxidasa de rábano. La identificación de las proteínas blanco se hizo en relación con el marcador de peso molecular. Como control de carga de la inmunodetección se usó GADPH. Para obtener la densitometría, las placas fotográficas obtenidas se analizaron por medio del software ImageJ 1 (Kumagai *et al.*, 1997).

### **2.3 Análisis estadístico**

Los datos se analizaron usando los paquetes estadísticos de Prisma 6 (GraphPad Prism Software, Inc.) y Statistica ®. Se realizaron pruebas de normalidad y posteriormente la prueba de varianza Kruskal Wallis (debido a que la distribución de los datos no fue normal), considerando un nivel de significancia estadística de  $p < 0.05$ . Además, se empleó la correlación de Spearman.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Composición química de PM<sub>2.5</sub>

##### 3.1.1 Concentración de PM<sub>2.5</sub> en noviembre-diciembre de 2017

La Figura 4 presenta las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> reportadas por la Red Automática de Monitoreo Ambiental (SIMAT, SMA, CDMX, 2018) durante el periodo de colecta de noviembre-diciembre de 2017, en 5 días de este periodo se excedió el límite máximo permisible establecido para este contaminante criterio de 45 µg/m<sup>3</sup> (NOM-025-SSA1, 2014). Según los datos reportados por la RAMA los días que se observó mayor concentración de PM<sub>2.5</sub> fue el 24 y 25 de noviembre y el de menor concentración fue el 13 de noviembre. Con respecto a la distribución de la MOE de PM<sub>2.5</sub>, se observó que la MOE obtenida en promedio representa el 15.5% de PM<sub>2.5</sub>. Esto coincide con lo reportado por Amador-Muñoz *et al.*, 2011 y Martínez, 2018.

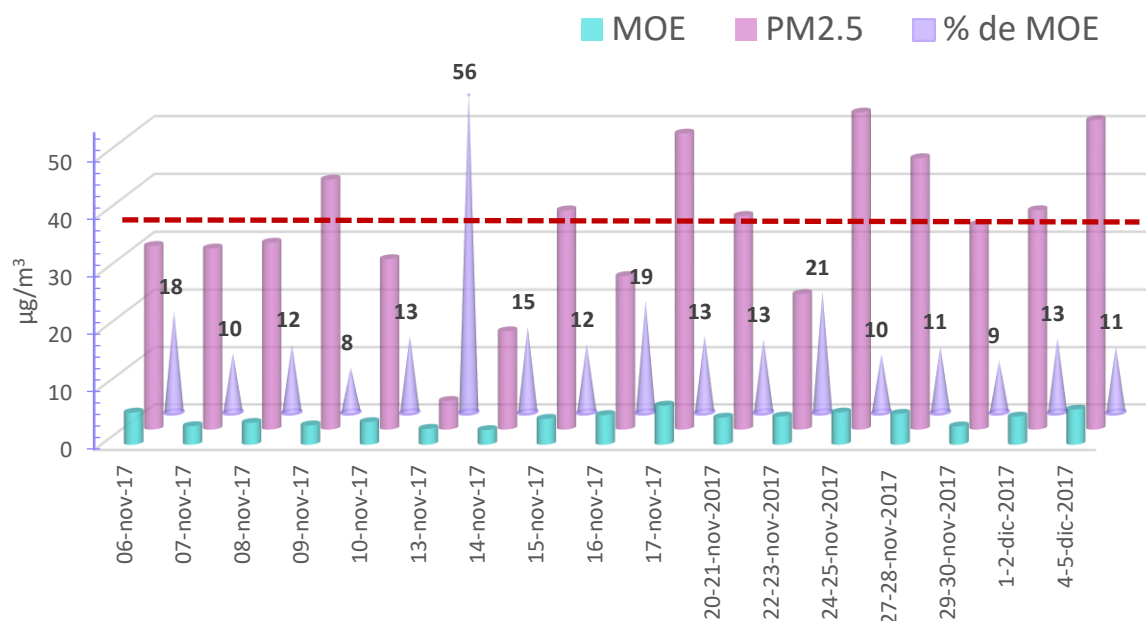


Figura 4. Distribución de las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> y de la MOE en nov-dic de 2017 medidas en Cinvestav, Zacatenco.

### 3.1.2 HAP identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub>

Se cuantificaron los siguientes HAP por el método de dilución isotópica: naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, 1-metilantraceno, 3,6-dimetilfenantreno, fluoranteno, pireno, benzo[*a*]fluoreno, benzo[*a*]antraceno, trifenileno, ciclopenta[*c,d*]pireno, criseno, 5-metilcriseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*j*]fluoranteno, benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno, perileno, dibenzo[*a,h*]antraceno, dibenzo[*a,c*]antraceno, indeno[*1,2,3-cd*]pireno y benzo[*ghi*]perileno. La Figura 5 presenta la contribución individual de los HAP identificados. Los compuestos que se identificaron en el presente estudio ya han sido reportados por otros autores en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (Tabla 2).

Una vez obtenidas las concentraciones diarias de los HAP se procedió a realizar el correspondiente análisis estadístico no paramétrico (es un análisis más robusto debido a que es menos sensible a valores atípicos, siendo esto muy común en el análisis de muestras ambientales), al comparar la concentración de cada compuesto por semana de muestreo, el análisis estadístico (Kuskal Wallis) indicó que estas concentraciones no presentaron diferencias estadísticamente significativas durante todo el mes, excepto acenaftileno, antraceno y 1-metilantraceno (Figura 6).

Esto nos permitió conocer que no es necesario realizar muestreo diario ya que las concentraciones en 22 de los 25 HAP identificados en muy parecida en todas las semanas de estudio. Se infiere que los HAP que presentaron concentraciones variables o heterogéneas en el mes es porque son influenciadas por fuentes específicas; por ejemplo: acenaftileno y antraceno se han asociado además de emisiones vehiculares a la combustión de madera (MohseniBandpi *et al.*, 2017).

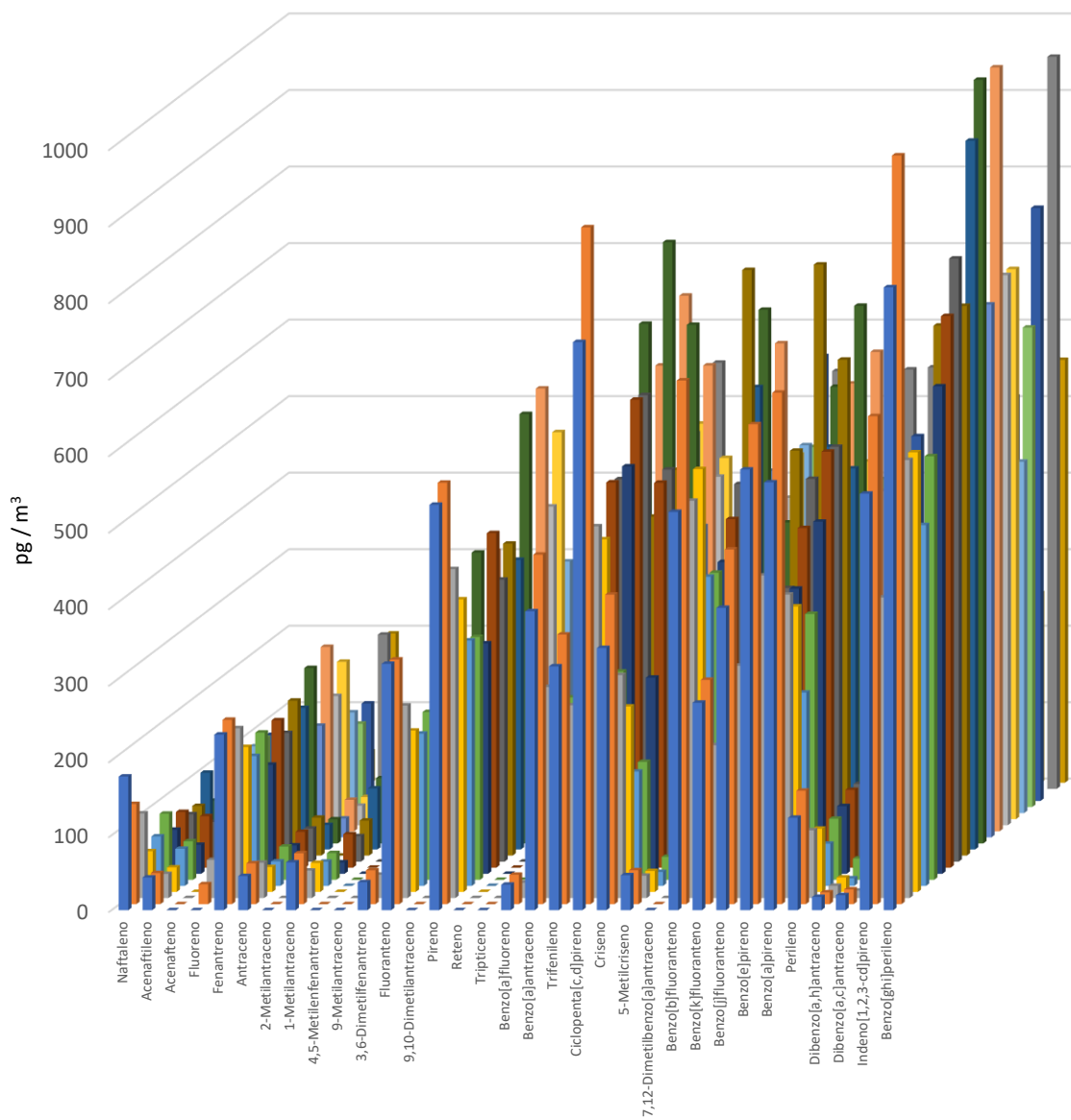
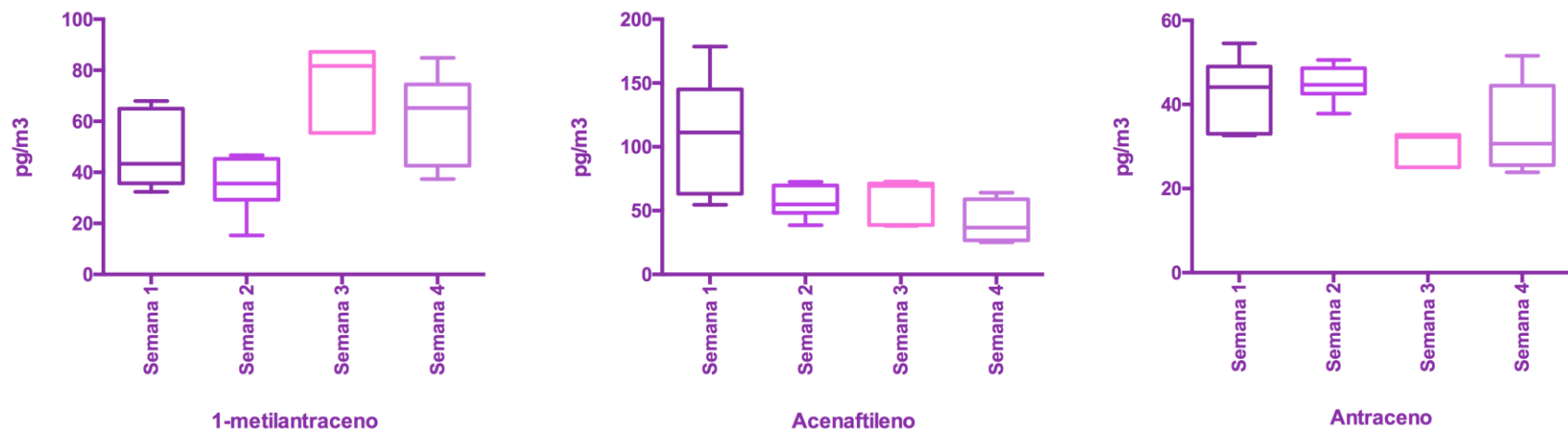


Figura 5. Contribución individual de HAP identificados en MOE de PM<sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017 en Cinvestav-Zacatenco.

A



B

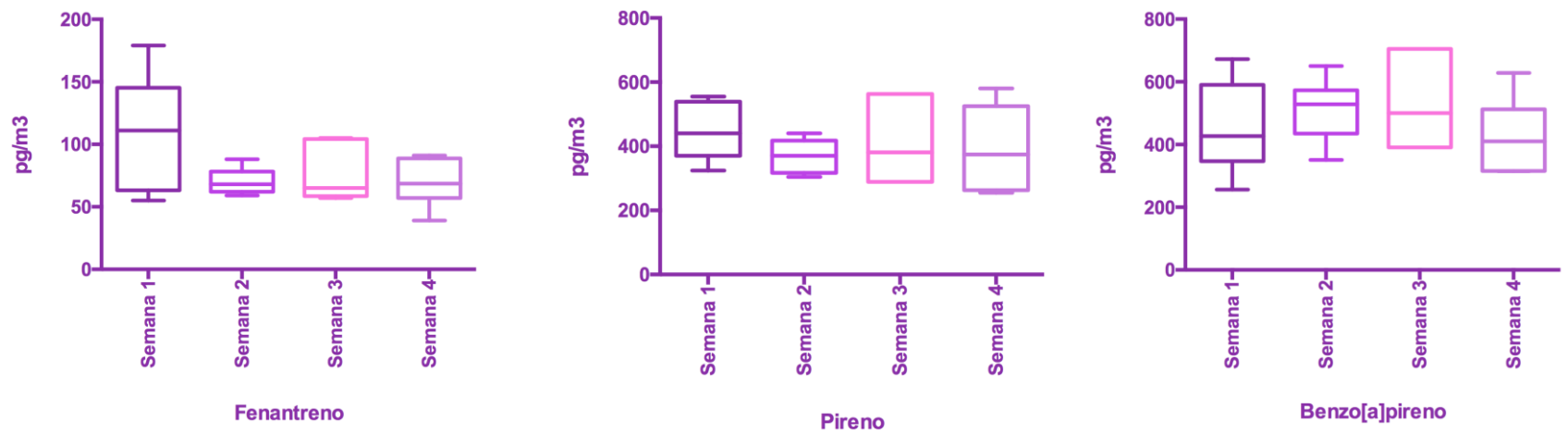


Figura 6. Variación semanal de los HAP identificados en MOE de PM<sub>2.5</sub>. A) Compuestos que presentan variaciones semanales en su concentración, B) Compuestos que no presentan variaciones semanales en su concentración.

En la Figura 7 se observa que en PM<sub>2.5</sub>, el HAP de mayor concentración promedio en el mes de estudio fue el benzo[ghi]perileno, seguido por el 7,12 dimetilbenzo[a]antraceno y el benzo[a]pireno y la más baja fue el dibenzo[a,c]antraceno y dibenzo[a, h]antraceno), mientras que el acenafteno, 2-metilntraceno, 4,5-metilfenantreno, 9-metilntraceno, 9,10-dimetilntraceno, tripticeno y 7, 12-dimetilbenzo[a]antraceno no fueron detectados. En la Figura 10 también se resalta con textura en las barras a los HAP que han sido clasificados por la IARC como carcinogénos (Tabla 8); se observó que 8 de los 25 HAP identificados entran en alguna de estas categorías (Lávalova *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2017).

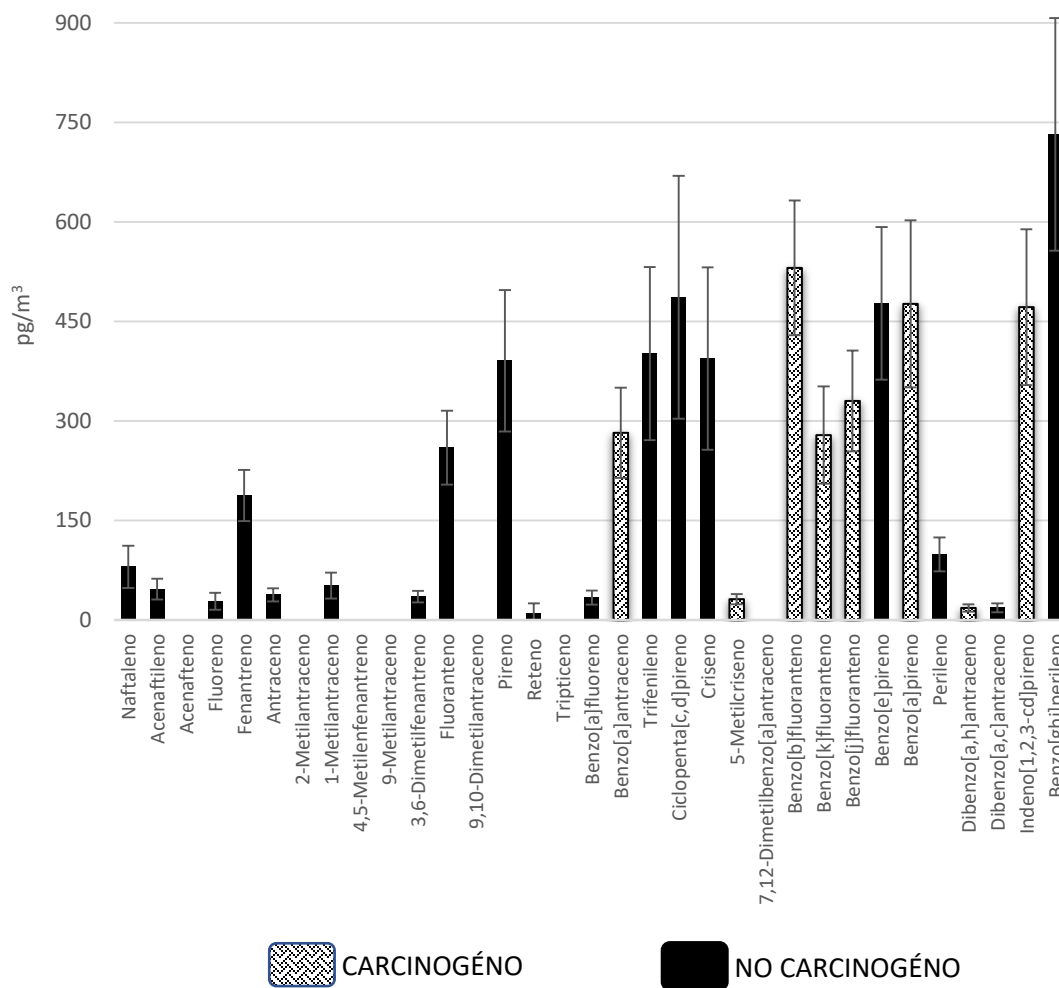


Figura 7. Promedio  $\pm$  DE mensual de HAP identificados en PM<sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.

Con respecto a la distribución de los HAP en función de su número de anillos, se observó que los HAP de 3 anillos presentan concentraciones menores a 200  $\text{pg}/\text{m}^3$  y que están representados por 6 compuestos. Fenantreno fue el HAP de 3 anillos con más concentración, seguido del 1-metilantraceno, acenaftileno, antraceno, 3,6 dimetilfenantreno, también se observó que el fluoreno fue el HAP de 3 anillos con menor concentración (Figura 8).

Por otro lado, se identificaron 7 HAP de 4 anillos, los cuales presentaron concentraciones menores a 650  $\text{pg}/\text{m}^3$ , con respecto a su concentración se observó que el trifenileno fue el de mayor concentración, seguido del pireno, criseno, benzo[*a*]antraceno, fluoranteno, benzo[*a*]fluoreno, siendo el 5-metilcriseno el HAP de 4 anillos con menor concentración (Figura 9).

Se identificaron 11 HAP de 5 anillos y algunos de los compuestos de este grupo presentaron las concentraciones más altas de todos los HAP identificados en  $\text{PM}_{2.5}$ , por ejemplo, el benzo[*ghi*]perileno presentó concentraciones cercanas a 1200  $\text{pg}/\text{m}^3$ , seguido del benzo[*b*]fluoranteno, ciclopenta[*c,d*]pireno, benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno, benzo[*j*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno y perileno. También se observó que el dibenzo[*a,h*]antraceno y el dibenzo[*a,c*]antraceno fueron los HAP de 5 anillos con menor concentración (Figura 10).

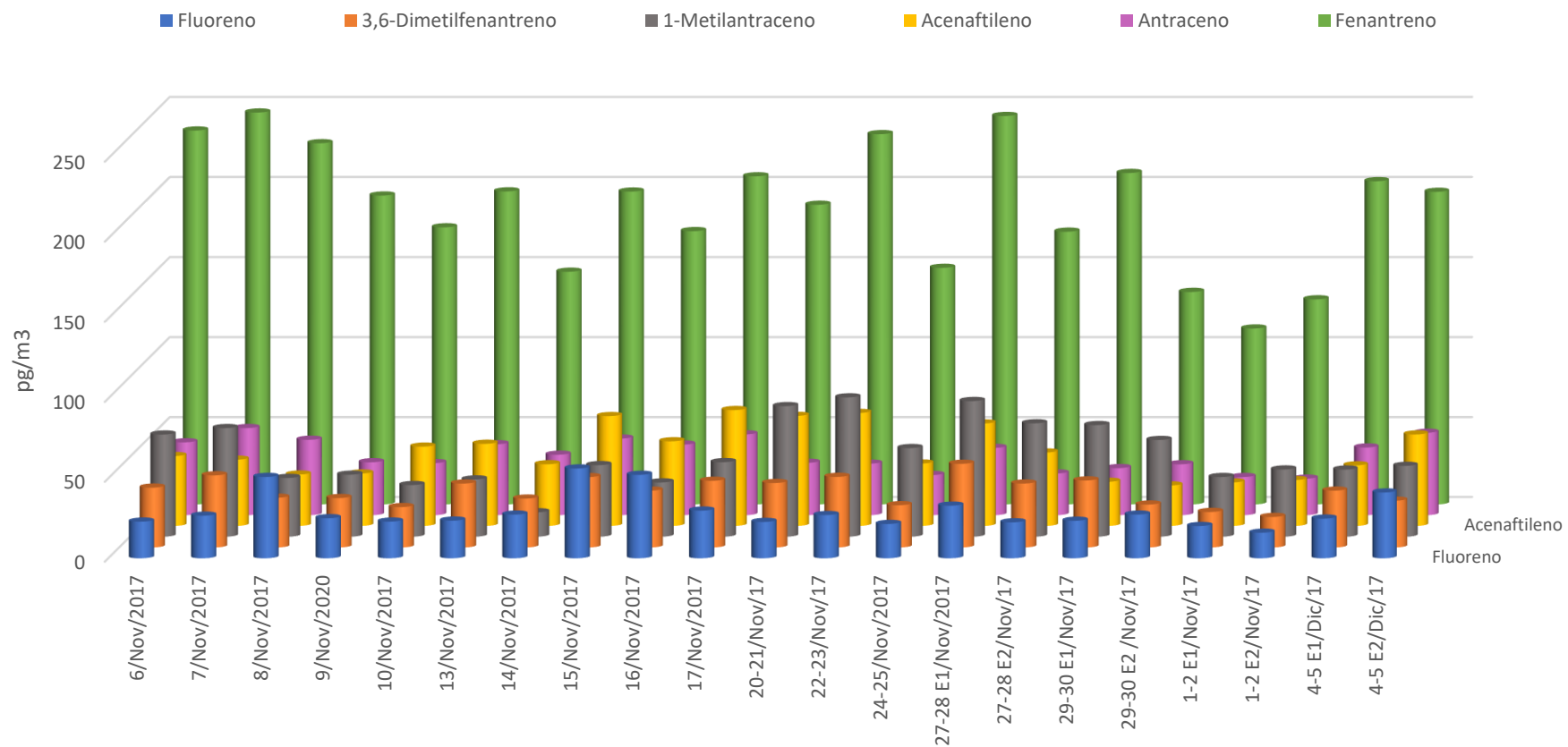


Figura 8. Concentración de HAP de 3 anillos identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.



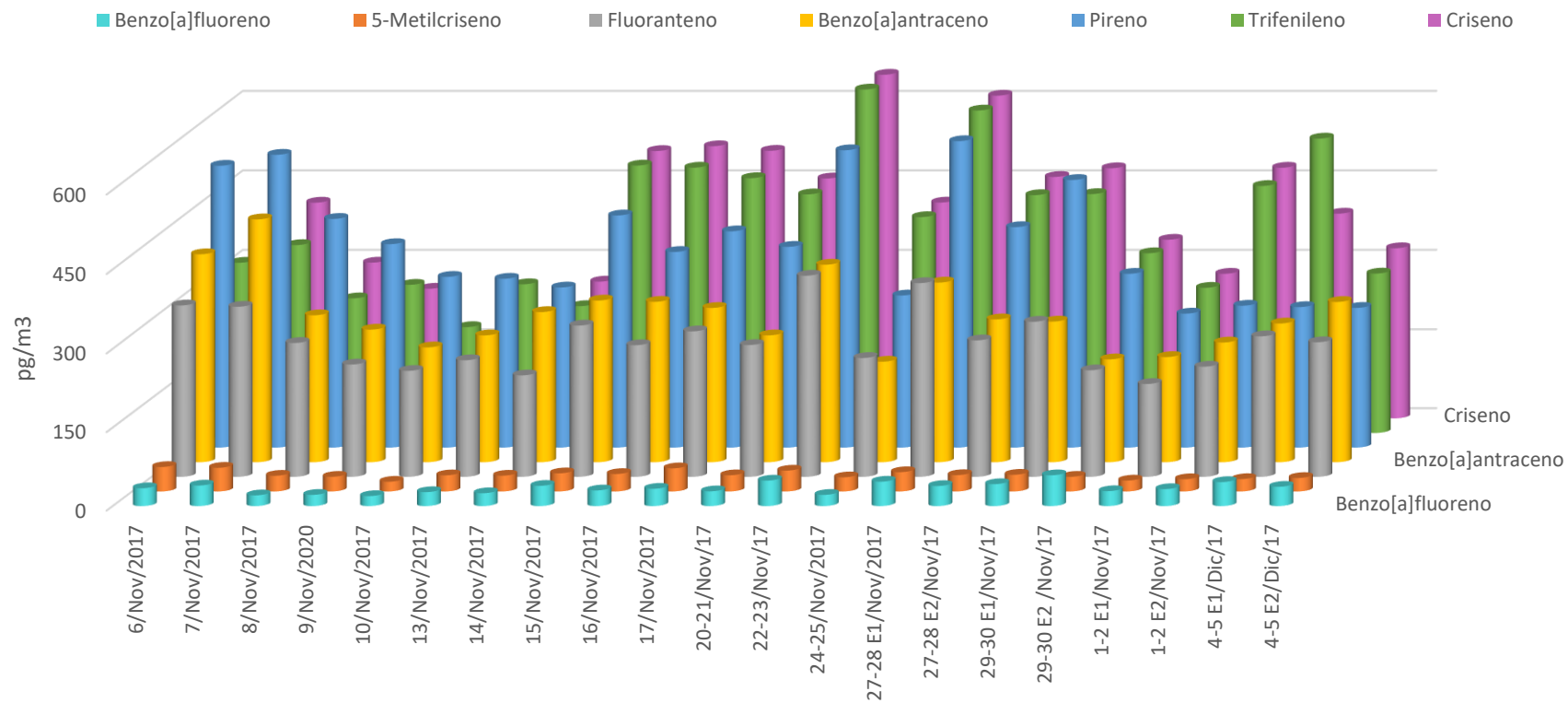


Figura 9. Concentración de HAP de 4 anillos identificados en MOE de PM<sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav- Zacatenco.

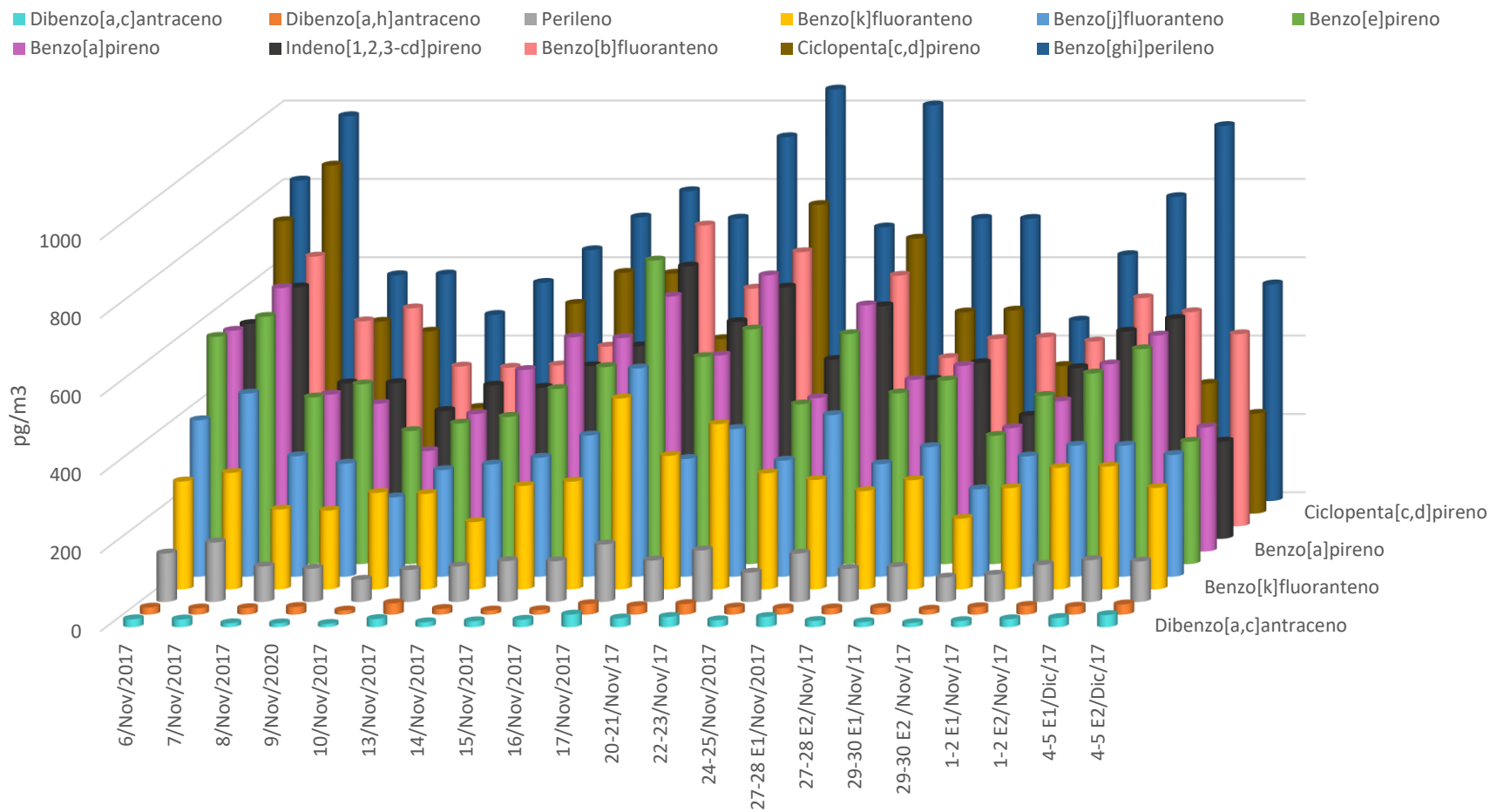


Figura 10. Concentración de HAP de 5 anillos identificados en MOE de PM<sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav-Zacatenco.

### 3.1.3 Identificación de fuentes por correlaciones con contaminantes criterio y tasas de diagnóstico de los HAP

#### 3.1.3.1 Contaminantes criterio

Se consideraron contaminantes criterio primarios como monóxido de carbono (CO), monóxido de nitrógeno (NO), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y material particulado  $\leq$  a 2.5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>). Los contaminantes criterios secundarios utilizados en este estudio fueron dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>) y material particulado  $<$  a 2.5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>). La concentración promedio de cada contaminante criterio según las bases de datos obtenidas de la RAMA de la Ciudad de México (estación de monitoreo Xalostoc) se presentan en la Tabla 7. Los valores reportados se calcularon considerando únicamente los días y los horarios de muestreo.

**Tabla 7. Promedio de la concentración mensual de contaminantes criterio reportados en Xalostoc por la RAMA y límites máximos establecidos en normas nacionales.**

Contaminante	Este estudio Promedio	NOM <sup>1</sup>		Normas Oficiales Mexicanas
		Tiempo de Exposición	Concentración	
Monóxido de Carbono (CO)	0.0002 ppm	8 h	11 ppm	NOM-021-SSA1-1993
Dioxido de Nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	0.0346 ppm	1 h	0.210 ppm	NOM-023-SSA1-1993
Ozono (O <sub>3</sub> )	0.0219 ppm	1 h	0.095 ppm	NOM-020-SSA1-2014
	0.0074 ppm	8 h	0.070 ppm	
PM	PM <sub>10</sub> 98.13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 h	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	NOM-025-SSA1-2014
	PM <sub>2.5</sub> 35.80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 h	35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
Dióxido de Azufre (SO <sub>2</sub> )	0.0429 ppm	1 h	0.110 ppm	NOM-022-SSA1-2010

NOM<sup>1</sup> Normas Oficiales Mexicanas, n.r. – no reportado, h: horas, ppm: partes por millón,  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ : microgramos por metro cubico.

En la Tabla 7 se observa que CO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> y SO<sub>2</sub> presentaron valores por debajo de los límites máximos permisibles establecidos por las normas oficiales mexicanas; solo el PM excede los valores establecidos por las normas nacionales, se observó que la concentración del PM<sub>10</sub> duplica el valor establecido, esto es consistente con los reportes de la SEDEMA, ya que en el segundo fin de semana del periodo de muestreo se declaró contingencia ambiental por la concentración de PM<sub>10</sub> en el aire. Con respecto a el PM<sub>2.5</sub> se observa que la concentración de este contaminante está en los límites de los valores establecidos.

#### **3.1.3.1.1 Identificación de las fuentes de emisión por correlaciones con contaminantes criterio**

El análisis de HAP presentes en la MOE, además de ayudar a entender los posibles mecanismos de toxicidad de la MOE, permite identificar las fuentes de emisión, lo cual proporciona información relevante para mejorar su regulación. Las correlaciones de los HAP con contaminantes criterio específicos permiten inferir fuentes de emisión, estas inferencias van a depender de la fuente de emisión asociada al contaminante criterio y de la correlación significativa entre éste y el HAP de interés. Lo primero que se observó en el análisis de correlación fue que hay una correlación positiva entre CO y NO, por otro lado, y con respecto al PM<sub>2.5</sub> se observó que presenta correlaciones positivas con la mayoría de los contaminantes criterio analizados, lo que indican que los contaminantes criterio y las partículas son representativas de Xalostoc.

En la tabla 8 se observa que los HAP que mostraron correlaciones significativas con los contaminantes provenientes de emisiones primarias (CO, NO y SO<sub>2</sub>) fueron: antraceno, fluoranteno, 1-metilantraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*j*]fluoranteno, benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno, perileno, dibenzo[*a,c*]antraceno, indeno[*1,2,3-cd*]pireno y benzo[*ghi*]perileno. Se ha reportado que los HAP que se correlacionan principalmente con NO provienen de combustión incompleta de diésel, los que lo hacen con CO provienen de gasolina y los que lo hacen con SO<sub>2</sub> con actividades industriales (Amador-Muñoz *et al.*, 2013; Martínez-Domínguez, 2018).

**Tabla 8. Correlación de Spearman entre HAP y contaminantes criterio, valores en rojo indican correlación estadísticamente significativa  $p < 0.05$ .**

Compuestos	CO	NO	NO <sub>2</sub>	NO <sub>x</sub>	O <sub>3</sub>	PM <sub>2.5</sub>	SO <sub>2</sub>
CO	1,00	<b>0,87</b>	<b>0,76</b>	<b>0,69</b>	-0,11	<b>0,80</b>	<b>0,64</b>
NO	<b>0,87</b>	1,00	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	-0,35	<b>0,64</b>	<b>0,67</b>
NO <sub>2</sub>	<b>0,76</b>	<b>0,62</b>	1,00	<b>0,74</b>	-0,19	<b>0,88</b>	<b>0,52</b>
NO <sub>x</sub>	<b>0,69</b>	<b>0,62</b>	<b>0,74</b>	1,00	-0,17	<b>0,52</b>	0,40
O <sub>3</sub>	-0,11	-0,35	-0,19	-0,17	1,00	-0,30	-0,24
PM <sub>2.5</sub>	<b>0,80</b>	<b>0,64</b>	<b>0,88</b>	<b>0,52</b>	-0,30	1,00	<b>0,60</b>
SO <sub>2</sub>	<b>0,64</b>	<b>0,67</b>	<b>0,52</b>	0,40	-0,24	<b>0,60</b>	1,00
Naftaleno	0,19	0,23	0,20	0,22	0,13	0,08	0,38
Acenaftileno	0,24	0,15	-0,09	-0,21	0,11	0,09	0,02
Fluoreno	-0,17	-0,06	-0,27	-0,26	-0,18	-0,09	0,31
Fenantreno	0,40	0,47	0,06	0,23	0,07	-0,01	0,46
Antraceno	0,16	0,28	-0,22	0,01	-0,07	-0,08	<b>0,52</b>
1-Metilantraceno	<b>0,65</b>	<b>0,52</b>	<b>0,61</b>	<b>0,54</b>	0,12	0,48	0,14
3,6-Dimetilfenantreno	0,33	0,34	0,02	0,12	0,17	0,05	0,12
Fluoranteno	<b>0,58</b>	<b>0,59</b>	0,28	0,38	0,14	0,22	<b>0,51</b>
Pireno	0,28	0,31	-0,06	0,17	0,19	-0,12	0,25
Benzo[a]fluoreno	0,35	0,43	0,31	0,39	-0,02	0,22	0,03
Benzo[a]antraceno	0,30	0,48	-0,14	0,16	0,08	-0,14	0,33
Trifenileno	0,41	0,38	0,35	0,17	-0,01	0,42	0,20
Ciclopenta[c,d]pireno	0,18	0,36	-0,14	0,18	0,14	-0,20	0,21
Criseno	0,41	0,41	0,33	0,21	-0,04	0,36	0,24
5-Metilcriseno	0,36	0,44	-0,10	0,14	0,27	-0,11	0,24
Benzo[b]fluoranteno	<b>0,57</b>	<b>0,70</b>	0,42	0,38	-0,46	0,39	0,38
Benzo[k]fluoranteno	<b>0,61</b>	<b>0,59</b>	<b>0,50</b>	0,38	-0,16	0,46	0,25
Benzo[j]fluoranteno	<b>0,58</b>	<b>0,81</b>	0,32	0,42	-0,28	0,27	<b>0,60</b>
Benzo[e]pireno	<b>0,62</b>	<b>0,76</b>	0,31	0,41	-0,29	0,30	0,42
Benzo[a]pireno	0,42	<b>0,58</b>	0,10	0,23	-0,02	0,08	0,32
Perileno	0,48	<b>0,61</b>	0,14	0,29	-0,13	0,13	0,38
Dibenzo[a,h]antraceno	0,24	0,26	0,28	0,02	-0,01	0,24	0,03
Dibenzo[a,c]antraceno	0,47	<b>0,50</b>	0,37	0,24	-0,01	0,33	0,16
Indeno[1,2,3-cd]pireno	<b>0,64</b>	<b>0,74</b>	0,38	0,38	-0,18	0,36	0,38
Benzo[ghi]perileno	<b>0,49</b>	<b>0,56</b>	0,30	0,37	0,04	0,22	0,14

Letras en rojo: indican correlaciones positivas y estadísticamente significativas; Recuadro gris: no correlación estadísticamente significativa.

Las correlaciones indican que fluoranteno, 1-metilantraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*j*]fluoranteno, benzo[*e*]pireno, dibenzo[*a,c*]antraceno, indeno[*1,2,3-cd*]pireno y benzo[*ghi*]perileno, provienen de combustión incompleta de gasolina, mientras que fluoranteno, 1 metilantraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*j*]fluoranteno, benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno, perileno, dibenzo[*a,c*]antraceno, indeno[*1,2,3-cd*]pireno y benzo[*ghi*]perileno podrían provenir de combustión incompleta de diésel; solamente 1 metilantraceno y benzo[*j*]fluoranteno podrían ser emitidos por actividades industriales debido a la correlación de estos compuestos con SO<sub>2</sub> (Tabla 8).

También se observó que el naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, 3,6-dimetilfenantreno, pireno, benzo[*a*]fluoranteno, benzo[*a*]antraceno, trifenileno, ciclopenta[*c,d*]pireno, criseno y 5-metilantraceno no mostraron correlación con ninguno de los contaminantes criterio lo cual indica que las fuentes de emisión de PM<sub>2.5</sub> colectadas en Cinvestav-Zacatenco tienen una distribución limitada. Por otro lado, no hay correlación de O<sub>3</sub> con ninguno de los HAP identificados esto ayuda a inferir que su origen pudiera ser diferente. Solamente el 1 metilantraceno y benzo[*j*]fluoranteno podrían estar dando lugar a la formación de nitro-HAP y oxi HAP por su correlación con NO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub> (Albinet *et al.*, 2008; Bandowe *et al.*, 2014a; Eiguren-Fernandez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

### 3.1.3.2 Identificación de fuentes de emisión mediante el análisis de las tasas de diagnóstico de los HAP

Otro método de identificación de fuentes son las tasas de diagnóstico entre los HAP, de acuerdo con los valores calculados en este estudio y los ponderados previamente por otros autores, se infiere que los HAP provienen de fuentes de emisión pirogénica, esto se considera de acuerdo a que los valores de ambas tasas ( $\Sigma\text{BPM}/\Sigma\text{APM}$  y  $\text{Ant}/(\text{Ant}+\text{Fen})$ ) caen dentro del valor ponderado por 2 autores (Zhang *et al.*, 2008; Pies *et al.*, 2008) (Tabla 9).

Los valores obtenidos en la tasa  $\text{Flt}/(\text{Flt}+\text{Pir})$  permitió inferir que la presencia de estos HAP en el aire se podría deber a la combustión incompleta de combustibles fósiles (De La Torre-Roche *et al.*, 2009), la tasa  $\text{BaP}/\text{BghiP}$  indicó que se podría deber a emisiones vehiculares

(Park *et al.*, 2002), mientras que la de **Flt/Pir** los asoció a emisiones de combustibles fósiles (Neilson, 1998).

**Tabla 9. Tasas de diagnóstico entre HAP**

Relación binaria	Valores obtenidos en este estudio			Valor	Fuente de emisión	Referencia
	Mediana	Promedio	±DE			
ΣBPH/ΣAPH	0.40	0.42	0.06	<1	Pirogénico	Zhang <i>et al.</i> , (2008)
				>1	Petrogénico	
I123cdP/(I123cdP + BghiP)				0.18	Gasolina	Ravindra <i>et al.</i> , (2008)
	0.40	0.40	0.02	0.37-0.70	Diesel	Kavouras <i>et al.</i> , (2001)
Fno/(Fno+Pir)	0.59	0.52	0.08	>0.5	Diesel	Ravindra <i>et al.</i> , (2008)
				< 0.5	Gasolina	
Ant/(Ant+Fen)				>0.1	Petrogénico	Pies <i>et al.</i> , (2008)
	0.16	0.17	0.03	<0.1	Pirogénico	
Flt/(Flt+Pir)				<0.4	Petrogénico	De La Torre-Roche <i>et al.</i> , (2009)
	0.40	0.40	0.03	0.4-0.5	Combustible fósil	
				>0.5	Combustion de madera	
BaP/(BaP+Cris)	0.55	0.56	0.06	0.5	Diesel	Guo <i>et al.</i> , (2003)
BbF/BkF				0.73	Gasolina	Ravindra <i>et al.</i> , (2008)
	1.81	1.95	0.35	<0.5	Diesel	Park <i>et al.</i> , (2002)
BaP/BghiP	0.67	0.67	0.08	0.5-0.6	Emisiones de tráfico	Park <i>et al.</i> , (2002)
I123cdP/BghiP	0.65	0.66	0.08	< 0.4	Gasolina	Caricchia <i>et al.</i> , (1999)
Flt/Pir	0.65	0.67	0.10	0.6	Emisiones vehiculares	Neilson, (1998)

ΣBPM – Suma de HAP de bajo peso molecular (<228 gmol<sup>-1</sup>), ΣAPM - Suma de HAP de alto peso molecular (>228 gmol<sup>-1</sup>), I123cdP – Indeno[1,2,3-cd]pireno, BghiP – Benzo[ghi]perileno, Fno – Fluoreno, Pir – Pireno, Ant – Antraceno, Fen – Fenantreno, BaP – Benzo[a]pireno, Cris – Criseno, BbF – Benzo[b]fluoranteno, BkF – Benzo[k]fluoranteno, Flt – Fluoranteno.

Por otro lado, los valores calculados en 4 de las tasas (**I123cdP/(I123cdP + BghiP)**, **Fno/(Fno+Pir)**, **BaP/(BaP+Cris)** y **BbF/BkF**) ayuda a inferir que los HAP podrían tener como fuente de emisión la combustión incompleta de diésel, es muy probable que esta sea una fuente de emisión porque los valores se obtuvieron con HAP diferentes. Finalmente, solo 1 de los valores calculados cayeron en los valores ponderados que asocia la presencia de estos HAP a la combustión incompleta de gasolina (**I123cdP/BghiP**).

Esto ejemplifica como el uso de tasas de diagnóstico de los HAP pueden proporcionar información que ayuda a identificar fuentes específicas de emisión de HAP, aunque también se considera que para una mayor certidumbre en las inferencias se complementa con otros métodos de identificación de fuentes.

La identificación y cuantificación de los HAP realizado en este estudio, además de corroborar la presencia de estos compuestos en la MOE de PM<sub>2.5</sub>, nos permitió estimar la concentración exacta de estos compuestos en los ensayos biológicos. Esto es de relevancia debido a los efectos que se han adjudicado a la MOE de PM<sub>2.5</sub>. Longhin y colaboradores (2013) sugirió que la fracción orgánica de PM desencadena efectos tóxicos en las células que entran en contacto de forma directa con los diferentes compuestos químicos presentes en su superficie, lo cual es consistente con otros datos reportados en la literatura (Billet *et al.*, 2007; Chakra *et al.*, 2007). Otros autores indican que el alto contenido de HAP absorbidos en el PM podría asociarse con efectos como; genotoxicidad, estrés oxidativo, disfunciones mitocondriales y del citoesqueleto, afectar el ciclo celular e inducir la formación de ERO (Binkova *et al.*, 2003; Longhin *et al.*, 2013; Sevastianova *et al.*, 2007). Por lo tanto, la determinación de los HAP es una parte muy importante en este tipo de estudios, ya que permite delimitar los marcadores celulares a evaluar.



## 3.2 Efecto de la exposición de la MOE en células A549

### 3.2.1 Determinación de la concentración de la MOE en los ensayos biológicos

En un adulto sano, el volumen de inspiración y la frecuencia respiratoria se calculan teniendo en cuenta el peso corporal y la edad (Ambrosino *et al.*, 1995; Connors *et al.*, 1996), en este caso se consideró a un individuo adulto con un peso de 70 kg, por tanto, el volumen inspiratorio es de 400 mL y la frecuencia respiratoria reportado en individuos con estas características es de 17.5 respiraciones por minuto (Bernabe, 2017). Utilizando la ecuación 4 y considerando una exposición extramuros de 8 horas, se tiene que:

$$VA [m^3] = [VI] [FR] [t] \quad \text{Ecuación (4)}$$

Dónde:

VA: volumen de aire (m<sup>3</sup>)

VI: volumen inspiratorio (mL)

FR: frecuencia respiratoria (resp/min)

t: tiempo (min)

Sustituyendo valores en ecuación 4:

$$VA = [400 \text{ mL}] [17.5 \text{ rp/min}] [8 \text{ h}] [60\text{min} / 1\text{h}] [m^3 / 1 \times 10^6 \text{ mL}]$$

$$VA = 3.36 \text{ m}^3$$

Considerando que la concentración promedio de PM<sub>2.5</sub> en el periodo de muestreo según los datos reportados por la RAMA y la REDMA fue de 26 µg/m<sup>3</sup>, utilizando la ecuación 5 y considerando que la MOE representan el 33% de la masa de PM<sub>2.5</sub> según estudios previos (Tabla 2) se tiene que:

$$MOE [\mu\text{g/día}] = [VA] [PM_{2.5E}] [\% \text{ de } CO_E] \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde:

MOE: materia orgánica extraída (µg/m<sup>3</sup>)

PM<sub>2.5E</sub>: PM<sub>2.5</sub> estimado (µg/m<sup>3</sup>)

VA: volumen de aire (m<sup>3</sup>)

% de CO<sub>E</sub>: % estimado de compuestos orgánicos (%)

Sustituyendo valores en ecuación 5:

$$\text{MOE } [\mu\text{g/día}] = [3.36 \text{ m}^3] [26 \mu\text{g/m}^3] [.33]$$

$$\text{MOE inhalada en 8 h} = 29.17 \mu\text{g/m}^3$$

$$\text{MOE inhalada en 24 h} = 86.48 \mu\text{g/m}^3$$

Al finalizar la cuantificación de MOE se observó que en Zacatenco en el periodo de muestreo la MOE representa el 15.5% de la masa de  $\text{PM}_{2.5}$ . Por lo tanto, ajustando el % de MOE obtenida y realizando los cálculos correspondientes, se tiene un estimado de que la MOE inhalada por la población en esta zona durante un periodo de 8 horas es de  $13.7 \mu\text{g/m}^3$  y en 24 horas es de  $40 \mu\text{g/m}^3$ . En función de esto se decidió que la dosis más baja a utilizar en los ensayos fuera de  $20 \mu\text{g/mL}$  y la más alta de  $80 \mu\text{g/mL}$ .

### **3.2.2 Identificación y cuantificación de los HAP en la MOE utilizada en los ensayos biológicos**

Se identificaron 25 HAP de 32 HAP analizados, pero solo se lograron cuantificar 14 HAP en la MOE debido a que solo se contaba en ese momento con las diluciones de las 14 curvas elaboradas con estándares de HAP específicos. Se evaluó el efecto del proceso de secado y el cambio de disolvente sobre las concentraciones de la MOE. La Figura 11 ilustra que ni el proceso de secado, ni el cambio de disolvente afectan la concentración de HAP y que los HAP identificados en  $\text{PM}_{2.5}$  se mantienen y no hay pérdida de esto en la MOE utilizada en los ensayos biológicos.

Además, considerando que la cuantificación de MOE en  $\text{PM}_{2.5}$  indicó que los compuestos orgánicos solo representan el 15.5% de  $\text{PM}_{2.5}$  y realizando el ajuste correspondiente en función de la concentración total de los HAP por día se obtuvo que los HAP representan solo el 0.1% de la MOE y como se sospecha que estos compuestos podrían estar generando efectos adversos en los tejidos donde se deposita  $\text{PM}_{2.5}$  se llevaron a cabo ensayos de toxicidad *in vitro* para evaluar la citotoxicidad en células de epitelio, debido a que este tejido representa al primer órgano blanco de estas partículas.

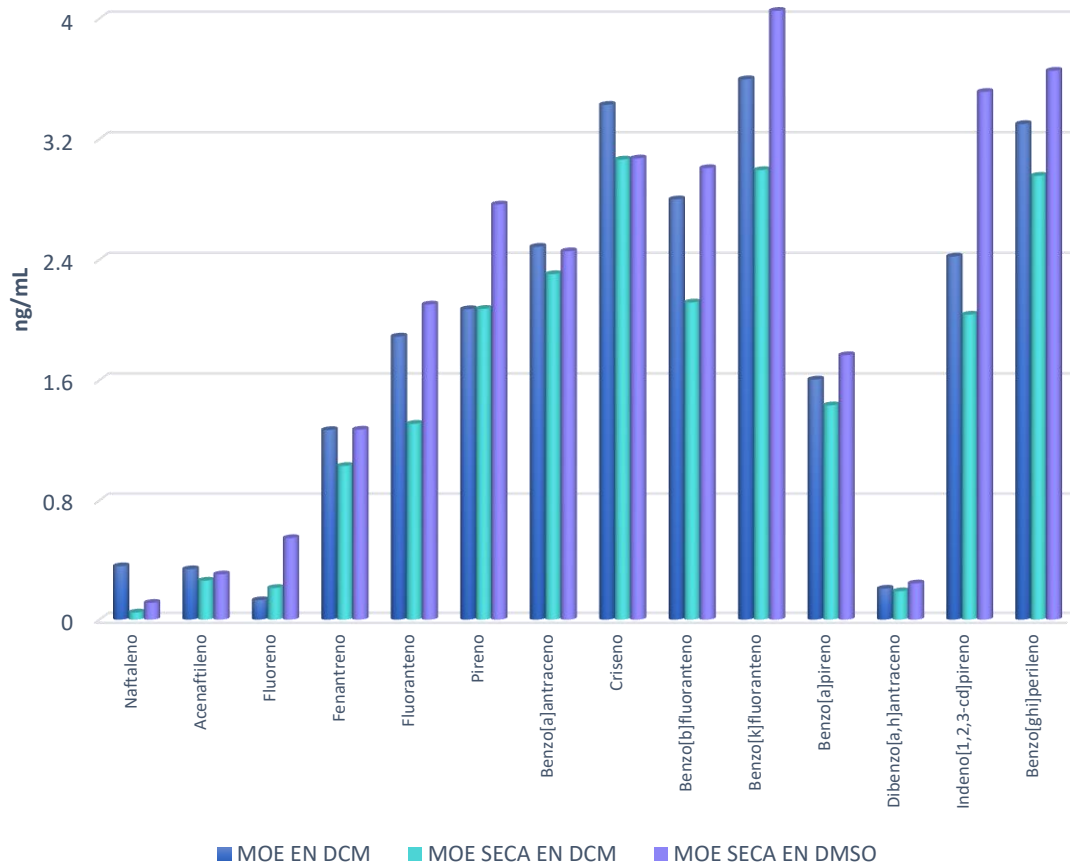


Figura 11. Promedio de HAP identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub> en nov-dic de 2017, Cinvestav, Zacatenco.

### 3.2.3 Efecto de la exposición de la MOE en la viabilidad de las células A549

Se realizó la evaluación de la citotoxicidad en células A549 a las 6, 12 y 24 h por la exposición a 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g/mL}$  de MOE, los resultados obtenidos indican que la actividad metabólica de la mitocondria de las células epiteliales alveolares no se altera por las exposiciones dosis-tiempo de MOE (Figura 12), lo cual ya había sido reportado por otros autores (Tabla 12). También se evaluó la integridad de la membrana con el ensayo azul de tripano (Figura 13), con este ensayo se observó que las dosis empleadas tampoco comprometen la integridad de la membrana de las células apoyando los resultados obtenidos con el ensayo de MTS.

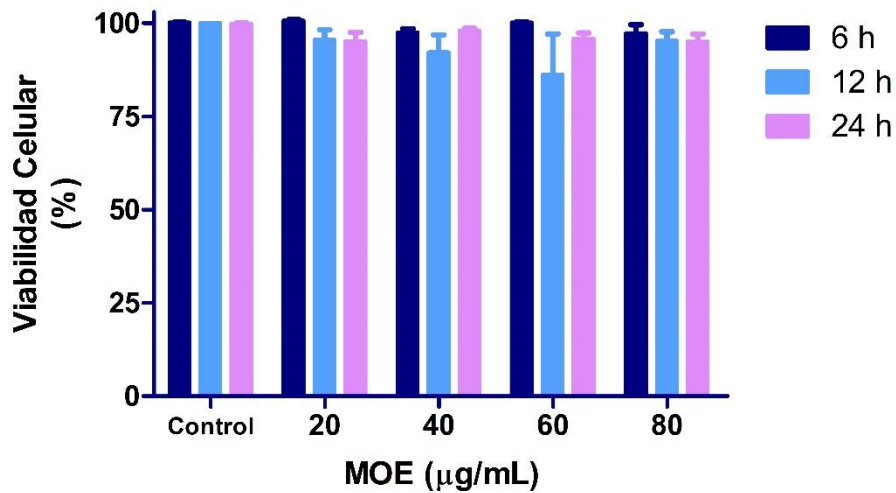


Figura 12. Efecto de la exposición a MOE de PM<sub>2.5</sub> en la viabilidad de las células A549 utilizando el ensayo de MTS. Células A549 tratadas con 20, 40, 60 y 80 µg de MOE por 6, 12 y 24 h. Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. No hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (p=0.999), Kruskal-Wallis.

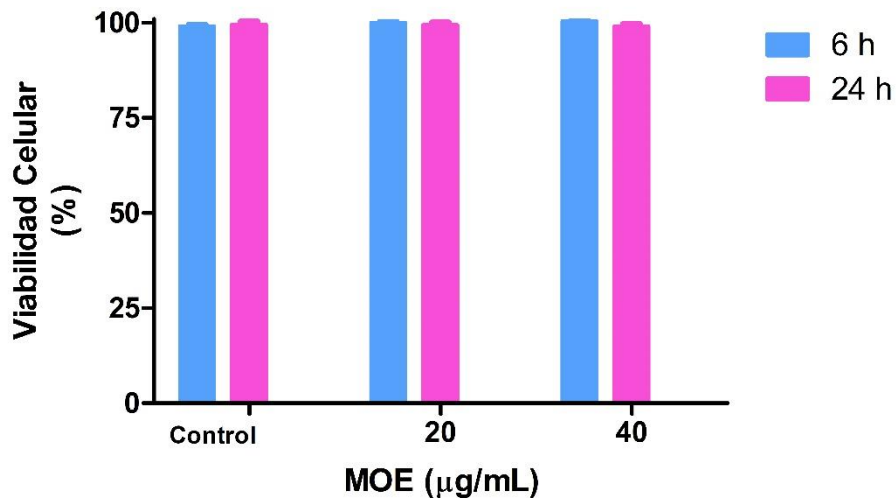


Figura 13. Efecto de la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub> en la viabilidad de las células A549, mediante el ensayo de azul de tripano. Células A549 expuestas a 20 y 40 µg/mL de MOE por 6 y 24 h. Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. No hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (p=0.293 a las 6h y p=0.999 a las 24h), Kruskal- Wallis.

### 3.2.4 Formación intracelular de ERO por la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub>

Debido a que los componentes orgánicos de PM<sub>2.5</sub> pueden inducir la producción intracelular de radicales libres a través del metabolismo, una vez formados estos radicales pueden llegar a oxidar a las células del pulmón, el cual es considerado como la principal causa de lesiones en este tejido por la exposición a PM (Donaldson y Beswich, 1996, Kelly, 2003). Además, la acumulación excesiva de ERO generadas por los HAP disminuye los niveles de proteínas de unión, lo que resulta en una mayor interrupción de la barrera en el epitelio pulmonar y desencadena procesos inflamatorios (Oh *et al.*, 2011). Por lo anterior se evaluó la capacidad de la MOE para inducir la formación de ERO (principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La exposición a MOE fue capaz de incrementar significativamente la fluorescencia de la DCF (Figura 14), esto indica que hay una oxidación de esta molécula a causa de las ERO intracelulares (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), este incremento se observó desde la primera hora post-exposición y se mantuvo a las 6 y 12 h. La intensidad de la fluorescencia de la DCF a las 24 h fue más moderada que la observada en los tiempos anteriores, sin embargo, este incremento también fue significativo ( $p = 0.001$ ).

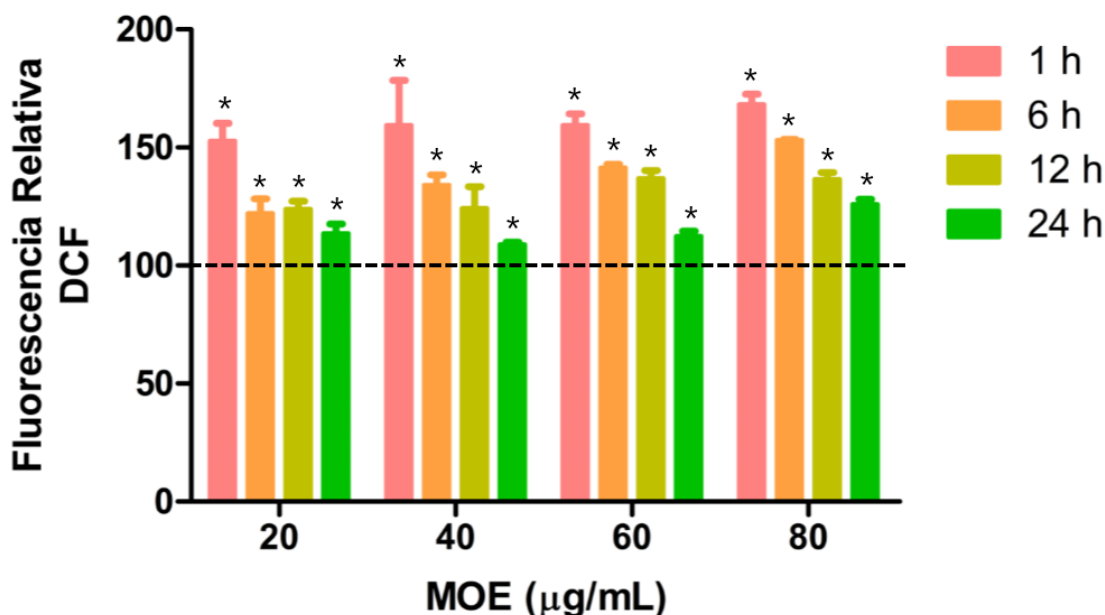


Figura 14. Formación de especies reactivas de oxígeno por la MOE de PM<sub>2.5</sub> en A549. Ensayo de DCHF-DA. Células A549 expuestas con 20, 40, 60 y 80 μg de MOE por 1, 6, 12 y 24 h. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. La línea punteada indica los valores normalizados del control. (\*) denota diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $p=0.001$ ) utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.

### **3.2.5 Inducción de las enzimas del metabolismo de los HAP: CYP1A1 y NQO1; de las enzimas antioxidantes SOD-2, HO-1 y $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub> en células A549**

#### **3.2.5.1 Inducción de las enzimas del metabolismo de los HAP: CYP1A1 y NQO1**

La hipótesis de este estudio fue que la MOE tiene compuestos con una alta capacidad de inducir al CYP1A1 como son los HAP. En este estudio se identificaron 25 HAP, algunos de los cuales se sabe que tienen la capacidad de activar el metabolismo de las células e incluso generan especies reactivas de oxígeno durante el proceso de detoxificación (*Abbas et al.*, 2008; *Hiura et al.*, 2000; *Li et al.*, 2002). Por ello, se decidió evaluar las proteínas del metabolismo de fase I y de fase II (CYP1A1 y NQO1) a concentraciones subtóxicas a 6 y 24 h, a través de la medición de la cantidad de proteínas por inmunodetección.

Se utilizaron 40  $\mu$ g de proteínas de cada uno de los tratamientos para realizar la inmunodetección de CYP1A1. En la figura 15 inciso (a) se observa una inmunodetección representativa de CYP1A1 a las 6 h post-exposición mientras que en el inciso (b) se presenta el análisis densitométrico correspondiente. Mientras que en el inciso (c) y (d) están representados de igual forma los resultados obtenidos por la exposición a 24 h.

La inmunodetección logró determinar la presencia de CYP1A1 en el grupo control, pero en los tratamientos con MOE (20 y 40  $\mu$ g/mL) se observó un incremento significativo de esta proteína con respecto al control ( $p=0.0464$ ). Por otro lado, a las 24 h post-exposición se observó un decremento significativo de esta proteína con respecto al control ( $p=0.0036$ ) (Figura 15 inciso c y d).

La inmunodetección también logró determinar la presencia de NQO1 en el grupo control a las 6 h post-exposición, pero en los tratamientos con MOE (20 y 40  $\mu$ g/mL) no se observó un incremento significativo de esta proteína con respecto al control ( $p=0.8180$ ). Este comportamiento se repitió a las 24 horas ya que en este tiempo de exposición tampoco se observó un incremento significativo de esta proteína con respecto al control ( $p=0.7107$ ) (Figura 16).

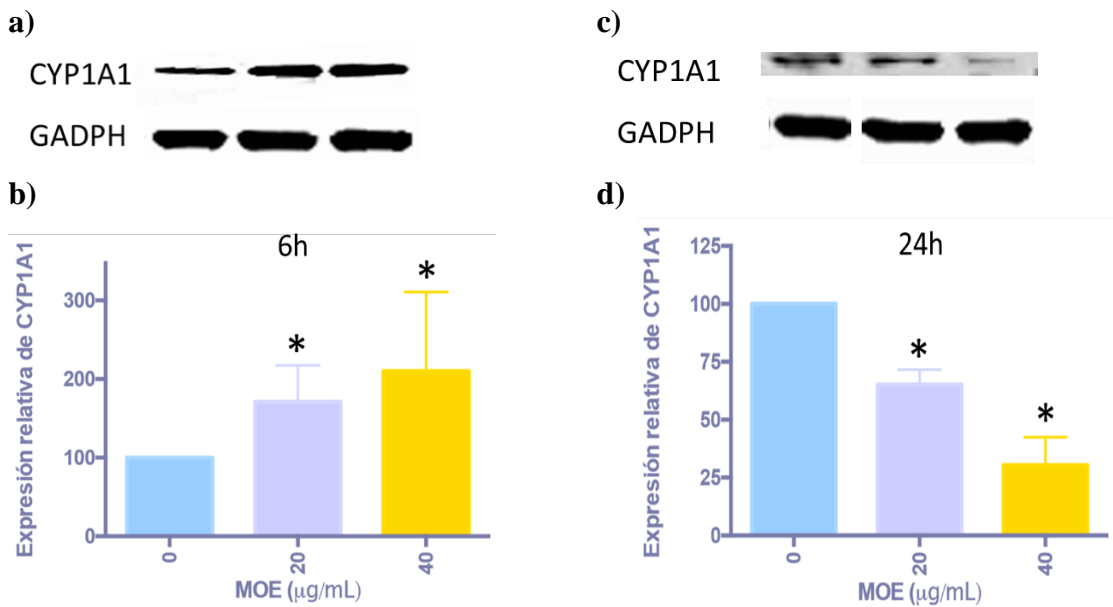


Figura 15. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de CY1A1 en células A549. **a)** y **b)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de CYP1A1 a las 6h; **c)** y **d)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de CYP1A1 a las 24h. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.

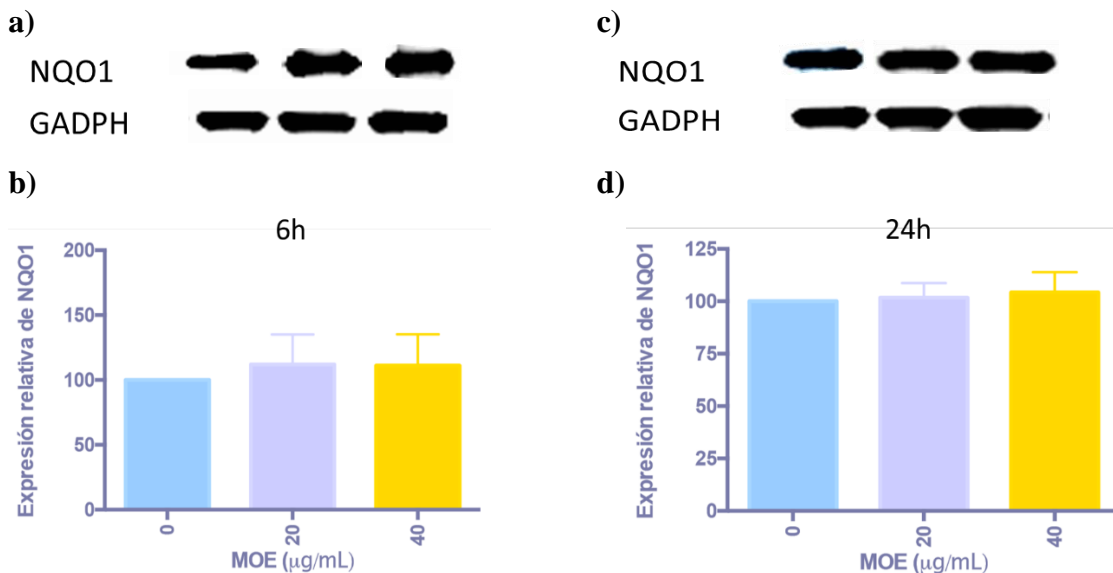


Figura 16. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de NQO1 en células A549. **a)** y **b)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de NQO1 a las 6h; **c)** y **d)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de NQO1 a las 24h. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.

### 3.2.5.2 Inducción de las enzimas antioxidantes SOD-2, HO-1 y $\gamma$ -GCS

La actividad de CYP1A1 en el sistema respiratorio lleva a cabo la biotransformación de los HAP a través de reacciones de oxidación para originar compuestos más hidrosolubles que se puedan eliminar del organismo, sin embargo, como parte de este proceso se lleva a cabo la formación de ERO (García 2008; Lomguin *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2011; Shenberger *et al.*, 2002).

Los resultados indicaron que la MOE fue capaz de incrementar significativamente la fluorescencia de la DCF indicando la presencia de radicales intracelulares y cuyo incremento en la cantidad puede desencadenar daño oxidante en diferentes biomoléculas incluyendo peroxidación de lípidos, disfunción de proteínas, daño al DNA y muerte celular, generando enfermedades respiratorias, cardiovasculares o cáncer (Risom *et al.*, 2005). Es por ello, que se decidió evaluar la cantidad de proteína de algunas enzimas de defensa antioxidante que controlan las cantidades de ERO en las células (SOD2, HO-1 y  $\gamma$ -GCS).

La figura 17 (a) ilustra la inmunodetección representativa de SOD-2 a las 6 horas post-exposición, mientras que el inciso (b) presenta el análisis densitométrico correspondiente. La exposición a 20 y 40  $\mu\text{g/mL}$  de MOE indujeron a esta proteína, aunque la dispersión de los datos evitó que esto tuviera significancia estadística con respecto al control ( $p=0.1357$ ); no observándose variación en su concentración a las 24 h ( $p=0.7107$ ) (Figura 17 c y d). Este mismo comportamiento se observó con HO-1 pero nuevamente la dispersión de los datos a las 6 h de exposición evitó que este incremento tuviera significancia estadística con respecto al control ( $p=0.8180$ ). A las 24 h post-exposición se observó que la expresión relativa de HO-1 en los tratamientos es igual a la del control ( $p=0.7107$ ) (Figura 18).

Con respecto a la  $\gamma$ -GCS se observó la misma cantidad de proteína tanto en el grupo control como en los tratados a las 6 h post-exposición ( $p=0.7107$ ), sin embargo, a las 24 h post-exposición se observó que los tratamientos con 20 y 40  $\mu\text{g/mL}$  de MOE inducen un incremento significativo de esta proteína con respecto al control ( $p=0.0071$ ) (Figura 19).



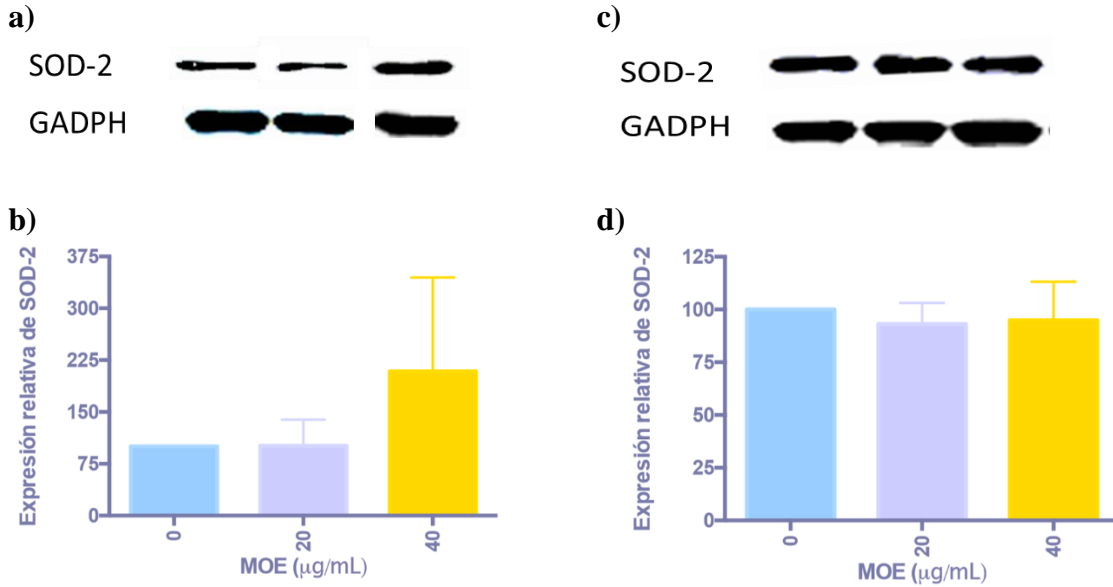


Figura 17. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de SOD-2 en células A549. **a)** y **b)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de SOD-2 a las 6h; **c)** y **d)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de SOD-2 a las 24h. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.

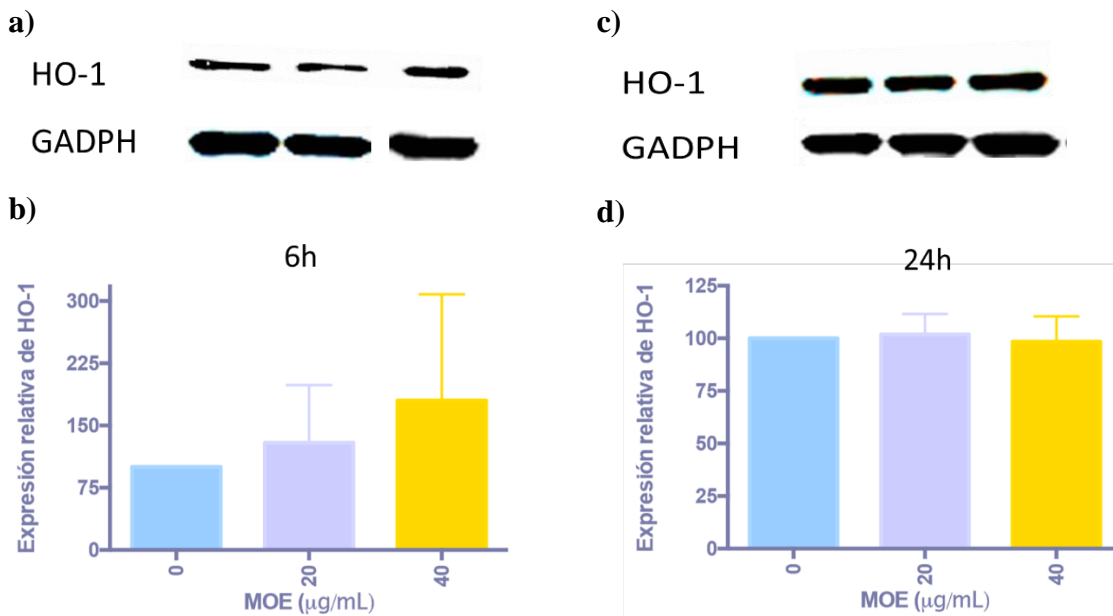


Figura 18. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de HO-1 en células A549. **a)** y **b)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de HO-1 a las 6h; **c)** y **d)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de HO-1 a las 24h. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.

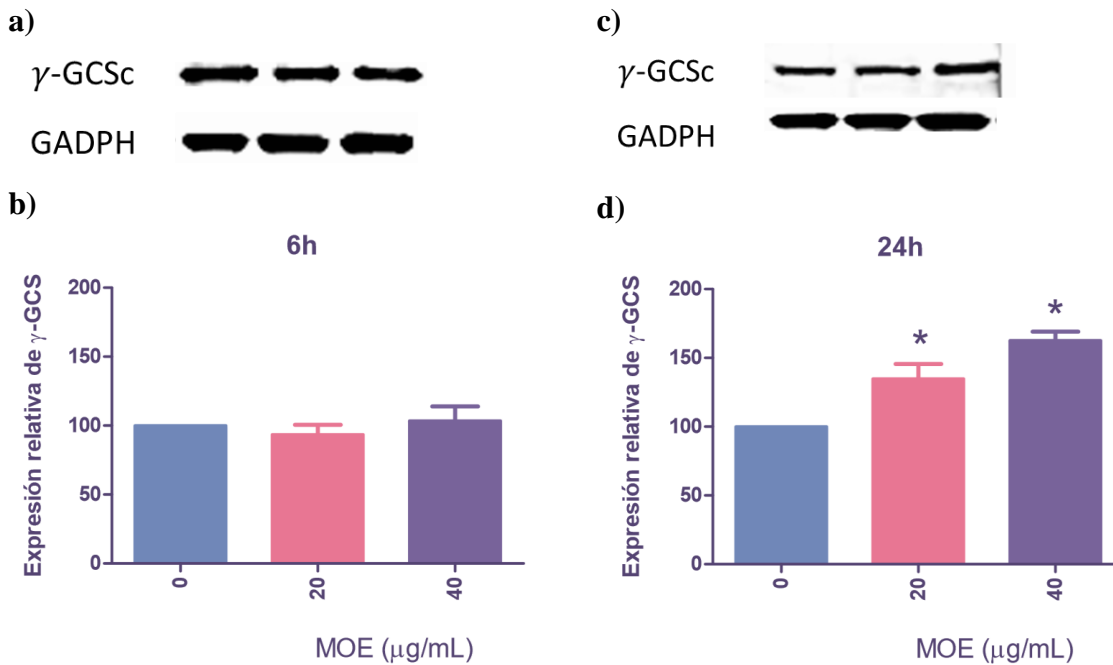


Figura 19. Efecto de la MOE sobre la expresión relativa de  $\gamma$ -GCS en células A549. **a)** y **b)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de  $\gamma$ -GCS a las 6h; **c)** y **d)** Western Blot representativo y cuantificación densitométrica de la expresión relativa de  $\gamma$ -GCS a las 24h. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control utilizando una prueba de Kruskal- Wallis.

Se determinó que la MOE de  $\text{PM}_{2.5}$  no tiene la capacidad de afectar la viabilidad celular de las células de epitelio alveolar (A549). También se observó que todas las concentraciones evaluadas son capaces de inducir la formación de ERO en todos los tiempos; así como la actividad de CYP1A1 ayudando a inferir que se esté llevando a cabo la biotransformación de los HAP a través de reacciones de oxidación para originar compuestos más hidrosolubles que se puedan eliminar del organismo, estimulando concomitantemente la formación de ERO y favoreciendo la activación del sistema antioxidante en la célula. Esto también se demostró debido al incremento a las 24h de la  $\gamma$ -GCS. Por lo tanto, la exposición a MOE extraída de  $\text{PM}_{2.5}$  tiene la capacidad de alterar marcadores celulares como la generación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de las enzimas del metabolismo y antioxidantes.

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Composición química de PM<sub>2.5</sub>

Las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> solo rebasaron 5 días el límite máximo permisible establecido de 45 µg/m<sup>3</sup> (NOM-025-SSA1-2014), sin embargo, si se consideran los límites máximos permisibles establecidos por la EPA (Tabla 10) para la protección de la salud, se rebasó en mas del 50% de los días del periodo de muestreo. Se ha observado que un incremento de 10 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>2.5</sub> aumenta entre 4 y 8% el riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón y enfermedades cardiopulmonares (Valavanidis *et al.*, 2007). Por lo anterior, se puede sugerir que los niveles constantes de PM<sub>2.5</sub> en la Ciudad de México son perjudiciales a la salud de la población.

**Tabla 10. Límites máximos establecidos para PM<sub>2.5</sub> en normas nacionales e internacionales**

Contaminante	Tiempo de exposición	EPA (2017) <sup>1</sup>	OMS (2016) <sup>2</sup>	Norma Oficial Mexicana (NOM-025-SSA1-2014)
PM <sub>2.5</sub>	24 horas	25 µg/m <sup>3</sup>	45 µg/m <sup>3</sup>	45 µg/m <sup>3</sup>
	Promedio anual	10 µg/m <sup>3</sup>	12 µg/m <sup>3</sup>	12 µg/m <sup>3</sup>

Por otro lado, la extracción de MOE de PM<sub>2.5</sub> llevada a cabo en este trabajo, fue de 15.5 %, valor similar a lo reportado por Amador-Muñoz y colaboradores (2011), donde encontraron que en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) la MOE representó del 12.8 al 43% de las PM<sub>2.5</sub>, y similares resultados fueron hallados en MOE de PM<sub>2.5</sub> colectadas en el centro de la ZMVM donde la MOE represento el 15.2% (Valle-Hernández *et al.*, 2010). Aunque se observan variaciones que podrían deberse a factores como la estación del año, la región, las fuentes de emisión y las interacciones entre sus componentes orgánicos e inorgánicos (Yi-Yang *et al.*, 2017), el rango de MOE en PM<sub>2.5</sub> obtenido en este trabajo es representativo de lo reportado en la literatura.

Las concentraciones más altas de HAP se observaron en aquellos que tienen una masa molecular mayor a 228 g mol<sup>-1</sup> y las concentraciones menores en aquellos que tienen un peso molecular inferior a 228 g mol<sup>-1</sup>, debido a sus propiedades fisicoquímicas, principalmente por la presión de vapor (indica el potencial del HAP para volatilizarse), los HAP menores a 228 tienen una presión de vapor que va de 11 a 0.13 Pa (Tabla 3) y esto hace que pasen a

fase gaseosa con facilidad, mientras que los de alto peso molecular tienen una presión de vapor que va de 0.01 a 0.002 Pa, por tanto, van a permanecer principalmente en fase particulada y son los que se observan con mayor concentración en CINVESTAV, Zacatenco.

También se observó que 8 de los 25 HAP identificados han sido clasificados por la IARC como carcinogénicos para humanos (Tabla 11). Esto se debe a que los metabolitos de algunos HAP tienen una alta capacidad de unirse al ADN, por lo que estos compuestos han recibido especial atención por sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Vera *et al.*, 2017). Livalova y colaboradores (2014) indicaron que los HAP con 5 o más anillos bencénicos son lo que más contribuyen con la toxicidad y genotoxicidad, esto es de preocupación ya que son los compuestos que presentan mayor concentración en la zona de estudio. Además, estos resultados apoyan descripciones previas donde se sugiere que las partículas con menor diámetro contienen altos porcentajes de HAP carcinogénicos (Hassanvand *et al.*, 2015).

**Tabla 11. Clasificación del potencial carcinogénico de los HAP por la IARC 2010.**

HAP	Grupo	HAP	Grupo
Naftaleno	3	Benzo[ <i>a</i> ]antraceno	2B
Acenaftileno	3	Criseno	3
Acenafteno	3	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno	2B
Fluoreno	3	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno	2B
Fenantreno	3	Benzo[ <i>a</i> ]pireno	1
Antraceno	3	Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno	3
Fluoranteno	3	Indeno[ <i>1,2,3-cd</i> ]pireno	2B
Pireno	3	Dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno	2 <sup>a</sup>

Grupo 1: Carcinogénico en humanos; Grupo 2A: Probable carcinogénico en humanos; Grupo 2B: Posible carcinogénico en humanos; Grupo 3: No carcinogénico en humanos.

Se realizó la representación gráfica de los HAP por número de anillos ya que se ha establecido que una propiedad fisicoquímica que podría explicar las concentraciones de HAP es el número de anillos, los HAP de dos y tres anillos se encuentran preferentemente en la fase gaseosa y esto explicaría por qué se observaron concentraciones menores a 250 pg/m<sup>3</sup>, de igual forma se ha observado que los HAP con tres y cuatro anillos están entre la fase gaseosa

y la fase particulada, y para este estudio presentaron concentraciones intermedias, las cuales fueron menores a  $650 \text{ pg/m}^3$ ; finalmente los HAP de cinco anillos o más están unidos a las partículas, los cuales se observaron con concentraciones de hasta  $1100 \text{ pg/m}^3$  (Figura 8, 9, 10) (Sogri, 2007; Abbas *et al.*, 2018). En este trabajo, además de cuantificar a los HAP contenidos en las  $\text{PM}_{2.5}$  colectadas, se llevó a cabo su identificación, con la intención de identificar las fuentes de emisión, y posteriormente evaluar los posibles efectos tóxicos en un modelo *in vitro*.

#### **4.2 Identificación de fuentes de emisión de los HAP**

Las correlaciones con contaminantes criterio indican que los HAP son contaminantes atmosféricos relacionado con la combustión primaria (Wittkop *et al.*, 2011). Esto se ve favorecido por las condiciones meteorológicas, estudios previos han indicado que en la época de secas frías (noviembre-enero) se incrementa la concentración de los contaminantes primarios emitidos por fuentes de combustión debido al fenómeno de inversión térmica, que es un estado donde el gradiente térmico habitual de la troposfera esta invertido y en donde la temperatura aumenta con la altura, esto hace que el volumen de la capa de mezcla que contiene a los contaminantes atmosféricos se vea reducida y que exista poca dispersión debido a que en estas condiciones los movimientos verticales son reducidos y los movimientos turbulentos casi inexistentes (Amador-Muñoz *et al.* 2011; Palacio *et al.*, 2016; Freneal *et al.*, 2009; MohseniBandpi *et al.*, 2017).

Se ha reportado que las correlaciones de HAP con contaminantes primarios específicos también puede ayudar a identificar posibles fuentes de emisión. Los HAP que se correlacionan principalmente con NO provienen de combustión incompleta de diésel, los que lo hacen con CO provienen de gasolina y los que lo hacen con  $\text{SO}_2$  con actividades industriales (Amador-Muñoz *et al.*, 2010, 2011, 2013; Martínez-Domínguez, 2018). Por lo tanto, de las correlaciones calculadas de HAP obtenidas en este trabajo con los contaminantes criterio se puede inferir que 8 HAP muy probablemente se estén emitiendo de combustión incompleta de diésel, 11 de gasolina y solamente antraceno, fluoranteno y benzo[j]fluoranteno de emisiones industriales (Tabla 8) (Amador-Muñoz *et al.*, 2010, 2011, 2013; Martínez-Domínguez, 2018).

Asímismo, no se observó una correlación de  $PM_{2.5}$  con 12 HAP lo que sugiere que el PM tiene una distribución más limitada, y como los HAP identificados son de PM que están a 5 Km de distancia del sitio donde se colectó el  $PM_{2.5}$ , esta distancia podría ser un factor que limite la correlación de los mismos, aunque la correlación de los HAP con contaminantes primarios en fase gas, nos indica que estos contaminantes criterio tienen una distribución más amplia que el PM, aspecto que ya había sido reportado por otros autores (Amador-Muñoz *et al.*, 2011; Martínez-Domínguez, 2018).

Otro método de identificación de fuentes son las tasas de diagnóstico de HAP, que es utilizar el perfil y la relación entre los isómeros de HAP y que se utiliza para determinar la contribución de las diferentes fuentes de emisión (Tabla 5) (Ravindra *et al.*, 2008). De acuerdo a los valores obtenidos en este trabajo, las tasas de  $\Sigma BPM / \Sigma APM$  y  $Ant / (Ant + Fen)$  (Tabla 9) y se infiere que los HAP provienen de procesos pirogénicos. Por otro lado, los valores obtenidos en la tasa de  $Flt / (Flt + Pir)$  permiten deducir que la presencia de estos HAP en el aire se podría deber a la combustión incompleta de combustibles fósiles, además la tasa  $BaP / BghiP$  y  $Flt / Pir$  indicaron que muy probablemente se asocian a emisiones vehiculares.

Por otro lado, los valores calculados en las tasas de  $I123cdP / (I123cdP + BghiP)$ ,  $Fno / (Fno + Pir)$ ,  $BaP / (BaP + Cris)$  y  $BbF / BkF$  permite inferir que los HAP podrían tener como fuente de emisión la combustión incompleta de diésel, ya que los valores se obtuvieron con HAP que son diferentes. Finalmente, solo 1 de los valores calculados se encuentran en los valores ponderados que asocia la presencia de estos HAP a la combustión incompleta de gasolina ( $I123cdP / BghiP$ ).

La inestabilidad de algunos HAP ha hecho que se cuestione el uso de estas tasas (Galarneau 2008; Katsoyiannis *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2005), sin embargo, no deja de ser una herramienta que puede ser de utilidad si se complementa con otros métodos de identificación de fuentes. En este trabajo tanto la correlación de HAP con CO y NO, así como el valor de la tasa correspondiente dan sustento a que la presencia de estos compuestos provienen de emisiones primarias. Por otro lado, usando la correlación con ciertos contaminantes criterio se llegó a la conclusión de que las emisiones fueron por combustión incompleta de diésel, lo

cual es también apoyado por el resultado obtenido en las tasas de diagnóstico; es interesante que aún cuando se ha reportado que las emisiones de gasolina están constituidas principalmente de PM<sub>2.5</sub> debido a que en su proceso de combustión no se alcanzan las altas temperaturas como en la combustión de diésel (Gillies y Alan, 2000) 4 de las tasas de diagnóstico obtenidas permitan inferir que los HAP tienen esta fuente de emisión, esto indica que hay un alto el uso de este combustible en la zona norte, lo que coincide con los análisis de tipo de transportes utilizados en esta región (SMA-GDF, 2018).

Si consideramos que los HAP generalmente se encuentran como mezclas complejas en el aire (Domingo y Nadal 2015), es un reto analítico contar con métodos de muestreo y análisis confiables que permitan realizar su especiación química de una manera rápida, eficiente, poco contaminante por los residuos generados, altamente sensible y sin interferencias (Elmes y Gasparon, 2017), por lo tanto la metodología empleada en este trabajo también contribuye a que los resultados obtenidos utilizando celdas de extracción a microescala asistidas por ultrasonido con reflujo (CEMAUF) y la respectiva cuantificación por medio de un CG-EM utilizando curvas de calibración o dilución isotópica sean robustos y confiables ya que cumplen con estos requerimientos.

#### **4.3 Efecto de la exposición a MOE en la viabilidad de las células A549**

Los resultados obtenidos de la viabilidad evaluada por la exposición de células de epitelio alveolar humano A549 expuestas a la MOE de PM<sub>2.5</sub> muestran que no se compromete ni la actividad de la mitocondria, ni la permeabilidad de la membrana en las células, lo que coincide con lo reportado por otros autores (Tabla 12). Sin embargo, MohsaniBandpi y colaboradores (2017) sugieren un efecto citotóxico por la exposición a MOE, en este trabajo se utilizaron concentraciones similares, pero, el número de células fue mucho menor ( $1 \times 10^4$  células/mL) que en el presente estudio ( $3.8 \times 10^4$  células /mL). Considerando la naturaleza de estas células, donde el contacto célula-célula es determinante para su desarrollo y proliferación, los resultados de MohsaniBandpi y colaboradores (2017) podrían representar el efecto aditivo de exposición a MOE y de las células que mueren por falta de contacto con células adyacentes. Asimismo, Lívalova y colaboradores (2014) utilizaron concentraciones muy semejantes a las que se utilizaron en este estudio e indicaron que éstas son

concentraciones subtóxicas, lo cual es apoyado por los resultados obtenidos en otros estudios (Tabla 12).

**Tabla 12. Ejemplos de la evaluación de la citotoxicidad celular de MOE.**

Ensayo	Método de extracción	Modelo celular	Observación	Referencia
MTT	PM <sub>2.5</sub> /EAS y C/ DCM	BEAS-2B(3h)/APC (30min)	No hay efecto	Chuwadury <i>et al.</i> , 2017 Honda <i>et al.</i> , 2017
	PM <sub>2.5</sub> / EAS / DCM	Esplenocitos / 0, 7.5, 22.5 y 75 µg/mL MOE y EAS A549/25, 50 y 100 µg/mL MOE	50 y 100 µg/mL reduce hasta un 60% la viabilidad	MohsaniBandpi <i>et al.</i> , 2017
	PM <sub>2.5</sub> / EAS / DCM	A549 (3h) 10, 30, 60 µg/mL MOE 1nM BaP / 10 nM BkF	No hay efecto	Livalova <i>et al.</i> , 2014
LDH				
	PM <sub>2.5</sub> Soxhlet (16h)/ DCM	A549 15 µg/mL MOE • Monocapa • 3D	No hay efecto	Ferraz <i>et al.</i> , 2017
IP	DEP /Soxhlet (16h) / DCM	16 HBE/15 µg/mL	No hay efecto	Bonvallot <i>et al.</i> , 2001

EAS: Extracción asistida por sonicación; EAS y C: extracción asistida por sonicación y centrifugación, A549: células epiteliales alveolares, BEAS-2B: células epiteliales bronquiales, 16-HBE: células epiteliales bronquiales no inmortalizadas, MOE: Materia orgánica extraída, BaP: benzo[a]pireno, BkP: benzo[k]pireno, nM: nanomoles, µg/mL: microgramos por mililitro, DCM: diclorometano.

Además de considerar la ruptura de la membrana como marcador de daño, otros estudios han reportado que algunos HAP interactúan con la membrana celular e inducen cambios en la estructura de la bicapa lipídica, esto se presenta debido a interacciones entre las moléculas de fosfolípidos y los HAP que afectan la estructura de los lípidos y de este modo su movilidad de giro, lo que lleva a comprometer la interacción entre las cadenas de fosfolípidos y aumentar la flexibilidad interna influyendo en los procesos de permeabilidad y de transporte a través de la membrana (Farkas *et al.*, 2004). Un evento que podría ser de interés para futuros



estudios, evaluar la modificación en la estructura de la membrana es importante porque permitiría detectar de manera temprana efectos adversos en el epitelio. Si la estructura de la membrana se ve comprometida puede alterar las reacciones bioquímicas en el interior de la célula y causar daños en los procesos fisiológicos favoreciendo el daño tisular del órgano expuesto (Farkas *et al.*, 2004).

#### **4.4 Efecto de la exposición a MOE en la formación de ERO en las células A459**

Estudios previos han demostrado que la MOE del PM posee actividad prooxidante (Livalova *et al.*, 2018), la cual es uno de los modos de acción inducido por la exposición a PM y como se indica una de las principales causas de lesiones (Donaldson y Beswick, 1996; Kelly, 2003). Por lo anterior, se decidió evaluar la generación intracelular de las especies reactivas de oxígeno por la exposición a MOE de PM<sub>2.5</sub> a concentraciones de 20, 40, 60 y 80 µg /mL en tiempos de 1, 6, 12 y 24 h (Figura 17).

Los resultados obtenidos indican que efectivamente hay un incremento en la formación de ERO en todas las concentraciones de MOE expuestas, este efecto se observa desde 1 hora y se mantiene a 6 y 12 horas, y aun cuando se observa que a 24 horas hay una aparente disminución de ERO casi al nivel del control, la diferencia con respecto al control sigue siendo estadísticamente significativa. Estos resultados coinciden con los reportados previamente en otros estudios, donde también se observó un incremento en la formación de ERO, tanto en células epiteliales bronquiales como en alveolares proporcional a la concentración de la MOE (BEAS-2B y A549) (MohseniBandpi *et al.*, 2017, Min-Oh *et al.*, 2011).

Gualtieri y colaboradores (2007) reportaron en células A549 expuestas durante 2 h a 10, 50, 60 y 75 µg /mL de MOE de DEP un incremento en la formación de ERO; esto también se observó cuando se expusieron células epiteliales bronquiales (BEAS-2B) a 7.5 µg/mL de MOE de PM<sub>2.5</sub> colectadas en invierno, la MOE indujo hasta 2 veces más la formación de ERO (Longhin *et al.*, 2013). Tanto Gualtieri y colaboradores (2007) como Longhin y

colaboradores (2013) coinciden que las ERO generadas por la exposición a MOE están localizadas en el citosol.

Aunque Longhin y colaboradores (2013) son los únicos que corrobora esta inferencia, estos autores analizaron la presencia de ERO en la mitocondria por medio de análisis con microscopia de fluorescencia en células de epitelio bronquial (BEAS-2B) expuestas a 7.5 µg/mL de fracción orgánica, estos autores reportan que la ausencia de la formación de superóxido mitocondrial descarta que la mitocondria esté involucrada en la producción de ERO. Considerando estos resultados, sugieren que la fracción orgánica es responsable de la producción de ERO a través de la activación metabólica de varios HAP y oxi-HAP. Si la mitocondria fuera la que estuviera generando las ERO se observarían daños en su estructura, como la perturbación de la permeabilidad y la consecuente disrupción en la transferencia de electrones resultando en apoptosis o necrosis (Li *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos con los ensayos de MTS sugieren que su observación es acertada ya que ninguna de las concentraciones de MOE afecta la actividad mitocondrial.

Los extractos de partículas de escape de diésel (DEP) causaron un aumento de ERO en las células epiteliales bronquiales humanas (16HBE) después de una exposición de 4 h (Wöhrnschimmel *et al.*, 2008). También han reportado la inducción de ERO en células A549 expuestas durante 1 h a varias concentraciones de extractos de PM relacionado con el tráfico (Mao *et al.*, 2005); otro estudio desarrollado con PM<sub>2.5</sub> colectadas en París se observó una fuerte actividad generadora de ERO en células epiteliales bronquiales humanas después de 4 h de exposición, incluso extractos de partículas de escape de motocicletas causaron un aumento dependiente de la dosis en los niveles de ERO después de un tratamiento de 1 h en células musculares lisas vasculares de rata (Gómez-Perales *et al.*, 2007) e incluso en células de hígado HepG2 los extractos orgánicos de PM<sub>10</sub> indujeron la producción de ERO después de 1 h de tratamiento (Murillo-Tovar *et al.*, 2010). Esto muestra que los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con la bibliografía reportada en los últimos años.

Los resultados indican que la generación de ERO por la MOE presenta cambios dependientes del tiempo (1-24 h), observando niveles máximos de ERO a concentraciones más altas y

periodos de incubación más cortos (1 h), seguido de una disminución gradual de los niveles de ERO después de las 6 h, lo que ha sido ya previamente reportado por Livalova y colaboradores (2018). El análisis detallado del curso temporal de la producción de ERO realizado por estos autores muestra claramente que hay una caída pronunciada en la formación de ERO con respecto al tiempo, en líneas celulares de pulmón (A549) y fibroblastos de pulmón embrionario humano (HEL12469), también indicaron que la reducción de ERO y de los niveles del anión superóxido difiere entre las líneas celulares (la respuesta fue más pronunciada en las células HEL12469) y que cambios en los niveles de ROS se asociaron con una inducción de la actividad antioxidante que era específica para la línea celular y las condiciones de tratamiento mostrando claramente una mayor actividad prooxidante de la MOE.

Longhin y colaboradores (2013) señalaron la probabilidad de que la fracción orgánica induzca ERO a través de la activación metabólica de CYP1A1 estimulada por varios HAP y oxi-HAP contenidos en la MOE. Es muy probable que se presente este proceso en nuestros experimentos, ya que los HAP interactúan con AhR activando posteriormente al elemento de respuesta a xenobióticos que activa a factores de transcripción que regula la expresión de genes tales como el citocromo CYP1A1, 1A2 y 1B1, incluyendo otras enzimas metabólicas de biotransformación de fase II como glutatión transferasa y NQO1 (Figura 1) (Abbas *et al.*, 2018). Longhin y colaboradores (2013) también sugieren que la respuesta del AhR es de importancia porque explica la toxicidad de varios tipos de PM y de su fracción orgánica ya que los efectos podrían asociarse a la formación de ERO y de otros metabolitos altamente reactivos formados por la activación del AhR y CYP1A1.

Ahora bien, como las células epiteliales de las vías respiratorias sirven como barrera natural, evitando la entrada de los xenobióticos o agentes extraños inhalados a los tejidos, la acumulación excesiva de ERO generadas por los HAP disminuye los niveles de proteínas de unión, oxida lípidos de la membrana u otras proteínas presentes en el citosol, lo que resulta en una mayor interrupción de la barrera en el epitelio pulmonar. Ello provoca que la barrera epitelial sea permeable y favorezca el ingreso de patógenos y xenobióticos inhalados en los tejidos, comprometiendo de forma irreversible la funcionalidad de este tejido. La

permeabilidad de la membrana es uno de los primeros signos de enfermedad pulmonar, asociada a la exposición a PM<sub>2.5</sub> (Lingyan *et al.*, 2017; Farkas *et al.*, 2004), ya que cuando hay una interrupción de la comunicación entre las células se compromete la homeostasis, el control del desarrollo y del crecimiento del tejido (Kabátková *et al.*, 2015), crecimiento celular aberrante, hipertrofia y patogénesis de numerosas enfermedades crónicas, muchas de las cuales están asociadas con la destrucción y/o remodelación de tejidos (Shenberger *et al.*, 2002).

#### **4.5 Inducción de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1; y de las antioxidantes SOD-2, HO-1, y $\gamma$ -GCS tras la exposición a la MOE de PM<sub>2.5</sub> en A549**

##### **4.5.1 Inducción de las enzimas del metabolismo de HAP: CYP1A1 y NQO1**

Los resultados de la inmunodetección de proteínas involucradas en la biotransformación de HAP mostraron un incremento significativo en la proteína CYP1A1 a las 6 h y un decremento significativo con respecto al control a las 24 h. Se decidió evaluar la cantidad relativa de proteína CYP1A1 debido a que este citocromo ha sido reportado previamente que responde ante la presencia de HAP, aumentando su expresión en los pulmones (Abbas *et al.*, 2018).

Los HAP activan la transcripción de esta proteína debido a su unión con AhR. Se sabe que uno de los HAP que tiene la capacidad de activar al receptor AhR es el benzo[*a*]pireno compuesto con alta concentración entre de los HAP identificados en este estudio (Figura 10). Esto aunado a la presencia de benzo[*b*]fluorantreno, benzo[*k*]fluorantreno y dibenzo [*a,h*]antraceno que también fueron identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub> (Figura 5 y 7) y que también se ha indicado que tienen la capacidad de unirse a este receptor, incrementan la probabilidad de que se vea favorecida la activación del metabolismo en estas células.

Este incremento significativo en CYP1A1 a las 6 horas post-exposición tanto en 20, como en 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  coincide con lo reportado por otros autores, los cuales ya habían observado una inducción del gen de CYP1A1 en homogenados pulmonares de ratas expuestas a partículas completas de DEP, este autor indicó que la inducción del gen de CYP1A1 permite la lixiviación de compuestos orgánicos desde las partículas a las células diana (Ávila-Rosales,

2014). En otro estudio en el que utilizó hollín de butadieno sugiere que la transferencia de HAP a la célula se producen por contacto directo de los hollines y la membrana plasmática. También se confirmó la expresión de genes de respuesta al AhR incluyendo el CYP1A1 en células epiteliales bronquiales (BEAS-2B) (Murphy *et al.*, 2007), así como, también se ha indicado que las citocinas pro-inflamatorias inducen a genes blancos del AhR entre ellos CYP1A1 y CYP1B1 (Kabátková *et al.*, 2015); estos autores observaron que el fenantreno incrementa significativamente la inducción de ambos citocromos; compuesto que también fue identificado en la MOE de PM<sub>2.5</sub> en la zona de estudio (Figura 5 y 7). Considerando lo anterior y en función de los resultados obtenidos con CYP1A1 a las 6 horas se verificó la activación metabólica de las células A549 por la MOE.

Por otro lado, a las 24 h post-exposición se observó un decremento significativo de CYP1A1 con respecto al control ( $p=0.0036$ ) (Figura 15 c y d), este fenómeno podría ser explicado por 3 mecanismos: a) inhibición de la transcripción de genes asociados al metabolismo por la activación del antagonista de AhR (AhRR), ya que este receptor puede detener la transcripción iniciada en el elemento de respuesta a xenobióticos o bien competir por la formación del heterodímero como ha sido descrito por Kabátková *et al.*, 2015, b) proceso inhibitorio de otros compuestos orgánicos en la MOE, esto ya se ha observado en ensayos con *S. typhimurium* donde se observó que hay una disminución de la actividad mutagénica por los compuestos no polares (Villalobos-Pietrini *et al.*, 2007); los ácidos oleico, linoleico y palmítico disminuyen hasta 75% la mutagenicidad de los extractos de las aeropartículas en muestras colectadas en ciudades japonesas (Iwado *et al.*, 1991), compuestos previamente reportados como parte de la MOE de PM<sub>2.5</sub> en la ZMVM (Amador *et al.*, 2010, 2011, 2013). De acuerdo con Hayatsu y colaboradores (1981), los ácidos grasos pueden actuar como micelas que encapsulan preferentemente a los mutágenos indirectos inhibiendo a las enzimas que los transforman.

El último mecanismo que se ha observado (c), es la inhibición de CYP1A1 por abajo del control debido a la presencia de citocinas proinflamatorias, se observó que hay una disminución dosis dependiente de la concentración de esta proteína cuando se expone a 10  $\mu\text{M/mL}$  de fluoranteno en presencia de 10 y 20 ng/mL de TNF- $\alpha$  a 24 horas post exposición

(Kabátková *et al.*, 2015). Alguno de estos 3 mecanismos podría ser responsable de que los valores de CYP1A1 se encuentren por abajo del control. Adicional a esto, Courter *et al.*, (2007), sugieren que algunos compuestos de la mezcla inhibe la activación metabólica de HAP dependiente de CYP, los HAP candidatos incluyen al fluoranteno y al benzo[c]fenantreno, los cuales han inhibido la genotoxicidad de dibenzo[a,l]pireno en células epiteliales de hígado de rata (WB-F344) (Topinka *et al.*, 2008).

Como se identificó fluoranteno en la MOE de PM<sub>2.5</sub>, también podría estar implicado en la disminución de que CYP1A1 este por abajo del control, debido a que el fluoranteno podría estar actuando como inhibidor. Un estudio previo realizado por Gerde y colaboradores (2001), sugiere que el 80% de los carcinogénicos altamente lipofílicos como el benzo[a]pireno (e incluso otros HAP) son depositados en la región alveolar del pulmón y transportados al torrente sanguíneo sin ser metabolizados, y solo el 20% es depositado en las vías aéreas y es lentamente adsorbido y metabolizado (Livalová *et al.*, 2014), por lo tanto, a las 24 h existiría un número menor de HAP que metabolizar y esto propiciaría que la célula ya no requiera que el CYP1A1 este inducido, esto podría explicar porque CYP1A1 presenta valores por abajo del control a las 24 h. Sería muy importante corroborar en estudios posteriores el efecto de la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiotácticas o antiinflamatorias y el efecto inhibitorio del fluoranteno.

#### **4.5.2 Inducción de las proteínas de las enzimas antioxidantes SOD2, HO-1 y $\gamma$ -GCS**

La única enzima antioxidante que presentó un incremento significativo con respecto al control por exposición a MOE fue la  $\gamma$ -GCS a las 24 h post-exposición, esto coincide con otros estudios donde se observó que la capacidad antioxidante es inducida por la MOE de PM<sub>2.5</sub> desde las 4 h, en este estudio se utilizaron células epiteliales alveolares (A549) que fueron expuestas a concentraciones de 1, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ , en todas las concentraciones se observó un incremento significativo en el contenido de tioredoxina reductasa que fue empleada por los autores para analizar de forma indirecta la síntesis del glutatión (Livalova *et al.*, 2018). Dentro del sistema antioxidante evaluado en este estudio se incluyó a enzimas como HO-1, SOD-2 y  $\gamma$ -GCS. La  $\gamma$ -GCS es una enzima que participa en la segunda reacción de la síntesis de GSH donde enlaza a la glicina con la cisteína y la lisina para generar GSH.

Evaluar esta enzima permite conocer como se está llevando a cabo la síntesis de GSH en la célula.

Se sabe que la síntesis de GSH ocurre en el citoplasma y es una de las principales vías de desintoxicación celular, este incremento significativo observado en  $\gamma$ -GCS a las 24 h corrobora la formación de ERO en el citosol y que el consumo de GSH por la depleción de estos radicales, lo cual hace que la célula produzca más GSH para contrarrestar este efecto, lo que a su vez incrementa la concentración de  $\gamma$ -GCS. También se ha observado un incremento en los niveles de GSH en células de hígado HepG2 cuando se exponen a concentraciones de 10  $\mu$ M de benzo[*a*]pireno por 6 h (Muthusamy *et al.*, 2016) e incluso se ha observado buena correlación en el cociente de GSH/GSSG en células inmunes (Li *et al.*, 2002).

Aun cuando en otros estudios se indica que la MOE de PM<sub>2.5</sub> induce a la HO-1, la dispersión en nuestros resultados evitaron que el incremento observado a 6 h fuera significativo, sin embargo, se ha reportado que hay una mayor expresión del gen HMOX1 (HO-1) cuando se exponen a MOE de PM<sub>2.5</sub> colectadas en invierno y en verano, siendo aún mayor su expresión cuando se expone a HAP que en su exposición a nitro-HAP (Livalova *et al.*, 2018), lo cual es corroborado por los resultados obtenidos en este estudio en NQO1, ya que en ambos tiempos de exposición no se observaron cambios significativos de esta proteína descartando con ello la posibilidad de que se estén metabolizando estos compuestos, ya que la NQO1 participa en la activación de nitro-HAP y oxi-HAP.

Además, Andrysic y colaboradores (2011) observaron por medio de inmunodetecciones que la fracción que contiene a los nitro-HAP en extractos orgánicos obtenidos de estandar analítico de una mezcla de PM urbano (SRM1649) no inducen la expresión de CYP1A1 y 1B1, en una línea celular de hígado de rata (WB-F344); también observaron que hay inducción de ambos citocromos en la fracción que contiene a los HAP y a los oxi-HAP después de 24 h de exposición, cuando evaluaron la inducción relativa del mensajero en la fracción de HAP y de oxi-HAP se observó en todas las concentraciones de 0.01, 0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/mL el doble de la inducción relativa del mensajero en los HAP con respecto a la

de los oxi-HAP. Por lo tanto, es de interés en estudios posteriores desarrollar el estudio que permita esclarecer el papel de los HAP en los efectos citotóxicos de la MOE de PM<sub>2.5</sub>.

Las principales aportaciones de este estudio incluyen la identificación y cuantificación de 25 HAP contenidos en la MOE de PM<sub>2.5</sub> colectadas en Cinvestav-Zacatenco. Las concentraciones detectadas se utilizaron para llevar a cabo la identificación de las principales fuentes de emisión de HAP por medio de correlaciones con contaminantes criterio e índices de tasas de diagnóstico de HAP. Esto permitió inferir que los HAP provienen principalmente de emisiones primarias, por procesos pirogénicos y asociados a la combustión incompleta de combustibles fósiles como gasolina y diésel, muy probablemente realizado por el parque vehicular. Además, se observó que la MOE representa el 15.5% de PM<sub>2.5</sub> y se verificó que el proceso de secado y el cambio de disolvente para los ensayos biológicos no comprometen ni la composición ni la concentración de los HAP identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub>.

Además, se determinó la cantidad de MOE que ingresa al sistema respiratorio y en función de estas determinaciones se establecieron las concentraciones de los ensayos biológicos, para que las concentraciones utilizadas en los ensayos fueran ambientalmente relevantes. Los resultados obtenidos en los ensayos biológicos con la línea celular de epitelio alveolar (A549) corroboran la formación de ERO a 20, 40, 60 y 80 µg/mL de MOE. Así mismo, se determinó que 20 y 40 µg/mL de MOE son capaces de inducir el metabolismo y el sistema antioxidante. Por lo tanto, la hipótesis planteada al inicio del proyecto es correcta, ya que efectivamente la MOE de PM<sub>2.5</sub> contiene compuestos provenientes de combustión incompleta que poseen la capacidad de inducir a CYP1A1 y favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno e inducir al sistema antioxidante (γ-GCS) en la línea celular A549.



## 5 CONCLUSIONES

- ✓ La MOE de las PM<sub>2.5</sub> colectadas en nov-dic en Cinvestav-Zacatenco presenta en su composición 25 HAP; estos compuestos representan el 15.5% de la masa total de PM<sub>2.5</sub>.
- ✓ Por medio de correlaciones con contaminantes criterio e índices de tasas de diagnóstico se infirió que las posibles fuentes de emisión de los HAP son emisiones primarias, procesos pirogénicos y la combustión incompleta de gasolina y diésel, principalmente por vehículos de combustión interna.
- ✓ El proceso de secado y el cambio de disolvente para los ensayos biológicos no comprometen ni la composición ni la concentración de los HAP identificados en la MOE de PM<sub>2.5</sub>.
- ✓ La exposición a 20, 40, 60 y 80 µg/mL de MOE no comprometen la viabilidad de las células A549, pero si generan la formación de especies reactivas de oxígeno.
- ✓ La MOE a concentraciones de 20 y 40 µg/mL de MOE indujeron la expresión dual de CYP1A1 y de la enzima antioxidante γ-GCS en las células A549.
- ✓ Marcadores celulares como la generación de ERO y la inducción de las enzimas del metabolismo y antioxidantes inducidos tras la exposición a MOE extraída de PM<sub>2.5</sub> pueden ser indicadores útiles de un estado pro-oxidante y de la identificación de las fuentes de emisión de HAP, en este caso provenientes de procesos pirogénicos y combustión incompleta de combustibles como diésel y gasolina.

## 6 PERSPECTIVAS

- Evaluar si los HAP son los únicos compuestos, de aquellos contenidos en la MOE, involucrados en la inducción de ERO y de las proteínas CYP1A1 y  $\gamma$ -GCS. Esto se podría evaluar realizando el fraccionamiento de la MOE o por la exposición a una solución de HAP que respete la concentración y la composición de los diferentes HAP identificados.
- Conocer si la temporalidad (secas- frías, secas-cálida y cálida-húmeda) afecta la composición de la MOE y los efectos biológicos como: viabilidad, ERO, metabolismo y sistema antioxidante.
- Determinar si la exposición a MOE induce la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiotácticas o antiinflamatorias. Esto es de importancia porque las citocinas proinflamatorias tienen la capacidad de inhibir la activación del AhR y comprometer el metabolismo de los HAP, además se ha reportado que procesos inflamatorios sostenidos en las vías respiratorias podrían desencadenar hiperreactividad bronquial y asma.
- Conocer si la exposición a MOE está generando alteraciones en las proteínas del surfactante alveolar comprometiendo la capacidad de respuesta a xenobióticos y afectando la estructura y función de los neumocitos tipo II.

## 7 REFERENCIAS

- Abbas I., Badran G., Verdini A., Ledoux F., Roumié M., Courcot D. y Garçon G. Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. *Environmental chemestri letters*. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697>
- Abdel-Shafya H. I.y.Mansourb M. S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* (2016). 25, 107-123.
- Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H. and Villenave E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxigenated PAHs in ambient air of the Marseilles área (South of france): Concentration and sources. *Science of the Total Environment* 384 (2007) 280-292.
- Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Agapito-Nadales M.C., Munive-Colín Z., Hernández-Mena L., Sánchez-Sandoval M., Gómez-Arroyo S., Bravo-Cabrera J. L. y Guzmán-Rincón J. (2010). Solvent extracted organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons distributed in size-segregated airborne particles in a zone of México City: Seasonal behavior and human exposure. *Atmospheric Environment*, 44, 122-130.
- Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Miranda J. y Vera L. (2011). Organic compounds of PM<sub>2.5</sub> in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Science of the Total Environment* 409, 1453-1465.
- Amador-Muñoz O., Bazán-Torija S., Villa-Ferreira S.A., Villalobos-Pietrini R., Bravo-Cabrera J.L., Munive-Colín Z., Hernández-Mena L., Saldarriaga-Noreña H. y Murillo-Tovar M.A. (2013). Opposing Seasonal Trends for polycyclic aromatic hydrocarbons and PM<sub>10</sub>, health risk and sources in Southwest Mexico City. *Atmospheric Research*, 122, 199-212.
- Amador-Muñoz, O. et al, (2014a). Celda de extracción a microescala, asistida por ultrasonido, con y sin reflujó, acoplada a un sistema de filtración. Título de patente No. 325624. IMPI. Clasificación: Int. Cl.8: B01D3/00; B01D33/00; G01N1/00. Vigencia 20 años, Titular: UNAM.
- Amador-Muñoz, O. et al, (2014b). Dispositivo integrado por múltiples deflexiones para la recuperación de compuestos orgánicos debido a la evaporación de disolventes orgánicos por arrastre de vapor. Título de patente No. 325625. IMPI. Clasificación: Int. Cl.8: B01D1/00; B01D1/14. Vigencia 20 años, Titular: UNAM.
- Ambrosino N, Foglio K, Rubini F, Clini E, Nava S, Vitacca M. Non-invasive mechanical ventilation in acute respiratory failure due to chronic obstructive pulmonary disease: correlates for success. *Thorax*. 1995 Jul 1;50(7):755-7

- Andre N, 2005. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science*, 308: 804--806.
- Andrysík Z., Vondráček J., Marvanova S., Ciganek M., Neca J., Péncíková K., Mahadevan B., Topinka J., Baird W.M., Kozubík A y Machala M. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of the organic extracto f a reference urban dust particulate matter mixture: the role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*. 714 (2011) 53-62.
- Armstrong B., Hutchinson E., Unwin J. y Fletcher T. (2004). Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environmental Health Perspective*, 112, 970-978.
- Arruti, A.; Fernández-Olmo, I.; Irabien, A. (2012). Evaluation of the urban / rural particle-bound PAH and PCB level in the northern Spain (Cantabria region). *Environ Monit Assess* 184:6513-6526.
- Avila-Rosales O. S. 2014. Efecto de la 5-aza-2-depxicitidina sobre la actividad de CYP1A hepático en el modelo de *Rattus norvegicus*. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Nacional Autónoma de México.27p.
- Bandowe BA, Meusel H, Huang RJ, Ho K, Cao J, Hoffmann T, Wilcke W (2014). PM2.5-bound oxygenated PAHs, nitro-PAHs and parent-PAHs from the atmosphere of a Chinese megacity: seasonal variation, sources and cancer risk assessment. *Sci Total Environ* 473–485
- Bernabe V.L. 2017. ¿Cuál es la relación entre el volumen tidal espiratorio medio y la tasa de aclaramiento de pCO<sub>2</sub> en los pacientes sometidos a ventilación mecánica no invasiva. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 264p.
- Biache A. C., Mansuy-Huaultab L., Faurea P. Impact of oxidation and biodegradation on the most commonly used polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) diagnostic ratios: Implications for the source identifications. *Journal of Hazardous Materials*, v. 267, p. 31-39, 2014.
- Billet S., Garcon G., Dagher Z., Verdin A., Ledoux F., Cazier F., Courcot D., Aboukais A., Shirali P. 2007. Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): phydicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ Res*. 105: 212-223.
- Binkova B, Cerna M, Pastorovka A, Jelinek R, Benes I, Novak J, Sram RJ: Biological activities of organic compounds absorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of teplice and prague during the summer and winter seasons 2000–2001. *Mutat Res* 2003, 525: 43–59. 10.1016/S0027-5107(02)00312-3
- Bonvallot V., Baeza-Squiban A., Baulig A., Brulant S., Boland S., Muzeau F., Barouki R. y Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory

- response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25 (2001): 515-521.
- Burtscher H, Schüep K. (2012). The occurrence of ultrafine particles in the specific environment of children. *Paediatr Respir Rev* 13:89–94. <http://doi.org/10.1016/j.prrv.2011.07.004>.
- Cardoso S. M., Pereira C. and Oliveira C. R. (1998). The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 246(3):703-10.
- Caricchia, A.M., Chiavarini S and Pezza M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). *Atmospheric Environment.* 33, (1999) 3731–3738.
- Cass, G. R. (1998), Organic molecular tracers for particulate air pollution sources, *Trend Anal. Chem.*, 17(6), 356–366, doi:10.1016/S0165-9936 (98)00040-5.
- Cavanagh J. A., Trought K., Brown L. y Duggan S. Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from Two new zealand cities. *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 5007.5018
- Chai Z F, Xu D D, Dan M, Song Y, Zhuang G S, 2005. Concentration characteristics of extractable organohalogenes in PM2.5 and PM10 in Beijing, China. *Atmospheric Environment*, 39: 4119—4128.
- Chakra ORA., Joyeux M., Nerriere E., Strub M., Zmirou-Navier D. 2007. Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: An assessment within a personal exposure study. *Chemosphere.* 66: 1375-1381
- Cho A.K., Sioutas C., Miguel A.H., Kumagai Y., Schmitz D.A., Singh M., Eiguren-Fernandez A. y Friones J.R. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental Research* 99 (2005) 40-47.
- Chow C. J., Watson G. J., Edgerton A. S. y E. Vega. Chemical composition of PM2.5 and PM10 in Mexico city during Winter 1997. *The science of the total environment.* 2002 (287); 177-201.
- Chow, J. et al. Mass reconstruction methods for PM2.5: a review. *Air Qual Atmos Health.* 8 (2015) 243–263.
- Connors AF, Dawson NV, Thomas C, Harrell FE, Desbiens N, Fulkerson WJ, et al. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments). *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Oct;154(4 Pt 1):959–67.

- Courter L.A., Musafia-Jeknić T., Fischer K., Bildfell R., Giovanini J., Pereira C., Baird W.M. (2005). Urban dust particulate matter alters PAH-induced carcinogenesis by inhibition of CYP1A1 and CYP1B. *Toxicol. Sci.* 9(5):63-73.
- DeCarlo, P. F., Slowik, J. G., Worsnop, D. R., Davidovits, P., and Jimenez, J. L. (2004). Particle Morphology and Density Characterization by Combined Mobility and Aerodynamic Diameter Measurements. Part 1: Theory. *Aerosol Science and Technology*, 38(12), 1185–1205. doi:10.1080/027868290903907
- Dat ND, Chang MB (2017) Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies. *Sci Total Environ* 609:682–693. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.204>
- Debray G. Y. 2010. Evaluación de la Respuesta Inflamatoria y Daño Oxidante en Pulmón de Ratas Expuestas a Partículas Atmosféricas (PM) de la Ciudad de México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. 84p.
- Deng X., Zhang F., Rui W., Long F., Wang L., Feng Z., Chen D. y Ding W. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in vitro*. 27 (2013) 1762-1770.
- Disodado-Martínez A. (2018). Evaluación de una tecnología mexicana patentada para extraer hidrocarburos aromáticos policíclicos y ftalatos de partículas suspendidas en el aire. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM
- Domingo J. L. y Nadal M. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature. *Food and Chemical Toxicology*, 86 (2015) 144-153.
- Donaldson K, Beswick PS. Free radical activity associated with the surface of the particles: a unifying factor in determining biological activity. *Toxicol Lett* 1996; 88:293-8.
- Eiguren-Fernandez A, Miguel A, Lu R, Purvis K, Grant B, Mayo P, Di Stefano E, Cho A, Froines J (2008) Atmospheric formation of 9,10-phenanthraquinone in the Los Angeles air basin. *Atmos Environ* 42:2312–2319. <http://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.029>.
- Elmes, M. Gasparon, M. Sampling and single particle analysis for the chemical characterization of fine atmospheric particulate: A review. *Journal of Environmental Management*. 202 (2017)137-150.
- Farkas N., D. Lőrinczy, T. Dergez, F. Kilár and J. Belagyi. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on erythrocyte membranes by DSC and EPR. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 16 (2004) 163–168.

- Feilberg, P. Poulsen MW, Nielsen T y Skov H. (2001) Occurrence and sources of particulate nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in Denmark. *Atmos Environ* 35. 353-366.
- Fotakis G. y J. A. Timbrell. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 2006 (160); 171-177.
- Freñegal et al. 2009. Diccionario Oxford-Complutense de ciencias de la tierra. 2da. COMPLUTENSE. España. 896p.
- Galarneau, E., 2008. Source specificity and atmospheric processing of airborne PAHs: implications for source apportionment. *Atmospheric Environment* 42, 8139-8149.
- García D. R. 2008. Evaluación del efecto de partículas atmosféricas y de su fracción inorgánica sobre la inducción de estrés oxidativo en células A549. Tesis de Maestría en especialidad en toxicología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
- Gogou, A., N. Stratigakis, M. Kanakidou, and E. G. Stephanou (1996), Organic aerosols in Eastern Mediterranean: Components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories, *Org. Geochem.*, 25(1-2), 79-96, doi:10.1016/S0146-6380 (96)00105-2.
- Gómez-Perales J. E., Colville R. N., Fernández-Bremauntz A., Gutiérrez-Avedoy V. J., Páramo-Figueroa V. H., Blanco-Jimenez S., Bueno-López E., Bernabé-Cabanillas R., Mandujano F., Hidalgo-Navarro M. y Nieuwenhuijsen M. J. Bus, minibús, metro inter-comparison of commuters' exposure to air pollution in Mexico City. *Atmospheric Environment*; 2007 (41): 890-901.
- Gerde P., Muggenburg B.A., Lundborg M., Dahl A.R. (2001). The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pireno; bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis*. 22: 741-749.
- Gracy R. W., Talent J. M., Kong Y., Conrad C. C. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?. *Mutat Res*. 1999 Jul 16;428(1-2):17-22.
- Gu, Z. P., J. L. Feng, W. L. Han, M. H. Wu, J. M. Fu, and G. Y. Sheng (2010), Characteristics of organic matter in PM<sub>2.5</sub> from an e-waste dismantling area in Taizhou, China, *Chemosphere*, 80(7), 800-806, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.078.
- Guo, H., Lee S. C., Ho K. F., Wang X.M. and Zou S.C. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. *Atmospheric Environment* 37, (2003)5307-5317.

- Guor-Cheng F., Yuh-Shen W., Ming-Hsiang C., Tse-Tsung H., Shih-Han H. and Jui-Yeh R. Polycyclic aromatic hydrocarbons study in Taichung, Taiwan, during 2002–2003. *Atmospheric Environment* 38, (2004) 3385–3391.
- Gutiérrez-Castillo M.E., Roubicek D.A., Cebrián-García M., DeVizacaya-Ruiz A., Sordo-Cedeño M. y Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by the urban airborne particulate matter. *Environmental and molecular mutagenesis* 47 (2006) 199-211.
- Halliwell B. and Gutteridge M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem J.* 219: 1-14.
- Halliwell B. and Gutteridge M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Hallquist M., Wenger J. C., Baltensperger U., Rudich Y., Simpson D., Claeys M., Dommen J., Donahue N. M., George C., Goldstein A. H., Hamilton J. F., Herrmann H., Hoffmann T., Iinuma Y., Jang M., Jenkin M. E., Jimenez J. L., Kiendler-Scharr A., Maenhaut W., McFiggans G., Mentel Th. F., Monod A., Prévôt A. S. H., Seinfeld J. H., Surratt J. D., Szmigielski R., and J. Wildt. The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues. *Atmos. Chem. Phys.*, 9(2009):5155–5236.
- Harrison, R.M., Smith, D.J.T., Luhana, L. (1996). Source apportionment of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons collected from an urban location in Birmingham, UK. *Environmental Science and Technology.* 30 825–832.
- Hassanvand M.S. Naddafi K., Nabizadeh R., Sowlat M. H., Momeniha F., Gholampour A., Arhami M., Kashani H., Zare A. 2014. Spatial and temporal variability of sources of ambient fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in California. *Atmos. Chem. Phys.* (14) 12085-12097
- Hayatsu, H., Arimoto, S., Togawa, K. & Makita, M. (1981). Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutat. Res.* 81, 287-293.
- Heyder, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C. F., & Stahlhofen, W. (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 µm. *Journal of Aerosol Science*, 17(5), 811–825. doi:10.1016/0021-8502(86)90035-2
- Hinds. W.C (1999). *Aerosol Technology: Properties. Behavior. and Measurement of Airborne Particles.* Wiley. New York.
- Hou X M, Zhuang G S, Sun Y, An Z S. 2006. Characteristics and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and fatty acids in PM<sub>2.5</sub> aerosols in dust season in China. *Atmospheric Environment*, 40: 3251—3262.



- IARC, 2013. Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. Press release No.221. II. France. International Agency for Research on Cancer. IARC. 4/P.
- Imlay J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 57:395-418.
- Iwado, H., Naito, M. & Hayatsu, H. Mutagenicity and antimutagenicity of air-borne particulates. *Mutat. Res.* 246, 93-102 (1991).
- Kabátková M., Svodorobá J., Pencíková K., Shaik Mohatad D. S., Šmerdová L., Kosibík A., Machala M., Vondráček J. (2015). Interactive effects of inflammatory cytokine and abundant low-molecular weight PAH on inhibition of gap junctional intercellular communication, disruption of cell proliferation control, and the AhR-dependent transcription. *Toxicology letters* 232; 113-121.
- Kavouras, I.G. et al. Source apportionment of urban particulate aliphatic and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) using multivariate methods. *Environmental Science and Technology* 35,(2001) 2288–2294.
- Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.* 2003; 60:612-616.
- Kim, K.-H., Kabir, E., & Kabir, S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International*, 74 (2015): 136-143.
- Klauning JE., Xu Y, Isenberg JS., Bacchowski S., Kolaja KL., Jiang J., Stevenson DE., Walborg EF Jr. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 106 (Suppl 1): 289-295.
- Kotianova, P., H. Puxbaum, H. Bauer, A. Caseiro, I. L. Marr, and G. Cik (2008), Temporal patterns of n-alkanes at traffic exposed and suburban sites in Vienna, *Atmos. Environ.*, 42(13), 2993–3005, doi:10.1016/j.atmosenv.2007.12.048.
- Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T. (1997). Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radic Biol Med* 22:479–487.
- Li N., Venkatesan M.I., Miguel A., Kaplan R., Gujuluva C., Alam J. and Nel A. (2000) Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol.* 2000 165(6): 3393-401.
- Li N., Wang M., Oberley T. D., Sempf J. M. y Nel A. E. Comparison of the Pro-Oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *The Journal of immunology* (2002) 4531-4543.

- Li N., Xia T., Nel AE. (2008). The role of oxidative stress in ambient particulate engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med.* 44:1689-1699.
- Li R, Zhaoa L, Zhanga L, Chena M, Donga C, Caib Z (2017) DNA damage and repair, oxidative stress and metabolism biomarker responses in lungs of rats exposed to ambient atmospheric 1-nitropyrene. *Environ Toxicol Pharmacol* 54:14–20. [http s://doi.org/10.1016 /j.etap .2017 .06.009](http://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.009).
- Lingyan Yang, Wen-Cheng Wang, Shih-Chun Candic, Zhelin Sun, Chong jun Chen, Jen-Kun Chen, Qiang Zou, Yu-Hsin Lin, Chia-Hua Ling. Polycyclic aromatic hydrocarbons are associated with increased risk of chronic obstructive pulmonary disease during haze events in China. *Science of the Total Environment*, 2017 (574) 1649–1658.
- Lippmann M. Semi-continuous speciation analysis for ambient air particulate matter: an urgent need for health effects studies. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 19 (2009): 235–247.
- Livalova H., krcková S., Uhlírová K., Milcova A., Schmuczerová J., Ciganek M., Kléma, Machala M., Srám R.J. y Topinka J. Genotoxicity but not the AhR mediated activity of PAH's is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. *Toxicology letters*. 225(2014) 350-357.
- Livalova H., Milcova A., Cervena T., Vrbova K., Rossnerova A., Novakova Z., Topinka J. y Rossner P.J. Kinetics of ROS generation induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from ambient air particulate matter in model human lung cells lines. *Mutat Res Gen Tox En.* 827(2018) 50-58.
- Longhin E., Holme J.A., Gutzkow B. K., Arlt V-M., Kucab J.E., Camatini M. y Gualtieri M. Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. *Particle and Fibre Toxicology* 2013, 10-63.
- Manzano-León N., Quintana R., Sánchez B., Serrano J. Vega E., Vázquez-López I., Rojas.Bracho L., López-Villegas T., O'Neill S. M., Vadillo-Ortega I., De Vizcaya Ruíz A., Rosas I., Osornio-Vargas R. J. *Biochem Molecular Toxicology*. 2013; 27 (1): 87-97.
- Mao P., Wu S., Li, J., Fu W., He W., Liu X., Slutsky A. S., Zhang H. e Y. Li. Human alveolar epithelial type II cells in primary culture. *Physiological Reports*. 2005; 3 (2): 1-12.
- Marano F., Boland S., Bonvallot V., Baulig A.y Baeza-Squiban. Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response

- triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biology and toxicology*. 18 (2002): 315-320.
- Marr L. C., Dzepina K., Jimenez J. L., Reisen F., Bethel H. L., Arey J., Gaffney J. S., Marley N. A., Molina L. T. y Molina M. J. Sources and transformations of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in México City. *Atmos. Chem. Phys.* (2006) 6,1733-1745.
- Martinelli, N. et al. Air particulate matter and cardiovascular disease: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*. 24(2013)295-302.
- Martínez-Ataz E. y Mera-Morales D. (2004). Contaminación atmosférica. Cuenca: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.
- Masih J., Singhvi R., Kumar K., Jain V.K. and Taneja A. Seasonal Variation and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air in a Semi Arid Tract of Northern India. *Aerosol and Air Quality Research*, 12: 515–525, 2012.
- Milosevic N. Schawalder H., Maier P. 1999. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of Cytocrome P450 metanolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*. Feb 26; 368 (1): 75-87.
- Min-Oh S., Ryong-Kim H., Joo-Park Y., Yeun-Lee S., Hyuck-Chung K. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Mutation research* 723 (2011) 142-151.
- Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB, Sagai M. 1998. Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 102:805–812.
- MohseniBandpi A., Eslami A., Shahsavani A., Khodagholi F. y Alinejad A. Physicochemical characterization of ambient PM2.5 in Tehran air and its potential cytotoxicity in human lung epithelial cells (A549). *Science of the total environment* 593-594 (2017) 182-190.
- Molina J. M. y Molina L. T. Megacities and Atmospheric Pollution. *Air and Waste Manage. Assoc.* 2004 (54): 644-680.
- Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. 1992. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1112: 2–16.
- Murillo-Tovar M. A., Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R. y P. J. Marriott. Selective separation of oxy.PAH from n-Alcanos y PAH in Complex Orgánic Mixture Extracted From Airborne PM2.5. *Chromatographia*; 2010 (72): 913-921.

- Murphy G. Jr., Rouse R.L., Polk W.W., Henk W.G., Barker S.A., Boudreaux M.J., Floyd E. y Penn A.L. Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in respiratory cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38 (2007) 532-540.
- Muthusamy S., Cheng P and Jack C.N. Effects of binary mixtures of benzo[a]pyrene, arsenic, cadmium, and lead on oxidative stress and toxicity in HepG2 cells. *Chemosphere* 165 (2016): 41-51.
- Neilson, A.H., 1998. PAHs and Related Compounds. Springer, Berlin.
- Nel A.E., Diaz-Sanchez D. y Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 7 (2001) 20-26.
- NOM-020-SSA1-2014 Salud ambiental. Valor límite permisible para la concentración de ozono (O<sub>3</sub>) en el aire ambiente y criterios para su evaluación.
- NOM-021-SSA1-1993 Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al monóxido de carbono (CO). Valor permisible para la concentración de monóxido de carbono (CO) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población.
- NOM-022-SSA1-2010 Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Valor normado para la concentración de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población.
- NOM-023-SSA1-1993 Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al bióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>). Valor normado para la concentración de bióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población.
- NOM-025-SSA1-2014 Salud ambiental. Valores límites permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente y criterios para su evaluación.
- Oh S. M., Kim H. R., Park Y. J., Lee S. Y. y Chung K. H. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat Res.* 2011. 16;723(2):142-51. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.04.003.
- Olson J. A. 1996. Benefist and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J. Nutr.* 126 (4): 120-128.

- Palacio I.C., Barros S.B.M. y Roubicek D.A. Water-soluble and organic extracts of airborne particulate matter induce micronuclei in human lung epithelial A549 cells. *Mutation Research* 812 (2016) 1-11.
- Park S. S., Kim Y. J. and Kang C. H. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment* 36, (2002)2917–2924.
- Pérez B. R. 2004. Efecto de extractos orgánicos de emisiones de escape de vehículos a gasolina sobre GSH/GSSG en macrófagos J774A.1. Tesis de maestría en especivanzados del alidad en toxicología. Centro de Investigación y de estudios avanzados del I:P:N.
- Proud D. 2008. The pulmonary epithelium in health and disease. Wiley. USA. 440p.
- Rahman I. and McNee W. 1999. Lung glutathion and oxidative stress: implications in cigarette smoke induced airway disease. *Am. J. Physiol.* 277 (6 Pt 1): L1067-88.
- Ravindra K. Sokhi R. and Grieken R.V. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 42 (2008) 2895–2921.
- Risom L., Moller P. and Loft S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res.* 592 (1-2):119-37.
- Robinson J.M. 1994. Produyction of active oxygen species by phagocytic leukocyte. En Zwilling B.S. Eisentein TK.eds Macrophage-pathogen interactions. Immunology series vol. 60. ED. Marcel Mekker New York.
- Roozendal A. A. 2008. Citotoxicidad debida a la exposición de metales solubles contenidos en partículas atmosféricas. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana
- Salcedo, D., Onasch, T. B., Dzepina, K., Canagaratna, M. R., Zhang, Q., Huffman, J. A., DeCarlo, P. F., Jayne, J. T., Mortimer, P., Worsnop, D. R., Kolb, C. E., Johnson, K. S., Zuberi, B., Marr, L. C., Volkamer, R., Molina, L. T., Molina, M. J., Cardenas, B., Bernab´e, R. M., M´arquez, C., Gaffney, J. S., Marley, N. A., Laskin, A., Shutthanandan, V., Xie, Y., Brune, W., Leshner, R., Shirley, T., and Jimenez, J. L.: Characterization of ambient aerosols in Mexico City during the MCMA-2003 campaign with Aerosol Mass Spectrometry: results from the CENICA Supersite, *Atmos. Chem. Phys.* 2006 (6): 925–946.
- Saldiva P.H., Clarke R.W., Coull B.A., Stearns R.C., Lawrence J. and Murthy G.G. 2002. Lung inflammation induced by con-centrated ambient air particles is related to particle com-position. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1610–1617.

- Samburova V., Zielinska B., y Khlystov A. Do 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Represent PAH Air Toxicity?. *Toxics*. 2017 Sep; 5(3): 17.
- Schauer, J.J., M.J. Kleeman, G.R. Cass, and B.R.T. Simoneit (2002), Measurement of emissions from air pollution sources. 5.C-1-C-32 organic compounds from gasoline-powered motor vehicles, *Environ. Sci. Technol.*, 36(6), 1169–1180, doi:10.1021/es0108077.
- Schwarze, P.E.; Ovreik, J., Lag, M.; Refsnes, M.; Nafstad, P.; Hetland, R.B.; Dybing, E. Particulate matter properties and health effects. Consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum. Exp Toxicol.* (2006). 25, 559-579.
- SEMARNAT-SS-GDF. 2010. Programa para mejorar la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México. México. 363p.
- Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, Srama RJ, Kalina I, Popov T, Novakova Z, Farmer PB: In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles Part II: Human cell lines. *Mutat Res* 2007, 620: 123–134. 10.1016/j.mrfmmm.2007.03.002
- Shenberger J.S., Adams M.H., Zimmer S.G. 2002. Oxidant-induced hypertrophy of A549 cells is accompanied by alterations in eukaryotic translation initiation factor 4E and 4E-binding protein-1. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 27: 250-256.
- Simoneit, B. R. T. (1989), Organic-matter of the troposphere. 5. Application of molecular marker analysis to biogenic emissions into the troposphere for source reconciliations, *J. Atmos. Chem.*, 8(3), 251–275, doi:10.1007/Bf00051497.
- Simoneit, B.R.T., P.M. Medeiros, and B. M. Didyk (2005), Combustion products of plastics as indicators for refuse burning in the atmosphere, *Environ. Sci. Technol.*, 39(18), 6961–6970, doi:10.1021/es050767x.
- SMA-GDF (Secretaria del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal). 2018. Inventario de emisiones de la Ciudad de México 2016. <http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/inventario-emisiones-2016/mobile/#p=2>
- Sinha P., Kolleck I., Volk H.D., Schlame M. and Rustow B. (2002). Vitamin E deficiency sensitizes alveolar type II cells by apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1583 (1): 91-98
- Sippula, O., et al. (2014), Particle emissions from a marine engine: Chemical composition and aromatic emission profiles under various operating conditions, *Environ. Sci. Technol.*, 48(19), 11,721–11,729, doi:10.1021/es502484z.
- Srogi, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ Chem Lett* (2007) 5: 169-195.

- Stone E. A., Snyder D. C., Sheesley R. J., Sullivan A. P., Weber R. J. y J. J. Schauer. Source apportionment of fine organic aerosol in Mexico City during the MILAGRO experiment 2006. *Atmos. Chem. Phys.*; 2008 (8): 1249-1259.
- Strange RC., Jones PW., Fryer AA: 2000. Glutathione S transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Letts.* 112-113: 357-363.
- Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Inoue K, Yoshida S. 2002. Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Arch Toxicol* 76:146–151
- Tan, J. H., X. H. Bi, J. C. Duan, K. A. Rahn, G. Y. Sheng, and J. M. Fu (2006), Seasonal variation of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons associated with PM10 in Guangzhou, China, *Atmos. Res.*, 80(4), 250–262, doi:10.1016/j.atmosres.2005.09.004.
- Topinka J., Marvanová S., Vondráček J., Upham B., Maxhala M. (2008). Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Sci.* 6(5): 43-51.
- Tsien A, Diaz-Sanchez D, Ma J, Saxon A. 1997. The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:256–263.
- US EPA, 2004. Air Quality Criteria for Particulate Matter, Vols. I–II. Washington, DC: US Environmental Protection Agency. EPA 600/P-99/002aF-bF.
- Valavanidis A., Fiotakis C. y Vlachogianni. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *Journal of environmental science and health Part C*, 26: 339-362, 2008.
- Villalobos-Pietrini R., Hernández-Mena L., Amador-Muñoz O., Munive-Colín Z., Bravo-Cabrera J.L., Gómez-Arroyo S., Frías-Villegas A., Walliszewski S., Ramírez-Pulido J. y Ortiz-Muñiz R. Biodirected mutagenic chemical assay of PM10 extractable organic matter in southwest Mexico City. *Mutation Research* 634 (2007) 192-204.
- Wang, W., M.J. Huang, Y. Kang, H.S. Wang, A. O.W. Leung, K. C. Cheung, and M.H. Wong (2011), Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban surface dust of Guangzhou, China: Status, sources and human health risk assessment, *Sci. Total Environ.*, 409(21), 4519–4527, doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.030.
- Wang W, Jariyasopit N, Schrlau J, Jia Y, Tao S, Yu TW, Dashwood R, Zhang W, Wang X, Simonich S (2011) Concentration and photochemistry of PAHs, NPAHs, and OPAHs

and toxicity of PM<sub>2.5</sub> during the Beijing Olympic Games. *Environ Sci Technol* 45:6887–6895. <http://doi.org/10.1021/es201443z>

Wang, Q., Y. Feng, X. H. H. Huang, S. M. Griffith, T. Zhang, Q. Zhang, D. Wu, and J. Z. Yu (2016), Nonpolar organic compounds as PM<sub>2.5</sub> source tracers: Investigation of their sources and degradation in the Pearl River Delta, China, *J. Geophys. Res. Atmos.* 121, (2016) 11,862–11,879, doi:10.1002/2016JD025315.

WHO Regional Office for Europe. (2000) Chapter 5.9. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) en Air quality Guidelines. 2a edición, Dinamarca.

Wöhrnschimmel H., Zuk M., Martínez-Villa G., Cerón J., Cárdenas B., Rojas-Bracho L., Fernández-Bremauntz A. The impact of a bus rapid transit system on commuters' exposure to benzene, CO, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> in Mexico City. *Atmospheric Environment*; 2008 (42): 8194–8203.

Xu D D, Dan M, Song Y, Chai Z F, Zhuang G S, 2005. Concentration characteristics of extractable organohalogenes in PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> in Beijing, China. *Atmospheric Environment*, 39: 4119--4128.

Yang L., Wang W.C., Lung S. C. Sun Z., Chen J. K. Zou Q., Lin Y. H. and Lin C. H. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons are associated with increased risk of chronic obstructive pulmonary disease during haze events in China. *Sci Total Environ.* 1;574:1649–1658. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.211.

Yi-Yang J, Wang Q. y Liu T. Toxicity Research of PM<sub>2.5</sub> Composition in vitro. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14 (2017) 232; doi:10.3390/ijerph14030232.

Yunker, M. B.; MacDonald, R. W.; Vingarzan, R.; Mitchell, R. H.; Goyette, D.; Sylvestre, S. 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, v. 33, n. 4, p. 489–515.

Zangar C.R. Davydov DR, Verma S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Sep 15;199(3):316–31.

Zhang, Y. X., J. J. Schauer, Y. H. Zhang, L. M. Zeng, Y. J. Wei, Y. Liu, and M. Shao (2008), Characteristics of particulate carbon emissions from real-world Chinese coal combustion, *Environ. Sci. Technol.*, 42(14), 5068–5073, doi:10.1021/es7022576

Zhang, X.L., Tao, S., Liu, W.X., Yang, Y., Zuo, Q., Liu, S.Z., 2005. Source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons based on species ratios: a multimedia approach. *Environmental Science and Technology* 39, 9109–91.



Zheng M., Fang M., Wang F. y To. K.L., Characterization of the solvent extractable organic compounds in PM2.5 aerosols in Honk Kong. *Atmospheric Environment*. 34(2000) 2691-2702

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla suplementaria I. Iones característicos y tiempos de retención de HAP, HAP-deuterados (HAP-d) y HAP-fluorados.**

Nº	HAP	PM g mol <sup>-1</sup>	Iones característicos (m/z)	tr (min)
<b>EI1</b>	<b>1-Fluoronaftaleno</b>	<b>146</b>	<b>146,120,75</b>	<b>12.170</b>
d-1	Naftaleno-d8	136	136,137,68	12.301
1	Naftaleno	128	128,129,102	12.402
<b>EI2</b>	<b>4-Fluorobifenilo</b>	<b>172</b>	<b>172,171,152</b>	<b>17.05</b>
d-2	Acenaftileno-d8	160	160,80,161	19.545
2	Acenaftileno	152	152,153,126	19.612
d-3	Acenafteno-d10	164	164,165,88	20.170
3	Acenafteno	154	154,155,153	20.250
d-4	Fluoreno-d10	176	176,177,88	22.607
4	Fluoreno	166	166,165,167	22.774
<b>EI3</b>	<b>3-Fluorofenantreno</b>	<b>196</b>	<b>196,98,170</b>	<b>27.51</b>
d-5	Fenantreno-d10	188	188,189,94	27.881
5	Fenantreno	178	178,179,89	27.992
d-6	Antraceno-d10	188	188,189,94	28.103
6	Antraceno	178	178,179,89	28.214
7	2-Metilantraceno	192	192,193,165	30.508
8	1-Metilantraceno	192	192,193,165	30.785
9	4,5-Metilenfenantreno	190	190,189,191	31.062
10	9-Metilantraceno	192	192,193,165	31.928
11	3,6-Dimetilfenantreno	206	206,207,189	32.067
d-7	Fluoranteno-d10	212	212,213,106	34.098
12	Fluoranteno	202	202,203,101	34.202
<b>EI4</b>	<b>1-fluoropireno</b>	<b>220</b>	<b>220,110,91</b>	<b>35.12</b>
13	9,10-Dimetilantraceno	206	206,207,189	35.488
d-8	Pireno-d10	212	212,213,106	35.488
14	Pireno	202	202,203,101	35.593
15	Reteno	219	219,234,235	35.697
16	Tripticeno	254	254,253,255	36.262
17	Benzo[a]fluoreno	216	216,217,108	36.884
<b>EI5</b>	<b>3-Fluorocriseno</b>	<b>246</b>	<b>246,123,91</b>	<b>41.400</b>
d-9	Benzo[a]antraceno-d12	240	240,120,241	41.469

Nº	HAP	PM g mol <sup>-1</sup>	Iones característicos (m/z)	tr (min)
18	Benzo[a]antraceno	228	228,229,114	41.588
d-10	Criseno-d12	240	240,120,241	41.788
19	Trifenileno	228	228,229,114	42.198
20	Criseno	228	228,229,114	41.907
21	Ciclopenta[cd]pireno	226	226,227,113	41.931
22	5-Metilcriseno	242	242,243,215	43.515
<b>EI6</b>	<b>9-Fluorobenzo[k]fluoranteno</b>	<b>270</b>	<b>270,135</b>	<b>45.640</b>
d-11	Benzo[b]fluoranteno-d12	264	264,132,265	45.753
23	Benzo[b]fluoranteno	252	252,253,126	45.862
d-12	Benzo[k]fluoranteno-d12	264	264,132,265	45.862
24	Benzo[k]fluoranteno	252	252,253,126	45.971
25	7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno	256	256,241,239	46.003
26	Benzo[j]fluoranteno	252	252,253,126	46.026
27	Benzo[e]pireno	252	252,253,126	47.336
d-13	Benzo[a]pireno-d12	264	264,132,265	47.499
28	Benzo[a]pireno	252	252,253,126	47.609
d-14	Dibenzo[a,h]antraceno-d14	292	292,293,146	53.259
29	Dibenzo[a,h]antraceno	278	278,279,139	53.114
30	Dibenzo[a,c]antraceno	278	278,279,139	53.357
d-15	Indeno[1,2,3-cd]pireno-d12	288	288,289,144	53.320
31	Indeno[1,2,3-cd]pireno	276	276,277,138	53.478
d-16	Benzo[ghi]perileno-d12	288	288,289,144	54.454
32	Benzo[ghi]perileno	276	276,277,138	54.626

HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos; HAP-d: HAP-deuterados; HAP-f: HAP fluorados; EI: estándares internos; PM: Peso molecular; tr: tiempos de retención.

**Tabla suplementaria II. HAP cuantificados y estimados con los HAP-d**

#	HAP-d	HAP cuantificados	HAP estimados
d-1	Naftaleno-d8	Naftaleno	
d-2	Acenaftileno-d8	Acenaftileno	
d-3	Acenafteno-d10	Acenafteno	
d-4	Fluoreno-d10	Fluoreno	
d-5	Fenantreno-d10	Fenantreno	
d-6	Antraceno-d10	Antraceno	2-Metilantraceno 1-Metilantraceno 4,5-Metilenfenantreno (4H-ciclopenta[def]fenantreno) 9-Metilantraceno 3,6-Dimetilfenantreno
d-7	Fluoranteno-d10	Fluoranteno	9,10-dimetilantraceno
d-8	Pireno-d10	Pireno	Reteno Tripticeno Benzo[a]fluoreno
d-9	Benzo[a]antraceno-d12	Benzo[a]antraceno	
d-10	Criseno-d12	Criseno	Trifenileno Ciclopenta[cd]pireno 5-Metilcriseno
d-11	Benzo[b]fluoranteno-d12	Benzo[b]fluoranteno	7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno
d-12	Benzo[k]fluoranteno-d12	Benzo[k]fluoranteno	Benzo[j]fluoranteno Benzo[e]pireno
d-13	Benzo[a]pireno-d12	Benzo[a]pireno	Perileno
d-14	Dibenzo[a,h]antraceno-d14	Dibenzo[a,h]antraceno	Dibenzo[a,c]antraceno
d-15	Indeno[1,2,3-cd]pireno-d12	Indeno[1,2,3-cd]pireno	
d-16	Benzo[ghi]perileno-d12	Benzo[ghi]perileno	

**Tabla suplementaria III. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas para el análisis de HAP.**

Marca y modelo del CG-EM	Agilent Technologies. Cromatógrafo de Gases plus (6890) con inyector automático (7863) acoplado a un espectrómetro de masas (5973N).
Columna capilar	J & W Scientific, DB-35MS, fase estacionaria de 35 % fenil polidimetil-siloxano, longitud de 60 m, diámetro interno de 0.250 mm y espesor de fase estacionaria de 0.25 $\mu\text{m}$
Modo de inyección	Sin división
Temperatura del inyector	300 ° C
Volumen de inyección	2 $\mu\text{L}$
Gas acarreador	Helio, 99.98 % pureza
Flujo	1.2 mL min <sup>-1</sup>
Programa de temperatura del horno	Temperatura inicial a 40 °C durante un minuto, incremento a 110 °C (0 min) con una tasa de 50 °C min <sup>-1</sup> , incremento a 303 °C (0 min) con una tasa de 5 °C min <sup>-1</sup> , incremento a 335 °C (14.5 min) con una tasa de 20 °C min <sup>-1</sup> .
Temperatura de la fuente de iones	230 ° C
Temperatura del cuadrupolo	150 °C
Modo de Adquisición	Monitoreo de iones seleccionados "SIM" 7 grupos, 157 iones