

## MUTAGENICIDAD DE LAS AEROPARTÍCULAS

Rafael Villalobos-Pietrini<sup>1</sup>, Sandra Gómez-Arroyo<sup>1</sup>,  
Alfredo Delgado-Rodríguez<sup>2</sup> y Omar Amador-Muñoz<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se hace una revisión de los estudios realizados con partículas suspendidas totales (PST) y  $-10 \mu\text{m}$  de diámetro aerodinámico (PM10), en la atmósfera de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Los muestreos se llevaron al cabo con colectores de altos volúmenes durante 24 h ó lapsos menores y las concentraciones de aeropartículas rebasaron frecuentemente los límites permitidos por las normas oficiales mexicanas para muestreos de 24 h. La materia orgánica fue extraída en Soxhlet o ultrasonido con metanol o diclorometano y concentrada en el sistema Kuderna-Danish o en el rotavapor. Con el uso de *Salmonella typhimurium* y *Drosophila melanogaster* como ensayos biológicos, PM10 produjo mayor mutagenicidad que PST y en una serie de ensayos hubo más mutágenos indirectos que directos. La zona Centro, con tráfico más denso, presentó los más altos niveles de mutagenicidad. En otros experimentos, los mutágenos directos en la zona Suroeste fueron más frecuentes que los indirectos. Estas diferencias pueden relacionarse con cambios en la formulación de las gasolinas así como en diseños de control de los sistemas de escapes de automóviles.

**Palabras Clave:** Partículas suspendidas totales (PST), partículas iguales o menores de  $10 \mu\text{m}$  (PM10), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), prueba de reversión en *Salmonella* (AMES), prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en *Drosophila*.

### ABSTRACT

A review of the studies about total suspended particles (TSP) and particles with a  $-10 \mu\text{m}$  aerodynamic diameter (PM10) in the atmosphere of the Metropolitan Zone of Mexico City is done. The particle collection was made using high volume samplers during 24 h or shorter periods. The particle concentration went frequently beyond the limit of the official mexican norms for 24 h samplings. The organic matter was extracted in a Soxhlet apparatus or by sonication with methanol or dichloromethane and concentrated by a Kuderna-Danish system or a rotatory evaporator. Mutagenicity was evaluated using *Salmonella typhimurium* and *Drosophila melanogaster* as biological test systems. PM10 mutagenicity was higher than TSP. Indirect-acting mutagens were more frequent than direct-acting mutagens and the highest frequencies were found in samples taken in downtown Mexico City, an area with very dense traffic condition. In other experiments made in the southwestern zone, direct-acting mutagens were higher than indirect-acting ones. These differences could be related to changes made in the gasoline formulation and in a wider employment of emmission control devices in the automobiles' exhaust systems.

**Key Words:** Total suspended particles (TSP), particles equal or lower than  $10 \mu\text{m}$  (PM10), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Salmonella* reversion test (AMES), somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*.

ARTÍCULO SOLICITADO POR INVITACIÓN

### INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud (provocados por las partículas suspendidas) que se inician con irritación de los ojos y de las vías respiratorias, se agravan con enfermedades cardiovasculares, acortando la vida cuando la exposición se hace crónica<sup>1</sup>. El riesgo es aún más crítico por la presencia de mutágenos y carcinógenos en el ambiente de la Ciudad de México. Varios autores<sup>2-5</sup>, han considerado la contaminación atmosférica como una de las principales causas de cáncer pulmonar en el hombre. En la Ciudad de México, en 1993, los tumores malignos fueron la segunda causa de mortalidad entre la población y el cáncer pulmonar ocupó el primer lugar<sup>6</sup>.

La presencia de las partículas suspendidas totales (PST), conocidas como inhalables, y de  $10 \mu\text{m}$  (PM10), que son las respirables, han sido asociadas con la mortalidad y la morbilidad de los seres humanos<sup>3,7-20</sup>. Según Schwartz y Marcus<sup>21</sup>, las PM10 son los contaminantes más tóxicos de la mezcla compleja y contribuyen más a la mortalidad humana que las PST derivadas del suelo<sup>22</sup>, aunque la contribución toxicológica de lo diversos

<sup>1</sup>Laboratorios de Citogenética y Mutagénesis Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Genética y Ambiente, UAT.

tipos de partículas no ha sido definida totalmente<sup>1</sup>. En este contexto, algunos estudios han sugerido que el incremento de 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de PST en la concentración diaria, provoca un aumento del índice de mortalidad<sup>8</sup> de alrededor del 6%, y cuando suben las PM10 tan sólo 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , se relacionan con 1% de mortalidad prematura<sup>3,23</sup>, 1% de mortalidad diaria<sup>15,24,25</sup> y 3.4% y 1.8% en la mortalidad debida a causas respiratorias y cardiovasculares, respectivamente<sup>11</sup>; por esto, la Agencia de Protección Ambiental de los EUA (USEPA, por sus siglas en inglés) ha establecido normas que regulan la concentración de este tipo de partículas en la atmósfera; así, el límite permitido para PST es de 260  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  y para PM10 es de 150  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en un periodo de 24 h<sup>26,27</sup>, mismas que han sido adoptadas por las normas oficiales mexicanas<sup>28-30</sup>.

Recientemente, la USEPA incorporó un nuevo estándar llamado PM2.5, considerando partículas  $< 2.5 \mu\text{m}$ , las cuales fueron asociadas con la mortalidad y la morbilidad humana. Este estándar tiene un límite permitido de 65  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en un periodo de 24 h<sup>31</sup>. Hay todavía pocos datos enfocados al estudio de este tamaño de partícula, el cual representa un nuevo campo para futuras investigaciones. Ostro y Chesnut<sup>25</sup> consideraron que no hay un umbral seguro en cantidad y concentración de partículas por debajo del cual no exista efecto adverso en los seres humanos.

Se ha demostrado que el contenido de las PM10 es potencialmente citotóxico, mutagénico y carcinogénico<sup>32</sup>, relacionando el tamaño y la composición química de las aeropartículas con los efectos a la salud<sup>33,34</sup>; entre esta mezcla compleja de agentes químicos presentes en la atmósfera, adsorbidos a la superficie de las aeropartículas, se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que han sido considerados como indicadores de carcinogénesis y como posibles marcadores de la calidad del aire en términos de mutagenicidad<sup>35-37</sup>; el benzo(a)pireno (B(a)P) ha sido propuesto como el HAP de referencia; así, Cederlöf<sup>38</sup> describió que el incremento de 1  $\text{ng}/\text{m}^3$  de B(a)P, aumentó en 5% el índice de mortalidad de cáncer pulmonar en hombres no fumadores.

Los HAP son contaminantes ambientales producidos por fuentes naturales y antropogénicas (vehículos, industrias e incendios, principalmente), cuya concentración en la atmósfera varía principalmente con el tipo de fuentes de emisión y con las condiciones de combustión y meteorológicas<sup>39-41</sup>. Más de 100 HAP han sido detectados en la fracción orgánica asociada a las aeropartículas<sup>40</sup>; los de dos anillos están distribuidos en la atmósfera en forma gaseosa, los de tres y cuatro tanto en la de gas como en la de partícula y con cinco o más anillos sólo en la fase particulada<sup>42</sup>. Es importante mencionar que cuando la temperatura ambiental se incrementa, la concentración de los HAP que están en la fase gaseosa también aumenta<sup>43,44</sup>.

Tomando en consideración todo lo anterior, para evaluar la presencia de mutágenos en el ambiente de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México se hicieron pruebas con los procariontos, la mutación revertante en *Salmonella typhimurium*, conocida

como prueba de Ames<sup>45-50</sup> y en los eucariotos, la de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila*.

#### COLECTA DEL MATERIAL

Para evaluar el efecto mutagénico de las aeropartículas de acuerdo con su diámetro aerodinámico, fue posible coleccionar PST (Figura 1) y PM10 (Figura 2), en filtros de fibra de vidrio colocados en muestreadores de grandes volúmenes, calibrados a un flujo de 1.13  $\text{m}^3/\text{min}$  ( $\pm 10\%$ ). Antes de cada muestreo, los filtros fueron estabilizados en un desecador (Figura 3) a temperatura entre 20 y 25°C y a humedad relativa menor del 40%, 24 h antes y después de cada exposición, pesándose en ambos casos, la diferencia entre el peso final menos el inicial y dividido entre el volumen de aire muestreado, dio la concentración de partículas en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . En la Figura 4, se muestran un filtro expuesto al ambiente por 24 h y otro que no lo fue, siendo evidente la gran cantidad de material acumulado en el primero.

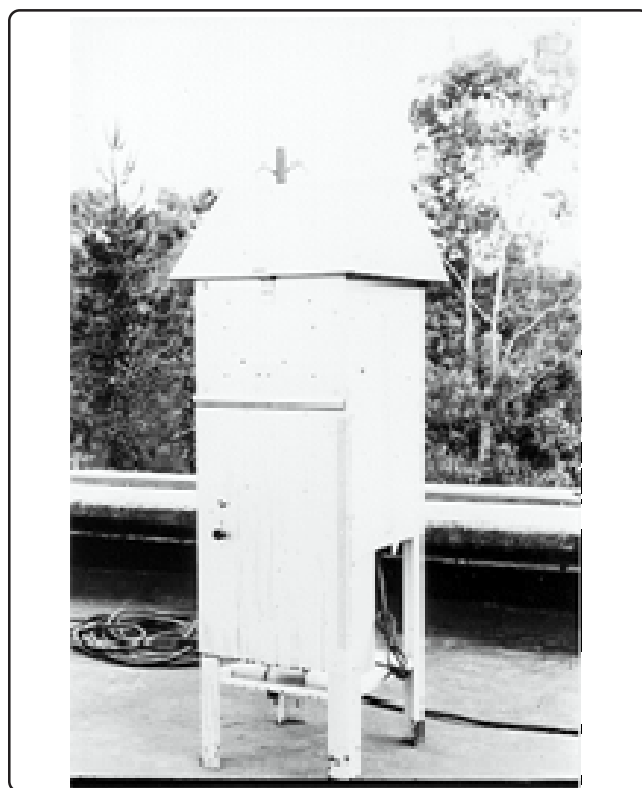


Figura 1. Muestreador Andersen de partículas suspendidas totales (PST).

#### TASAS DE PARTÍCULAS

La distribución de concentraciones de PST y PM10 en las diferentes estaciones de muestreo de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México aparecen en la Figura 5. Al establecer la proporción de valores PM10/PST para cada estación (Tabla I), las tasas fueron de 0.372 a 0.579, cantidades que concordaron con los resultados encontrados por Rodes y Evans<sup>49</sup> en ocho sitios de EUA con valores entre 0.381 y 0.577. En Holanda<sup>50</sup>, se halló una tasa mayor <sup>3</sup> 0.7, que relacionaron con la elevada humedad relativa.



Figura 2 . Muestreador Andersen de partículas -10 m (PM10).



Figura 3. Cámara para estabilizar los filtros a humedad y temperatura constantes.

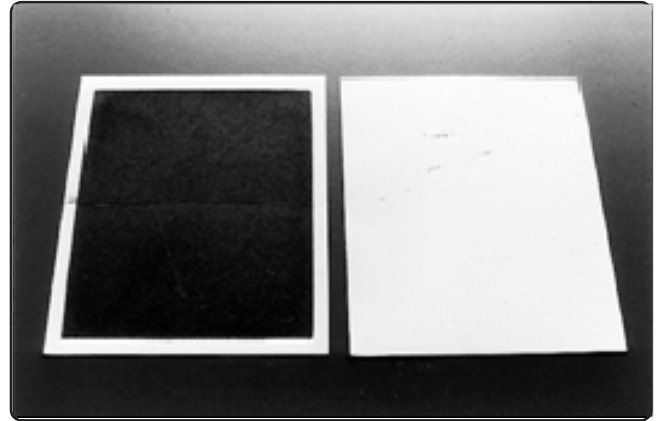


Figura 4. Dos filtros, uno expuesto 24 h al ambiente de la Ciudad de México y el otro no.

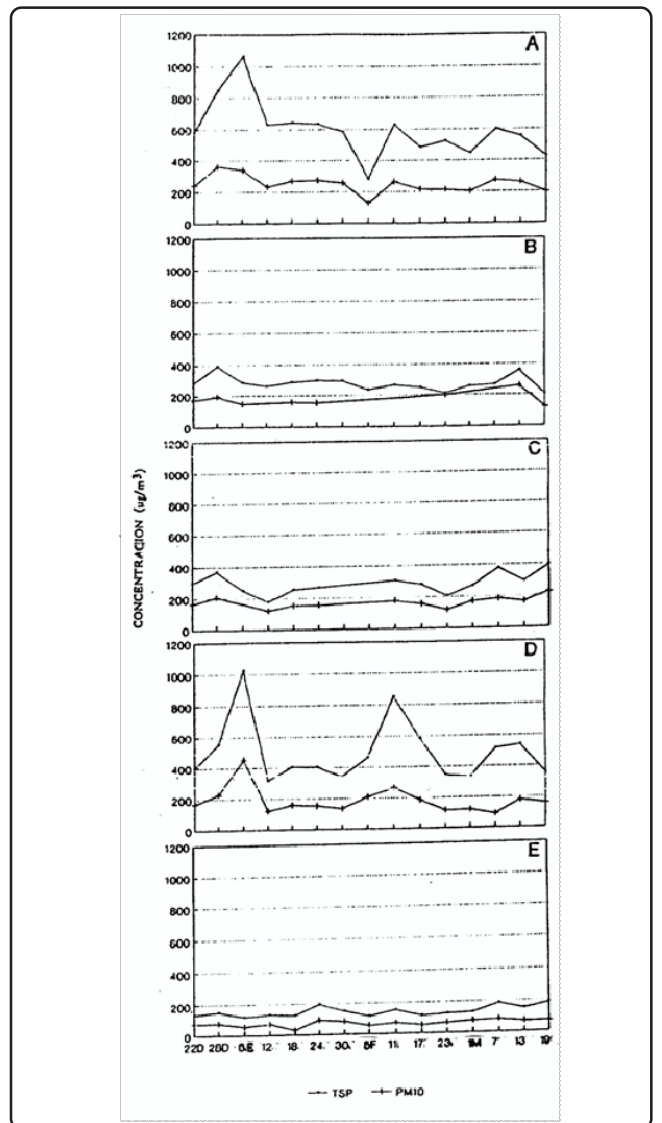


Figura 5. Valores de PST (líneas superiores) y de PM10 (líneas inferiores) obtenidos de muestreos de 24 h cada 6 días en tiempo de secas. A. Noreste (Xalostoc), B. Noroeste (Tlalnepantla), C. Centro (Merced), D. Sureste (Cerro de la Estrella), E. Suroeste (Pedregal).

ZONA	ÁREA	TAMAÑO DE MUESTRA n	PST PROMEDIO ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	PM10 PROMEDIO ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	TASA PROMEDIO PM10/PST
Xalostoc	NE	15	595.3	284.0	0.477
Tlalnepantla	NO	12	246.7	117.1	0.475
Merced	C	8	290.8	166.5	0.573
Estrella	SE	15	494.5	182.7	0.369
Pedregal	SO	15	144.2	68.5	0.475

Tabla I. Comparación de PST y PM10 en 5 sitios de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México en parte de la estación de secas 1989-1990.

### SISTEMA RESPIRATORIO

Existe gran variación en la cantidad de contaminantes que alcanzan las diferentes regiones del tracto respiratorio; por ejemplo, la concentración de  $\text{SO}_2$  es más alta en la porción superior que en los alveolos<sup>51</sup>. Sin embargo, las PM10 ingresan al sistema respiratorio humano alcanzando los alveolos y dañando las funciones celulares<sup>53,52</sup>, siendo la cantidad inhalada y el diámetro aerodinámico, funciones de la cantidad de deposición de cada región<sup>4</sup>. Las PM10 afectan más a los niños, que tienen mayor ventilación/minuto/unidad de masa de cuerpo, que a los adultos<sup>51</sup>, tomando en cuenta que la inhalación promedio de un ser humano está entre 10,000 y 14,000 litros de aire diarios<sup>53,54</sup>, además de que los niños generalmente son más activos y permanecen más tiempo expuestos a los ambientes exteriores que a los interiores<sup>51</sup>.

### MEZCLAS COMPLEJAS

De acuerdo con lo establecido en el "acta de aire limpio", en 1990 de los EUA, 189 agentes químicos fueron considerados como contaminantes peligrosos del aire<sup>55</sup>. Muchos compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos están presentes en las atmósferas urbanas<sup>56</sup>, pero solamente entre el 30 y el 40% de ellos que forman la mezcla compleja adsorbida a las aeropartículas han sido identificados; entre éstos se encuentran los HAP, que han demostrado ser mutagénicos y/o cancerígenos<sup>57-61</sup>.

Van Houdt *et al.*<sup>62</sup> consideraron que el análisis de los efectos producidos por la mezcla orgánica compleja como tal, proporcionó bases más reales que cuando se separó en familias de compuestos con grupos funcionales similares, ya que es posible que ocurran interacciones sinérgicas o antagónicas<sup>63</sup>. En este trabajo; se presentan los resultados obtenidos con las mezclas orgánicas complejas totales en la primera etapa del

proyecto. La extracción del material orgánico adsorbido a las aeropartículas se realizó en equipos Soxhlet durante 8 h y 1.5 h en ultrasonido, utilizando metanol y diclorometano como disolventes, respectivamente. La concentración a sequedad de los extractos, fue llevada a cabo en equipos del tipo Kuderna-Danish y rotavapor.

### PRUEBA DE AMES

En general, las investigaciones que se realizan para verificar la inducción del cáncer y/o de mutaciones en animales son muy costosas, además de que el tiempo para lograr resultados es demasiado largo para ser usadas en forma rutinaria<sup>64</sup>. El hecho de que alrededor del 90% de los carcinógenos sean también mutágenos, ha estimulado el desarrollo de sistemas biológicos de prueba, especialmente en microorganismos, para la detección del daño genético provocado por agentes químicos o mezclas de ellos, que son eficientes, rápidos y económicos<sup>45,64-67</sup>. Uno de ellos emplea diversos mutantes aislados a partir de cepas silvestres de *Salmonella typhimurium*; estas bacterias mutantes (auxótrofas, his-), a diferencia de las silvestres (protótrofas, his+) requieren histidina para crecer y la base del ensayo consiste en revertir el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el operón de la histidina (Tabla II), lo que confiere a los revertantes la capacidad de crecer en medios mínimos carentes del aminoácido, como le sucede a las que se encuentran en la situación silvestre. Varios autores han cuestionado la eficacia de estos sistemas, basando sus críticas principalmente en la gran diferencia evolutiva que existe entre las bacterias y los mamíferos, lo que dificulta la extrapolación de resultados para la posible toma de decisiones. No obstante, la inclusión de la fracción microsómica S9 del hígado de mamífero a los paquetes enzimáticos que están involucrados en el metabolismo y con ello se facilita el análisis de los mutágenos indirectos, también conocidos como promutágenos.

CEPA	MUTACIÓN	MECANISMO MOLECULAR DE LA MUTACIÓN	OTRAS CARACTERÍSTICAS		
			LPS	REP. ESC.	FACTOR-R
TA 100	<i>His G46</i> que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de la histidina	Sustitución de bases	rfa	uvtB	+
TA 98	<i>His D3052</i> que codifica para la histidina deshidrogenasa	Corrimiento del mensaje	rfa	uvtB	+

Tabla II. Cepas de *Salmonella typhimurium* más comúnmente empleadas en el laboratorio para las pruebas de mutación revertante producida por aeropartículas.



### CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS

Con el objeto de lograr que se introduzcan a la bacteria moléculas grandes como los HAP<sup>45,68</sup>, se han modificado cepas de *Salmonella typhimurium* con la presencia del marcador *rfa* que les confiere gran permeabilidad a diversas sustancias, por la pérdida de lipopolisacáridos de la pared celular (Tabla II). Además de esto, el empleo de diferentes cepas permite establecer si las mutaciones se inducen por mecanismos de sustitución de bases (TA100) o por corrimiento del marco de lectura (TA98). Por lo tanto, el interés de esta prueba radica en el hecho de conocer no sólo si un agente químico es mutagénico, sino también el mecanismo molecular que está involucrado (Tabla II).

La existencia de un plásmido (factor *R*), que puede ser evidenciada por la resistencia al antibiótico ampicilina y la pérdida del gen que interviene en la reparación por escisión (rep.esc.) del daño inducido por la radiación UV (Tabla II), les aporta a estas cepas un aumento de sensibilidad a muchos mutágenos.

Espontáneamente se producen revertantes alrededor de ciertos valores; por ejemplo, en la TA98 son de 20 a 50 colonias por caja y en la TA100 de 120 a 200. Arriba de estos valores se considera la presencia de mutágenos. Como la cepa TA98 fue más sensible, se decidió utilizarla en los siguientes experimentos (Tabla II).

### INDUCCIÓN DE MUTACIONES POR LOS EXTRACTOS

Se realizaron colectas cada 6 días en tiempo de secas, del 22 de diciembre de 1989 al 19 de marzo de 1990, por la Comisión Metropolitana de Prevención y Control de la Contaminación en cinco de sus estaciones: al Noreste Xalostoc, al Noroeste Tlalnepantla, al Centro Merced, al Sureste Cerro de la Estrella y al Suroeste Pedregal. En el Noreste, todos los valores de PM<sub>10</sub> rebasaron el límite permitido (LP) de 150 µg/m<sup>3</sup> y también los de PST de 260 µg/m<sup>3</sup> (Figura 5A), mientras que al Noroeste fueron más altos todos los de PM<sub>10</sub> y algunos de PST no excedieron el LP (Figura 5B). El análisis de los registros obtenidos en la región Norte denotó que fueron claramente mayores los del Noreste, posiblemente debido al aporte del material producto de la erosión de los suelos de cultivo de esta zona, que provocó cantidades elevadas de partículas. En el Centro de la Ciudad, los datos de PM<sub>10</sub> y varios de PST se encontraron por arriba del LP (Figura 5C). En el Sureste, nuevamente se presentó un incremento de PST y PM<sub>10</sub> (Figura 5D) que superó el LP, siendo también la erosión de los suelos de cultivo una causa importante. En el Suroeste, se manifestó la menor contaminación por partículas y en varios días el LP de PST y PM<sub>10</sub> no fueron rebasados (Figura 5E).

Los extractos orgánicos secos, se resuspendieron en dimetilsulfóxido y las cepas bacterianas se expusieron a diversas concentraciones. Se hicieron registros de la frecuencia de mutaciones<sup>34</sup> y se analizó la proporción de revertantes inducidos por los extractos de las aeropartículas entre la cantidad de revertantes espontáneos, considerándose la existencia de

compuestos mutagénicos cuando la tasa rebasó el doble, o sea el nivel 2 de las Figuras 6 y 7; en ellas se incluyeron resultados sin y con activación metabólica de mamíferos, respectivamente. En general, se notó la inducción importante de mutaciones en la temporada de secas y es evidente que la respuesta fue mayor cuando se involucró la activación metabólica, lo que significa que en las aeropartículas hubo mayor cantidad de mutágenos indirectos (como los HAP) que directos<sup>34</sup>. Mediante el análisis exploratorio (Figura 8) se obtuvieron las medianas de PM<sub>10</sub> para cada estación y, tanto con la fracción S<sub>9</sub> como sin ella, las más altas aparecieron en el Centro de la Ciudad de México, que es una zona con alta densidad de tráfico vehicular<sup>34</sup>.

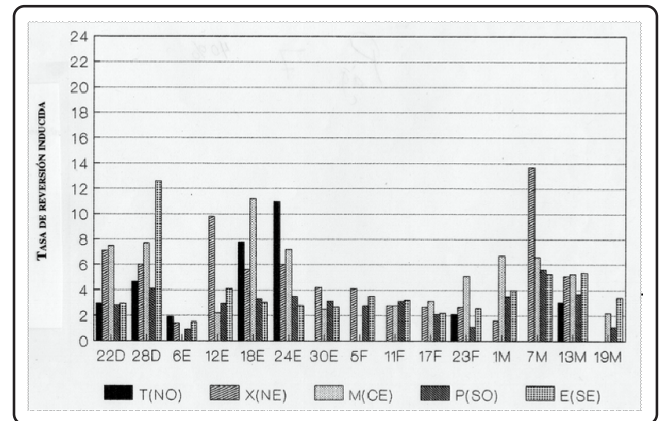


Figura 6. Tasa de reversión en TA98 (-S<sub>9</sub>) en parte de la estación de secas (1989-1990) en diversos sitios de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

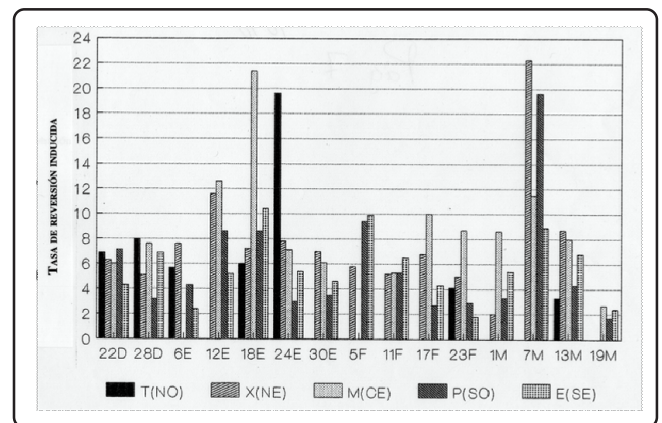


Figura 7. Tasa de reversión en TA98 (+S<sub>9</sub>) en parte de la estación de secas (1989-1990) en diversos sitios de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

### POTENCIA MUTAGÉNICA

En los estudios de Villalobos-Pietrini *et al.*<sup>69</sup> sobre la potencia mutagénica (revertantes por m<sup>3</sup>), se consideró la pendiente de la regresión lineal de la respuesta mutagénica obtenida con diversas concentraciones y la cantidad de aire filtrado. Se hicieron tres tipos de muestreos: de 24 h cada 6 días (septiembre 25 a octubre 31), de 24 h diariamente por una semana (octubre 12 a 18) y de 3 h en un intervalo de 24 h (diciembre 18). En las de 24 h de cada 6 días (Figura 9) hubo mayor variación que en

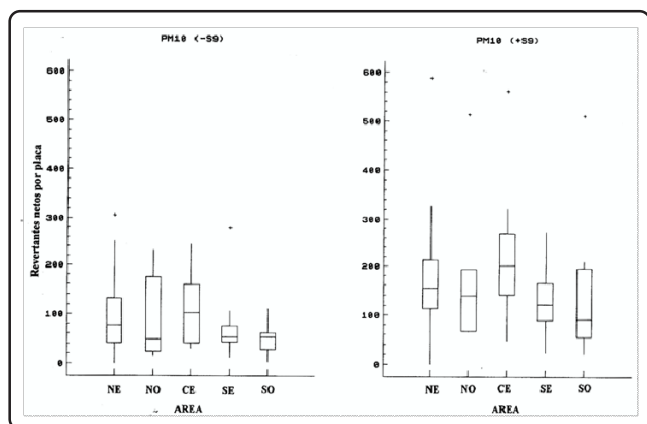


Figura 8. Análisis exploratorio de "cajas" y "bigotes" de los resultados obtenidos en los sitios de muestreo.

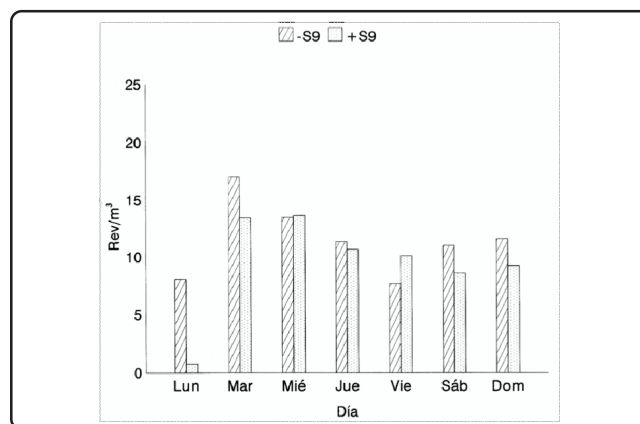


Figura 10. Potencia mutagénica (revertantes por m<sup>3</sup>) en *Salmonella* con y sin activación metabólica de los extractos de aeropartículas de filtros expuestos durante 24 h en 6 días seguidos.

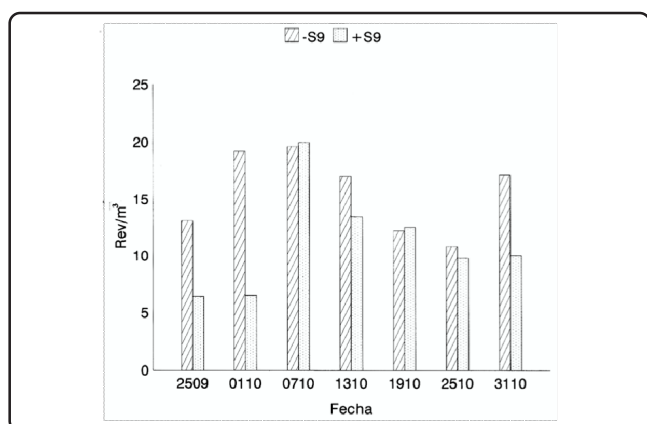


Figura 9. Potencia mutagénica (revertantes por m<sup>3</sup>) en *Salmonella* con y sin activación metabólica de los extractos de aeropartículas de filtros expuestos durante 24 h cada 6 días.

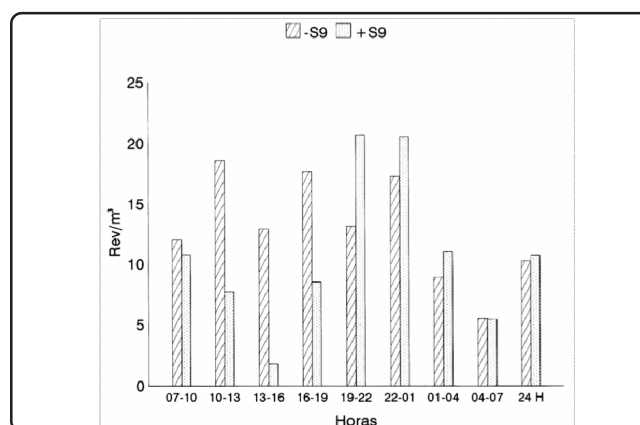


Figura 11. Potencia mutagénica (revertantes por m<sup>3</sup>) en *Salmonella* con y sin activación metabólica de los extractos de aeropartículas de filtros expuestos durante 3 h en un día completo.

los colectados diariamente (Figura 10). En el material obtenido cada 3 h, sin activación metabólica, los picos fueron de las 10 a las 13, de las 16 a las 18 y de las 22 a las 01 h con 19, 18 y 17 revertantes/m<sup>3</sup> (Figura 11) y el pico menor entre 04 y 07 h con 6 revertantes/m<sup>3</sup>. Mientras que con activación metabólica la mayor respuesta se logró entre las 19 y las 01 h y fue de 21 revertantes/m<sup>3</sup> en promedio (Figura 11). En tres de las ocho muestras (19 a 04 h), el resultado con activación metabólica fue más alto que sin ella; en cuatro (07 a 19 h) sucedió lo opuesto y en un caso (04 a 07 h) fueron similares (Figura 11), mientras los valores de 24 h sin S9 fueron en casi todos los casos más elevados o similares a los de +S9 (Figuras 9 y 10).

Al contrastar las pendientes de todos los tratamientos de 24 h (incluyendo las obtenidas en los muestreos continuos durante 7 días y los de cada 6 días), en los dos grupos formados: +S9 y -S9, a pesar de ciertas diferencias ocurridas con -S9, éstas no fueron significativas  $p > 0.01$ , aplicando la *t* de Student en ambos grupos<sup>69</sup>.

También se hizo la comparación de las potencias mutagénicas originadas en 3 y 24 h para los grupos con y sin S9 y las diferencias no resultaron significativas<sup>69</sup>.

La respuesta mutagénica del material colectado en intervalos de 24 h enmascaró los efectos más bajos y más elevados que ocurrieron durante el día. Así, algunos puntos de los muestreos de 3 h rebasaron hacia arriba y hacia abajo la potencia mutagénica observada en el registro continuo de 24 h<sup>69</sup>, lo que coincidió con los hallazgos de Pitts *et al.*<sup>70</sup> y Viras *et al.*<sup>71</sup>

En las colectas de 3 h, sin S9, las potencias mutagénicas mostraron niveles que disminuyeron hacia la noche, mientras que con S9 el valor más bajo fue al mediodía, aumentando hacia la noche para después decrecer (Figura 11)<sup>68</sup>. Esto sugirió que los mutágenos que requieren activación metabólica, tales como el benzo(a)pireno, pueden ser transformados en mutágenos directos al reaccionar con oxidantes atmosféricos<sup>72</sup>.

#### MUTÁGENOS DIRECTOS E INDIRECTOS

La mutagenicidad indirecta, se expresa cuando participa el metabolismo mediante la fracción S9 de mamíferos y ha sido correlacionada con la presencia de HAP<sup>57,60,73-75</sup>. Los derivados nitro, hidroxilo, oxilo y sulfonados de los HAP han sido involucrados como agentes que actúan de manera directa y cuya genotoxicidad

es frecuentemente mayor que la de los compuestos originales<sup>59,73,75-80</sup>, además se generan cuando los HAP son transformados parcialmente al reaccionar con oxidantes atmosféricos como O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, peroxiacetil nitrato y radicales libres, interviniendo principalmente el agua, la temperatura y la radiación solar<sup>72,82-83</sup>.

La respuesta mayor a mutágenos de acción indirecta (promutágenos) que de directa en la Ciudad de México ha sido descrita por Butler *et al.*<sup>84</sup>, al evaluar los efectos de los extractos obtenidos en 1982 en el Noreste de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y por Villalobos-Pietrini *et al.*<sup>34</sup> en cinco áreas de esa Zona entre 1989 y 1990, mientras que en el muestreo de 1991<sup>69</sup>, los mutágenos de acción directa fueron los más abundantes (Figuras 9, 10 y 11). Esto puede ser debido a que antes de 1991 los automóviles no portaban convertidores catalíticos y se utilizaba gasolina con plomo, que fue sustituida por otras sin este metal<sup>85</sup>.

**MUTAGENICIDAD EN OTRAS REGIONES**

Al comparar los resultados de los muestreos de 24 h con los obtenidos en otras regiones del mundo, se notó que la potencia mutagénica de las aeropartículas respirables en el Suroeste de la Ciudad de México fue menor que la respuesta en zonas industriales o con elevada densidad vehicular<sup>86-88</sup>, similar a una ciudad urbana<sup>89</sup> y mayor que otras áreas industriales y no industriales<sup>84,90</sup>, a pesar de que existen datos de que los valores de PM10 en la Ciudad de México en 1992 fueron especialmente bajos<sup>91</sup>.

**PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART) EN *Drosophila melanogaster***

Este ensayo se ha considerado adecuado para evaluar el daño genético y se basa en el uso de organismos heterocigóticos para mutaciones recesivas en células somáticas, de tal forma que la carencia del alelo dominante, o sea la pérdida de heterocigosis, en algún momento del desarrollo, permite la expresión del gen recesivo, que aparece fenotípicamente como una mancha sobre la cutícula del ala del adulto<sup>47</sup>.

Entre las ventajas que ofrece la prueba están la obtención de resultados en una sola generación de moscas, la posibilidad de reconocer si la acción de los agentes químicos ocurre en el momento del tratamiento o bien si el efecto sucede después del mismo, ya que el tamaño de las manchas observadas depende del momento en que se induce el clon, de tal modo que si se origina tempranamente presentará mayor tamaño que si se produce hacia el final de éste. Las manchas en las células de las alas pueden deberse a mutación, recombinación o deleción (Figura 12)<sup>48</sup>.

**MARCADORES GENÉTICOS**

Para realizar esta prueba se emplearon tres líneas progenitoras:

1. *mwh/mwh*
2. *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>*
3. *ORR1/ORR1; ORR2/ORR2; flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>*

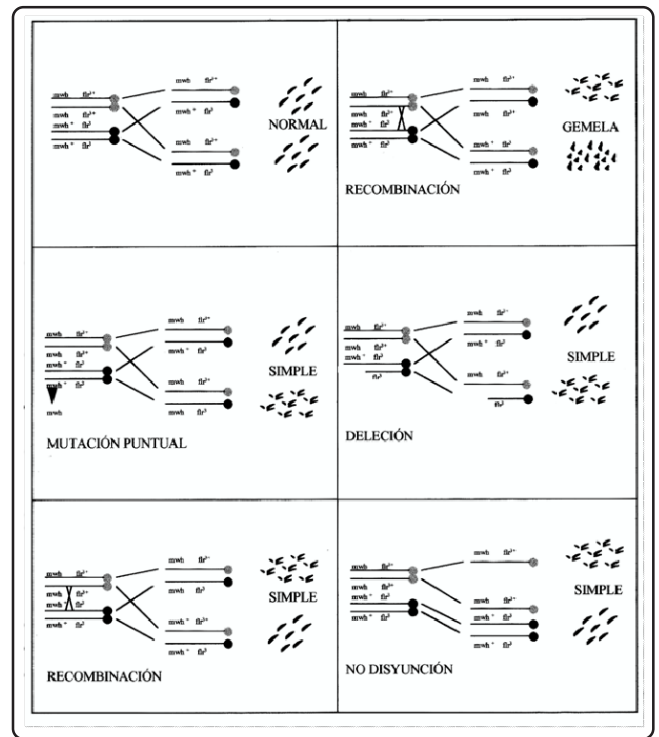


Figura 12. Eventos genéticos que pueden originar la aparición de manchas en SMART en células de *Drosophila melanogaster*.

La mutación *mwh*: “pelos múltiples” (Figura 13A), se ubica en un locus del cromosoma 3 a 0.0 unidades de mapa y se distingue fenotípicamente porque en lugar de un tricoma por célula, como se expresa en las alas del adulto de fenotipo silvestre (Figura 13B), se presentan de dos a cinco<sup>92</sup>.

La mutación *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>: flr<sup>3</sup>*: “flama” (Figura 13C), está a 39 unidades de mapa sobre el cromosoma 3, aparece fenotípicamente como tricoma de forma irregular en el tórax, el abdomen y las alas<sup>92,93</sup>. Debido a que en condición homocigótica es letal, para mantener la línea que lo porta se requiere un balanceador, el *TM3, Bd<sup>s</sup>*, que tiene una inversión pericéntrica que involucra a gran parte del cromosoma 3 y contiene el marcador “Serratia” (*Bd<sup>s</sup>*), que por ser dominante permite reconocer a los individuos que la llevan, ya que éstos muestran

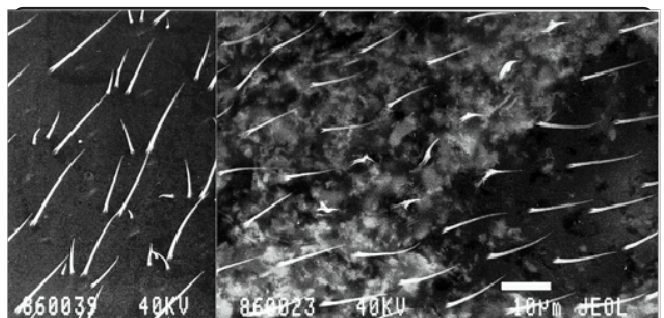


Figura 13. Microfotografías electrónicas de barrido de cutículas de ala de *Drosophila melanogaster* que muestran los fenotipos de pelos. A. Múltiples, B. Normales y C. Flama (cortesía del Instituto de Toxicología, Swiss Federal Institute of Technology).



fenotípicamente las alas con bordes discontinuos. *Serratia* es una mutación letal en condición homocigótica, quedando entonces en cada generación sólo individuos heterocigóticos, tanto para *flr<sup>3</sup>* como para *Bd<sup>s</sup>*.

#### LÍNEA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

ORR1 y ORR2: son el primero y el segundo cromosomas de la línea Oregon RR, que es resistente al insecticida DDT y presenta actividad metabólica incrementada en reacciones dependientes del complejo microsómico P-450<sup>94</sup>; este aumento en su capacidad metabólica se debe en gran parte al gen *RI*, ubicado en el cromosoma 2 a 65.0 unidades de mapa. En resumen, se sustituyeron los cromosomas 1 y 2 de las líneas originales *mwh/mwh* y *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>*, por los de la línea Oregon RR.

#### CRUZAMIENTOS

Para hacer el ensayo, se realizaron las cruza siguientes:

1. Estándar (E) con hembras de la línea *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>* y machos de la línea *mwh/mwh*.
2. Bioactivación elevada (BE) con hembras de la línea ORR; *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>* y machos de la línea *mwh/mwh*.

Con el fin de contar con individuos con poca variación en la edad, se colectaron huevos durante 8 h en frascos con una base sólida de agar (5% p/v) cubierta con una capa de aproximadamente 5 mm de una pasta espesa de levadura activa, enriquecida con azúcar. Antes de colocar a los adultos para la oviposición, se dejó secar la superficie de la pasta tapando la boca del frasco con gasa. Para obtener las larvas, el frasco se lavó con agua corriente y se filtró con una coladera de gasa fina de "nylon" para capturar a los organismos<sup>95</sup>; después se colocaron en tubos homeopáticos conteniendo 1.5 g de medio de cultivo instantáneo y 5 ml de los extractos. Cuando los adultos emergieron, se fijaron en alcohol al 70% y se montaron las alas en preparaciones permanentes<sup>47</sup>.

Se analizaron las alas en un microscopio óptico con aumento de 400x y se registraron los fenotipos como manchas de pelos múltiples (*mwh*) o de pelos en forma de flama (*flr*). Éstas pueden ser chicas (con una o dos células) y grandes (con tres o más) y se presentan sencillas (*mwh* ó *flr*) o gemelas (*mwh* y *flr* en zonas adyacentes).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó mediante la prueba de  $\chi^2$  de proporciones con la corrección de Yates y con el programa de cómputo SMART, versión de PC de Würglery Frei (comunicación personal). Para evaluar si el resultado era positivo, positivo débil, negativo o dudoso, se empleó el procedimiento simple de Frei y Würgler<sup>96</sup> para comparar las frecuencias inducidas de los grupos tratados con las de los testigos, tanto bajo una hipótesis nula que consideró que las observadas en los grupos testigo y tratados no diferían, como ante una hipótesis alternativa en que la frecuencia

inducida en los tratados fue "m" veces más alta que la hallada en el testigo. Debido a la aparición espontánea de manchas pequeñas con un sólo fenotipo, se trataron estadísticamente por separado las diversas clases de manchas obtenidas (chicas sencillas, grandes sencillas y gemelas) y fue con base en esta diferencia, que a cada tipo se le asignó un número "m" determinado, siendo de 2 para las manchas pequeñas sencillas (por ser las más comunes) y de 5 para las manchas grandes sencillas y las gemelas (que ocurren con menos frecuencia)<sup>96</sup>. Para comparar los resultados entre los distintos tratamientos de *Drosophila melanogaster* se calculó la frecuencia de producción de clones con pelos múltiples (*mwh*) por 10<sup>5</sup> células, ajustando este valor con el del testigo; para ello se dividió la cantidad de clones *mwh* entre la de alas y entre las células que conformaron el área que se analizó<sup>97</sup> y que correspondió aproximadamente a 24,400.

#### FRECUENCIA DE MANCHAS EN LAS ALAS DE *DROSOPHILA*

El material orgánico adsorbido a las aeropartículas y extraído con metanol se evaporó a sequedad y en lugar de resuspenderlo con dimetilsulfóxido, que es tóxico para *Drosophila*, se hizo en etanol al 3% y para homogeneizar la muestra se empleó el detergente tween 80 al 3% en solución acuosa a dos concentraciones 2.44 y 9.76 m<sup>3</sup>/ml, incorporándose al alimento de las larvas de 72 h con una duración de 48 h de tratamiento.

Las PST y PM10 (Figura 14) fueron colectadas en dos estaciones<sup>98</sup>, Centro (Merced) y Suroeste (Pedregal) de la Ciudad de México en dos días, 27 de julio (270791) y 2 de agosto (020891) de 1991. Las tasas de PM10/PST de sitios y fechas de muestreo fueron entre 0.435 y 0.590. Los extractos se aplicaron al alimento de las larvas de las dos cruza antes mencionadas; los análisis se basaron principalmente en las frecuencias de manchas totales por ala<sup>98</sup>, ya que en este parámetro están involucrados todos los datos detectables, aunque la característica de manchas sencillas es la que aportó el elemento mayor a las totales. En varios de los tratamientos de 2.44 m<sup>3</sup>/ml la respuesta fue dudosa, mientras con 9.76 m<sup>3</sup>/ml hubo mejor definición en la respuesta positiva o negativa<sup>98</sup>.

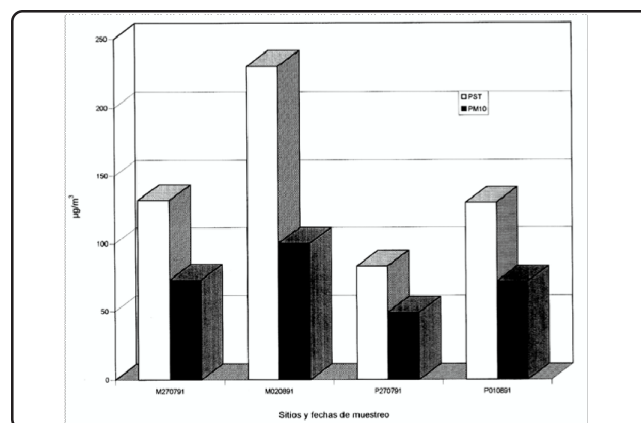


Figura 14. Concentración de masa de aeropartículas colectadas en los filtros de los muestreos realizados en el Centro y el Suroeste de la Ciudad de México (M, Merced; P, Pedregal).



### FORMACIÓN DE CLONES

Al analizar la frecuencia de formación de clones por  $10^5$  células para la cruz E (Figura 15) el orden de respuesta de PM10 y PST fue  $^{98}M020891 > P020891 > M270791 > P270791$  y concordó con la cantidad de partículas colectadas (Figura 14). En tres de los cuatro puntos estudiados<sup>98</sup> las PM10 tuvieron mayor actividad mutagénica que las PST. Esto también sucedió en la cruz BE<sup>98</sup>, cuyos valores de PM10 coincidieron con el comportamiento de la masa de partículas (Figura 16) y los de PST sólo en un caso se separaron mostrando positividad de manchas simples grandes (Figura 16), lo que indicó la probable existencia de compuestos de acción directa, posiblemente derivados de los HAP, aun cuando la inducción de clones fue mayor en la cruz BE que en la E, lo que sugirió que la cantidad de mutágenos indirectos o promutágenos fue más alta<sup>98</sup>.

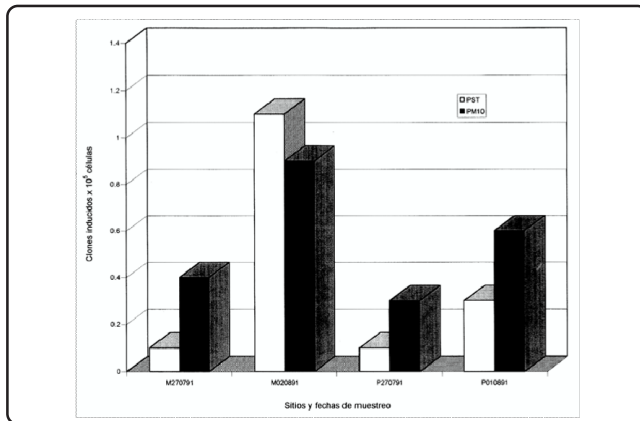


Figura 15. Clones de pelos múltiples (mwh) x  $10^5$  células obtenidos al exponer larvas de la cruz estándar (E) a la fracción orgánica de las aeropartículas (M, Merced; P, Pedregal).

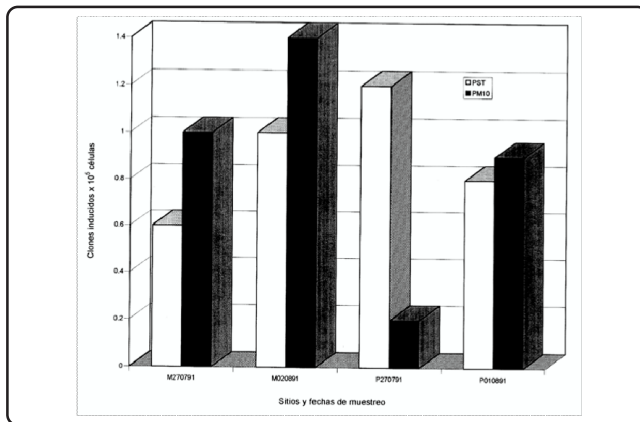


Figura 16. Clones de pelos múltiples (mwh) x  $10^5$  células obtenidos al exponer larvas de la cruz de bioactivación elevada (BE) a la fracción orgánica de las aeropartículas (M, Merced; P, Pedregal).

### CONCLUSIONES

La prueba de Ames con *Salmonella typhimurium* ha sido muy utilizada en experimentos de mutagenicidad de aeropartículas y suficientemente validada. Actualmente se están empleando nuevos sistemas y SMART en *Drosophila* es un ensayo en los

eucariotos cuya sensibilidad ha sido posible demostrar mediante su uso en este tipo de análisis, ya que investigaciones como las descritas aquí deben realizarse regularmente, puesto que las condiciones físicas y químicas de la compleja y dinámica atmósfera están cambiando constantemente<sup>99</sup>, aun cuando las concentraciones promedio de partículas hayan sido similares en los últimos años en la región estudiada<sup>99</sup>. Los esfuerzos para medir los niveles de contaminación en la Ciudad de México son muchos, por ello es importante continuar evaluando la calidad del aire por medio de ensayos genotóxicos para complementar el efecto de tales acciones, en cuanto a la posible toma de decisiones.

La necesidad de comprender el papel que juegan los HAP y sus derivados, en la variabilidad de los efectos obtenidos a través del tiempo, abre nuevas posibilidades de estudio y permite el establecimiento de técnicas de extracción y fraccionamiento de las mezclas con disolventes más selectivos que el metanol.

### AGRADECIMIENTOS

Al apoyo técnico del M. en C. Claudio Amescua García, del Biól. Miguel Ángel Meneses Pérez y de la Q.I. Zenaida Munive Colín del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México, de la Biól. Raquel Ortiz Martello del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y de la Dra. Bettina Sommer por la revisión del resumen en inglés. Este trabajo se realizó bajo contrato con el CONACYT (clave 3727PN).

### REFERENCIAS

- Mauderly JL. Current concepts on airborne particles and health. En Riesgos ambientales para la salud en la Ciudad de México. (Rivero O, Ponciano G. Eds.). Programa Universitario del Medio Ambiente, UNAM, México 1996; 46-56.
- Samet MJ. Indoor radon and lung cancer. Estimating the risk. *Wester J Med* 1992; 156: 25-29.
- Dockery DW, Pope III CA, Xu X, Spengler JD, Ware JW, Fay ME, Ferris Jr. BG, Speizer FA. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 1993; 329:1753-59.
- Pope AC, Kanner ER. Acute effects of PM10 pollution on pulmonary function of smokers with mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1336-40.
- Utell MJ, Samet M. Particulate air pollution and health. New evidence on an old problem. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1334-35.
- Ponciano RG. Cáncer pulmonar y contaminación atmosférica. ¿Existe una asociación? En Riesgos Ambientales para la Salud en la Ciudad de México. (Rivero O, Ponciano G. Eds.). Programa Universitario del Medio Ambiente, UNAM, México 1996; 127-71.
- Fairley D. The relationship of daily mortality to suspended particulates in Santa Clara County, 1980-1986. *Environ Health Perspect* 1990; 89:115-168.
- Schwartz J. Particulate air pollution and daily mortality: a synthesis. *Public Health Rev* 1991a; 19: 39-60.

9. Schwartz J. Particulate air pollution and daily mortality in Detroit. *Environ Res* 1991b; 56:204-13.
10. Dockery DW, Schwartz J, Spengler JD. Air pollution and daily mortality associations with particulates and acid aerosols. *Environ Res* 1992; 59:362-73.
11. Pope CA III, Schwartz J, Ransom MR. Daily mortality in PM10 pollution in Utah Valley. *Arch Environ Health* 1992; 47:211-17.
12. Pope CA III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of US adults. *Amer J Respir Crit Care Med* 1995; 151:669-74.
13. Schwartz J, Dockery DW. Particulate air pollution and daily mortality in Steubenville, Ohio. *Am J Epidemiol* 1992a; 135:12-19.
14. Schwartz J, Dockery DW. Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentration. *Am Rev Respir Dis* 1992b; 145:600-04.
15. Ostro BD. The association of air pollution and mortality. Examining the care for inference. *Arch Environ Health* 1993; 48:336-42.
16. Li Y, Roth HD. Daily mortality analysis by using different regression models in Philadelphia County, 1973-1990. *Inhalat Toxicol* 1995; 7:45-58.
17. Moolgolkar SH, Luebeck EG, Hall TA, Anderson EL. Air pollution and daily mortality in Philadelphia. *Epidemiology* 1995; 6:476-84.
18. Anderson HR, Ponce de León A, Bland JM, Bower JS, Strachan DP. Air pollution and daily mortality in London: 1987-1992. *Brit Med J* 1996; 1312:665-69.
19. Moolgolkar SH, Luebeck EG. Particulate air pollution and mortality: A critical review of the evidence. *Epidemiology* 1996; 7:420-28.
20. Choudhury AH, Gordian ME, Morris SS. Associations between respiratory illness and PM10 air pollution. *Arch Environ Health* 1997; 52:113-17.
21. Schwartz J, Marcus A. Mortality and air pollution in London: a time series analysis. *Am J Epidemiol* 1990; 131:185-94.
22. Ozkaynak H, Thurston GD. Associations between 1980 U.S. mortality rates and alternative measures of airborne particle concentration. *Risk Anal* 1987; 7:449-61.
23. Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc* 1996; 46:927-39.
24. Dockery DW, Pope CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Pub Health* 1994; 15:107-32.
25. Ostro B, Chestnut L. Assessing the health benefits of reducing particulate matter air pollution in the United States. *Environ Res* 1998; 76:94-106.
26. USEPA. Reference method for the determination of suspended particulate matter in the atmosphere (high-volume method). *Federal Register* 1982; 47:723-36.
27. USEPA. Reference method for the determination of particulate matter as PM10 in the atmosphere. *Federal Register* 1987; 52:24664.
28. NOM-035-ECOL-1993. Norma Oficial Mexicana. "Que establece los métodos de medición para determinar la concentración de partículas suspendidas totales en el aire ambiente y el procedimiento para la calibración de los equipos de medición". *Diario Oficial de la Federación* 1993.
29. NOM-024-SSA1-1993. Norma Oficial Mexicana. "Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto a partículas suspendidas totales (PST). Valor normado para la concentración de Partículas Suspendidas Totales (PST) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población". *Diario Oficial de la Federación* 1994.
30. NOM-025-SSA-1993. Salud Ambiental. "Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto a partículas menores de 10 micras (PM10). Valor normado para la concentración de partículas menores de 10 micras (PM10) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población. *Diario Oficial de la Federación* 1994.
31. USEPA. National ambient air quality. Standards for particulate matter: final rule. Part II. *Federal Register* 40CFR. Part 50, July 18 1997.
32. Seemayer NH, Hadnagy W, Tomingas R. Mutagenic and carcinogenic effects of airborne particulate matter from polluted areas on human and rodent tissue cultures. En *Advances in Aerobiology*. (Boehm G, Leuschner RM. Eds.). Birkhäuser Verlag, Basilea 1987; 231-34.
33. Diederer HS, Guicherit R, Hollander JCT. Visibility reduction by air pollution in the Netherlands. *Atmos Environ* 1988; 19:377-83.
34. Villalobos-Pietrini R, Blanco S, Gómez-Arroyo S. Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmos Environ* 1995; 29:517-24.
35. Garner RC, Stanton CA, Martin CN, Chow FL, Thomas W, Hubner D, Herrmann R. Bacterial mutagenicity and chemical analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and some nitro derivatives in environmental samples collected in West Germany. *Environ Mutagen* 1986; 8:109-17.
36. de Raat WK, Kooijman SA, Gielen JW. Concentrations of polycyclic hydrocarbons in airborne particles in The Netherlands and their correlation with mutagenicity. *Sci Total Environ* 1987; 66:95-114.
37. de Raat WK. Polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagens in ambient air particles. *Toxicol Environ Chem* 1988; 16:259-79.
38. Cederlöf R, Doll R, Fowler B, Friberg L. Air pollution and cancer: risk assessment methodology and epidemiological evidence. Report of a task group. *Environ Health Perspect* 1978; 22:1-12.
39. Masclet P, Pistikopoulos P, Beyne S, Mouvier G. Long range transport and gas/particle distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons at a remote site in the Mediterranean Sea. *Atmos Environ* 1988; 22:639-50.
40. Baek SO, Goldstone ME, Kirk PWW, Lester JN, Perry R. Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. *Chemosphere* 1991; 22:503-20.
41. Wallace LA. Comparison of risk from outdoor and indoor exposure to toxic chemicals. *Environ Health Perspect* 1991; 95:7-13.

42. Lee SF, Schuetzle D. Sampling, extraction, and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from internal combustion engines. En Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. (Björseth A. Ed.). Marcel Dekker, Nueva York, Vol. 1 1983; 27-94.
43. Yamasaki H, Kuwata K, Miyamoto H. Effects of ambient temperature on aspects of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Sci Technol 1982; 16:189-94.
44. McVeety BD, Hites RA. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces: a mass balance approach. Atmos Environ 1988; 22:511-36.
45. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Natl Acad Sci (USA) 1973; 70:782-86.
46. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215.
47. Graf U, Würzler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen 1984; 6:153-88.
48. Graf U, Juon H, Kägi A, Katz AJ, Frei H, Würzler FE. A pilot study on a new *Drosophila* spot test. Mutat Res 1983; 120:233-29
49. Rodes CE, Evans EG. Preliminary assessment of 10 µm particulate sampling at eight locations in the United States. Atmos Environ 1985; 19:293-303.
50. van der Meulen A, van Elzakker BG, van der Hoof GN. PM10: results of a one-year monitoring survey in the Netherlands. JAPCA 1987; 37:812-18.
51. Committee of the Environmental and Occupational Health. State of the art. Health effects of outdoor air pollution. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153:3-50.
52. Hileman B. Particulate matter: the inhalable variety. Environ Sci Technol 1981; 15: 983-986.
53. Marshall J. El aire en que vivimos-la contaminación del aire: qué debemos hacer para combatirla. Diana, México 1979; 127.
54. Flato S, Hemminki K, Thunberg E, Georgellis A. DNA adduct formation in the human nasal mucosa as a biomarker of exposure to environmental mutagens and carcinogens. Environ Health Perspect 1996; 21:471-73.
55. Kelly TJ, Mukund R, Spicer CW, Pollack AJ. Concentrations and transformations of hazardous air pollutants. Environ Sci Technol 1994; 28:378A-87A.
56. Natusch DFS. Potentially carcinogenic species emitted to the atmosphere by fossil-fuelled power plants. Environ Health Perspect 1978; 22:79-80.
57. Müller M, Alfheim I. Mutagenicity of air samples from various combustion sources. Mutat Res 1983; 116:35-46.
58. Alsberg T, Stenberg U, Westerholm R, Strandell M, Rannug U, Sundvall A, Romert L, Bernson V, Pettersson B, Toftgard R, Franzén B, Jansson M, Gustafsson JA, Egebäck KE, Tejlé G. Chemical and biological characterization of organic material from gasoline exhaust particles. Environ Sci Technol 1985; 19:43-50.
59. Sicherer-Roetman A, Ramlal M, Voogd CE, Bloemen HJ. The fractionation of extracts of ambient particulate matter for mutagenicity testing. Atmos Environ 1988; 22:2803-08.
60. DeMarini DM, Shelton ML, Bell DA. Mutation spectra in *Salmonella* of complex mixtures: comparison of urban air to benzo(a)pyrene. Environ Mol Mutagen 1994; 24:262-75.
61. DeMarini DM, Shelton ML, Bell DA. Mutation spectra of chemical fractions of a complex mixtures: role of nitroarenes in the mutagenic specificity of municipal waste incinerator emissions. Mutat Res 1996; 349:1-20.
62. van Houdt JJ, Alink GM, Boleij JSM. Mutagenicity of airborne particles related to meteorological and air pollution parameters. Sci Total Environ 1987; 61:23-36.
63. Alink GM, Smit HA, van Houdt JJ, Kolkman JR, Boleij JSM. Mutagenicity of airborne particulates at non-industrial locations. Mutat Res 1983; 116:21-34.
64. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*-mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31:347-64.
65. McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc Natl Acad Sci (USA) 1975; 72: 979-83.
66. McCann J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. Proc Natl Acad Sci (USA) 1976; 73:950-54.
67. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science 1979; 204:587-93.
68. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science 1983; 221:1258-63.
69. Villalobos-Pietrini R, Blanco-Jiménez S, Gómez-Arroyo S. Variation of mutagenic potency of airborne particles from southwestern Mexico City. Toxicol Environ Chem 1998 (en prensa).
70. Pitts JN, Harger W, Lokensgard DM, Fitz DR, Scorziell GM, Mejia V. Diurnal variations in the mutagenicity of airborne particulate organic matter in California's south coast air basin. Mutat Res 1982; 104:35-41.
71. Viras LG, Athanasiou K, Siskos PA. Determination of mutagenic activity of airborne particulates and of the benzo(a)pyrene concentrations in Athens atmosphere. Atmos Environ 1990; 24:267-74.
72. Pitts JN, van Cauwenberghe KA, Grosjean D, Schmid JP, Fitz DR, Belser WL, Knudson GB, Hynds PM. Atmospheric reactions of polycyclic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. Science 1978; 202:515-19.
73. Tokiwa H, Kitamori S, Takahashi K, Ohnishi Y. Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates. Mutat Res 1980; 77:99-108.
74. Kado NY, Guirguis NG, Flessel CP, Chan RC, Chang KI, Wesolowski JJ. Mutagenicity of fine (<2.5µm) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micropreincubation/microsuspension procedure. Environ Mutagen 1986; 8:53-66.
75. Cassellas M, Fernández P, Bayona JM, Solana AM. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). Chemosphere 1995; 30:725-40.

76. Löfroth G. Comparison of the mutagenic activity in carbon particulate matter and in diesel and gasoline engine exhaust. En Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Mixtures II (Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Strauss G, Nesnow S. Eds.). Plenum Press, Nueva York 1981; 319-36.
77. Siak J, Chan TL, Gibson TL, Wolff GT. Contribution to bacterial mutagenicity from nitro-PAH compounds in ambient aerosols. Atmos Environ 1985; 19:369-76.
78. Pitts JN Jr. Nitration of gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons in simulated and ambient urban atmospheres: a source of mutagenic nitroarenes. Atmos Environ 1987; 21:2531-47.
79. Alebic-Juretic A, Cvitas T, Klasinc L. Heterogeneous polycyclic aromatic hydrocarbon degradation with ozone on silica gel carrier. Environ Sci Technol 1990; 24:62-66.
80. Finlayson-Pitts BJ, Pitts Jr. JM. Tropospheric air pollution: ozone, airbornetoxics, polycyclic aromatic hydrocarbons and particles. Science 1997; 276:1045-52.
81. Gibson TL, Korsog PE, Wolff GT. Evidence for the transformation of polycyclic organic matter in the atmosphere. Atmos Environ 1986; 20:1575-78.
82. Hisamatsu Y, Nishimura T, Tanabe K, Matsushita H. Mutagenicity of the photochemical reaction products of pyrene with nitrogen dioxide. Mutat Res 1986; 172:19-27.
83. Arey J, Harger WP, Helmig D, Atkinson R. Bioassay-directed fraction of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts. Mutat Res 1992; 281:67-76.
84. Butler JP, Kneip TJ, Mukai F, Daisey JM. Interurban variations in the mutagenic activity of the ambient aerosol and their relations to fuel use patterns. En Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Mixtures IV (Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Strauss G, Nesnow S. Eds.). Plenum Press, Nueva York 1985; 233-46.
85. Castillo-Cervantes S, Morán-Pineda M, Flores-Ramos G, Sánchez-Rubio, González-Cruz L. Convertidor catalítico dual-IMP a base de metales no nobles. Rev Int Contam Ambient 1995; 11:39-46.
86. De Raat WK. Genotoxicity of aerosol extracts. Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations. Mutat Res 1983; 116:47-63.
87. Atherholt TB, MacGarrity GJ, Louis JB, McGeorge LJ, Lioy PJ, Daisey JM, Greenberg A, Darack F. Mutagenicity studies of New Jersey ambient air particulate extracts. En Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Mixtures IV (Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Strauss G, Nesnow S. Eds.). Plenum Press, Nueva York 1984; 211-31.
88. Nardini B, Clonfero E. Mutagens in urban air particulate. Mutagenesis 1992; 7:421-25.
89. Crebelli R, Fuselli S, Meneguz A, Aquilina G, Conti L, Leopardi P, Zijno A, Baris F, Carere A. *In vitro* and *in vivo* mutagenicity studies with airborne particulate extracts. Mutat Res 1988; 204:565-75.
90. Lockard JM, Viau CJ, Lee-Stephens C, Caldwell JC, Wojciechowski JP, Enoch HG, Sabharwal PS. Induction of sister chromatid exchanges and bacterial revertants by organic extracts of airborne particles. Environ Mutagen 1981; 3:671-81.
91. Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México. Comportamiento de los Contaminantes en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, período 1987-1994. México 1995.
92. Lindsley DL, Zimm GG. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, 1992; 1133.
93. García-Bellido A, Dapena J. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. Mol Gen Genet 1974; 128:117-30
94. Frölich A, Würgler FE. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutat Res 1990; 234:71-80.
95. Magnusson J, Ramel C. Inhibitor of poly(ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. Mutagenesis 1990; 5:511-514.
96. Frei H, Würgler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat Res 1988; 203:297-308.
97. García-Bellido A, Merriam JR. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol 1971; 24:61-87.
98. Delgado-Rodríguez A, Ortiz-Martelo R, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S, Graf U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Chemosphere 1998 (en prensa).
99. RAMA (Red Automática de Monitoreo Atmosférico). *Compendio Estadístico 1986-1995*. Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación, México 1996; 71.