

177  
rel.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" ESTUDIO DE UNA POBLACION EXPUESTA A  
HIDROARSENICISMO CRONICO POR MEDIO DE  
LA TECNICA DE ELECTROFORESIS DE CELULAS  
INDIVIDUALES ( SCGE ) "

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**MAHARA ANGELICA VALVERDE RAMIREZ**



MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



1995

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Valverde Ramírez Mahara Angélica

con número de cuenta 8625542-4 con el Título:

'Estudio de una población expuesta a hidroarsenicismo  
crónico por medio de la técnica de electroforesis de  
células individuales (SCGE)''

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Emilio	Rojas del Castillo	
<b>Director de Tesis</b>			
Dra.	Patricia	Ostrosky - Wegman	
Dra.	Sandra Luz	Gómez Arroyo	
Dra.	Maria Eugenia	Gonsbatt Bonaparte	
<b>Suplente</b>			
Dr.	Mario Agustín	Altamirano Lozano	
<b>Suplente</b>			

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México encabezado por la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman, bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo.**

A quien ya no está conmigo.

A mi Madre, Abuela y Familia  
con cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros del jurado: Dra. Patricia Ostrosky-Wegman, Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Mario Altamirano Lozano y al Dr. Emilio Rojas del Castillo por sus valiosas sugerencias.

Con especial admiración y cariño a la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, apoyo y valiosos consejos.

A Libia, Guillermo y Maricha por aclarar mis dudas, compartir sus conocimientos y gran ayuda.

A mis compañeros: Regi, Paty R., Anita, Miriam, Montse, Angélica, Paty G., Juliana, Vicky, Luis, Daniel y Salomón, siempre dispuestos a cooperar y hacer el trabajo más divertido.

A Silvia Santibañez por su ayuda.

A la Sra. Aurora Castillo.

A mi tía Maria Elena por su apoyo incondicional e impulso.

A Gaby por su amistad.

A CGC por todo.

**En especial a Emilio Rojas por creer en mi, sus enseñanzas, paciencia y amistad.**

## INDICE

	página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
Monitoreo	2
Metales	3
Genotoxicidad de metales	4
<b>ASPECTOS GENERALES DEL ARSÉNICO</b>	6
<b>ANTECEDENTES "COMERCA LAGUNERA"</b>	9
<b>ENSAYO COMETA</b>	11
<b>OBJETIVOS</b>	12
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	13
Obtención y preservación de muestras	13
Protocolo "Ensayo Cometa"	13
Método Estadístico	14
<b>RESULTADOS</b>	15
Estandarización del Ensayo Cometa	15
Biomonitoreo de la población expuesta a hidroarsenicismo	16
<b>DISCUSIÓN</b>	19
<b>CONCLUSIONES</b>	24
<b>COMENTARIOS</b>	25
<b>REFERENCIAS</b>	26
<b>APENDICES, TABLAS Y FIGURAS</b>	32

## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.- Elementos necesarios en cantidades traza y su función biológica en animales y humanos.**

**Tabla 2.- Evaluación de arsénico pentavalente y trivalente en diferentes sistemas de prueba.**

**Tabla 3.- Agentes evaluados mediante el ensayo cometa.**

**Tabla 4.- Clasificación de ensayos de corta duración.**

**Tabla 5.- Efecto del tiempo de desenrollamiento y electroforesis en la migración del ADN.**

**Tabla 6.- Rangos de migración del ADN (micrometros), correspondientes a testigos tomados de la bibliografía.**

**Tabla 7.- Promedio y rangos de desviación estandar de la migración del ADN en individuos de la población testigo y la expuesta cronicamente a arsénico.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Migración del ADN debida al tratamiento con peróxido de hidrógeno, en un mismo donador a temperatura ambiente y diferentes tiempos de desenrollamiento y electroforesis.

Figura 2.- Migración del ADN debida al tratamiento con peróxido de hidrógeno en dos donadores a temperatura ambiente.

Figura 3.- Efecto del tratamiento (50  $\mu\text{M}$ ) con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente y solución de lisis a pH 12, con diferentes tiempos de recuperación.

Figura 4.- Migración del ADN debida al tratamiento con peróxido de hidrógeno, en dos donadores a 37° C y solución de lisis con pH 12.

Figura 5.- Efecto del tratamiento (50  $\mu\text{M}$ ) con peróxido de hidrógeno a 37° C y solución de lisis a pH 12, con diferentes tiempos de recuperación.

Figura 6.- Migración del ADN debida al tratamiento con peróxido de hidrógeno, en dos donadores a 37° C y solución de lisis con pH 10.

Figura 7.- Efecto del tratamiento (50  $\mu\text{M}$ ) con peróxido de hidrógeno a 37° C y solución de lisis a pH 10, con diferentes tiempos de recuperación.

Figura 8.- Migración de ADN en individuos de la población testigo y la expuesta a hidroarsenicismo crónico.

Figura 9.- Promedio y rangos de desviación estandar de la migración del ADN en hombres testigos y expuestos cronicamente a arsénico.

## RESUMEN

En nuestro país existen varias poblaciones que se encuentran expuestas a diferentes agentes contaminantes, entre los que figuran metales y metaloides. Ambos son agentes que en diferentes sistemas de prueba han mostrado tener propiedades mutagénicas, carcinogénica, clastogénicas y teratogénicas, entre otras. Por este motivo, es de interés estudiar los efectos que un metaloide puede producir a los seres vivos, especialmente a los humanos.

En los últimos años se han desarrollado distintas técnicas que pueden ser empleadas para determinar genotoxicidad, tal es el caso de la electroforesis de células individuales, ó también conocida como ensayo cometa, ésta, es una técnica que detecta rompimientos de cadena sencilla o doble en la molécula del ADN debidos a sitios alcali - lábiles, la cual es capaz de detectar 1 rompimiento en el ADN por cada  $10^{10}$  daltones. En el presente trabajo se muestra el procedimiento seguido para la estandarización de dicha técnica en el laboratorio, según el protocolo propuesto por Singh et al. (1988), con la finalidad de aplicarlo en estudios de monitoreo de poblaciones expuestas y otras áreas afines. También se presenta un estudio del daño causado al ADN por efecto de la exposición a hidroarsenicismo crónico en la población de Santa Ana que se localiza en la Comarca Lagunera entre los estados de Durango y Coahuila. En los resultados se encontraron diferencias significativas en la migración del ADN entre los individuos expuestos a hidroarsenicismo y los testigos, además, se observaron diferencias relacionadas con el sexo de los individuos.

## INTRODUCCIÓN

Con el avance científico y tecnológico entre otros aspectos, la contaminación ambiental se incrementa paulatinamente. Por ello, el ser humano se expone constantemente a una gran cantidad y variedad de agentes contaminantes, entre los que se encuentran los metales y metaloides. Debido a que cada vez es mayor el contacto con éstos agentes, en los últimos años ha aumentado el interés de estudiar los efectos que los metales, especialmente aquellos considerados peligrosos (WHO 1981, IARC 1982, EPA 1984), tienen sobre los humanos y los animales a corto y largo plazo (Fishbein et al. 1987).

Las agencias encargadas de determinar la peligrosidad de las sustancias, recurren a la aplicación de múltiples áreas de estudio. Dentro de las evaluaciones que se hacen para determinar dicha peligrosidad, se encuentran el monitoreo ambiental y el biológico (Fishbein et al. 1987).

El monitoreo ambiental en su significado más amplio incluye la detección de la concentración de cierto agente en cualquier ambiente (agua, aire, suelo, comida, etc) (Clarkson et al. 1988), mientras que el monitoreo biológico se ha definido como una medición repetida o sistemática y continua, de la valoración de agentes y sus metabolitos en tejidos, secreciones, excreciones, aire expirado o alguna combinación de éstos para evaluar la exposición a agentes que implican un riesgo, con el propósito de prevenir efectos sobre la salud y tomar las medidas correctivas necesarias (Fishbein et al. 1987).

El monitoreo biológico y la estimación de riesgo para la salud por exposición se realiza a través de determinar la presencia del agente en el organismo. Este nivel intraindividual puede ser estimado directamente por la medición de los compuestos o de sus metabolitos en el material biológico muestreado, o indirectamente por la cuantificación de un efecto biológico secundario relacionado al nivel intraindividual del agente. La presencia de riesgo se aprecia respecto a los niveles biológicos medios permisibles (Índices de exposición biológica). La medición de exposición normalmente se realiza a nivel individual, pero también puede efectuarse en grupos (Fishbein et al. 1987).

Los materiales biológicos más frecuentemente utilizados en el monitoreo son, sangre y orina, en menor proporción se utilizan dientes, saliva, pelo, uñas, aire expirado, heces, leche, placenta, etc. Sin embargo, para ciertos metales es posible detectar sus niveles directamente en algunos tejidos (hígado, riñón, médula) *in vivo*. Dependiendo del metal, los parámetros biológicos analizados pueden medir la dosis que se absorbió durante cierto intervalo de tiempo, la cantidad almacenada en distintos compartimentos del cuerpo y el nivel en el

tejido blanco. Cuando ésto es posible, el monitoreo biológico ofrece más ventajas que el monitoreo ambiental (Fishbein et al. 1987).

Si un metal ejerce toxicidad después de entrar al cuerpo (por ejemplo, el plomo), un parámetro biológico que refleje el nivel dentro del organismo es necesariamente más certero con relación a los efectos biológicos secundarios que cualquier medición ambiental (Fishbein et al. 1987).

El monitoreo biológico toma en cuenta la absorción por todas las vías, también considera la exposición de todos los orígenes (ambiental y ocupacional). Para ciertos metales, el monitoreo biológico puede medir la carga corporal, que es importante en la evaluación de riesgo asociado con metales acumulativos. Finalmente el monitoreo biológico puede tomar en cuenta distintos factores con influencia en la absorción, como las propiedades fisicoquímicas del metal (solubilidad, tamaño de las partículas), diferencias interindividuales en rangos de absorción, parámetros ventilatorios (en el caso de exposición ocupacional) y hábitos de higiene personal. La medición precisa y correcta de los metales en materiales biológicos no es siempre una labor fácil por el hecho de que éstos elementos se encuentran presentes en el ambiente a bajas concentraciones.

La exposición humana a metales y metaloides (arsénico (As), selenio (Se), berilio (Be), cromo (Cr), cadmio (Cd), níquel (Ni), mercurio (Hg) y plomo (Pb)), así como a otro tipo de contaminantes puede deberse a factores ocupacionales, ambientales, o bien, de dieta (Cohen 1987, Fishbein et al. 1987).

Metales y metaloides como el magnesio (Mg), cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co), molibdeno (Mo), vanadio (V), estaño (Sn), As, Se, Cd, Cr y Ni que se requieren nutricionalmente por animales y humanos en cantidades de miligramos o microgramos diarios para crecer y realizar adecuadamente sus funciones biológicas se denominan elementos traza, o bien, micronutrientes (Tabla1). Algunos de estos metales, se han reportado como carcinógenos y mutágenos en sistemas de prueba animal, siendo el Se el único descrito como anticarcinógeno (Fishbein et al. 1987, Leningher 1989).

El estudio de los metales traza tiene algunos problemas entre los que se encuentra el establecimiento de los requerimientos óptimos diarios y su biodisponibilidad, puesto que sólo ha sido posible determinar los niveles de toxicidad los de la deficiencia marginal, a través de estudios realizados en grupos de alto riesgo (Fishbein et al. 1987). Otro problema, es que es necesaria la elaboración de vías metabólicas básicas de ciertos metales traza que causan síntomas y deficiencias clínicas. Por otro lado, se sabe que el papel de los elementos traza en el desarrollo y transformación son alterados

por la inmunocompetencia y éste tiene gran importancia en la respuesta y supresión tumorigénica (Fishbein et al. 1987).

La mayoría de los metales ejercen toxicidad en múltiples órganos blanco mediante enzimas de membranas celulares y de organelos (Goyer 1991). Generalmente el efecto tóxico de los metales involucra la interacción entre un ion metálico libre y el blanco toxicológico; aunque es probable que sean varias las razones involucradas en el efecto tóxico (Goyer 1991).

Las células involucradas en el transporte de metales son las gastrointestinales, las de hígado, y las de los túbulos renales principalmente, sin embargo, para muchos metales estas células presentan mecanismos protectores que consisten en la formación de complejos proteínicos con el metal para desintoxicar (Goyer 1991).

Numerosos factores influyen en la toxicidad a nivel individual: la edad, dieta e interacción y exposición simultánea con otros metales tóxicos (Goyer 1991). La interacción metal-metal posiblemente influye en la relación dosis-efecto. Así también, factores de "estilo de vida" tales como el fumar y el beber pueden tener influencia indirecta en la toxicidad de los metales. El humo del cigarro por sí mismo contiene algunos metales entre los que figura el cadmio. El consumo de alcohol puede contribuir indirectamente porque reduce los niveles de minerales esenciales, mediante esta vía puede disminuir el nivel de calcio y ello provoca a una mayor toxicidad por parte de los metales (Goyer 1991). Por otro lado, la especiación química del metal puede ser un factor importante, en la absorción en términos de la distribución corporal y efectos tóxicos (Goyer 1991). Estas interacciones pueden ser divididas por tener efectos carcinogénicos y no-carcinogénicos (Fishbein et al. 1987).

La acción genotóxica de los metales se ha utilizado para determinar si dichos compuestos son potencialmente carcinogénicos. El término genotoxicidad se puede definir como la alteración producida en el material genético por ciertos agentes aún a concentraciones subtóxicas (Brusick 1987). En las últimas dos décadas se han tratado de desarrollar pruebas genotóxicas de corta duración, que tengan una alta probabilidad de predecir cuales agentes químicos son carcinógenos en animales (Fishbein et al. 1987). Sin embargo las correlaciones no son directas.

Flessel (1978) describió los efectos de algunos metales inorgánicos en la prueba de Ames en *Salmonella*, el ensayo Rec, en *E. coli* y sus fagos, así como observaciones citológicas en organismos superiores, encontró que en uno u otro sistema, metales como As, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Pt y Se fueron positivos. Sin embargo no se presentó un patrón uniforme en la correlación de éstos resultados con carcinogénesis. En una compilación realizada por De Flora (1981), algunos compuestos del cromo tuvieron actividad en la prueba de

Ames/*Salmonella*; pero disminuyó la actividad en presencia del sistema de activación metabólica, S-9. Posteriormente, Hansen y Stern (1984) así como Furst y Radding (1984) publicaron una revisión de la evaluación de metales a través de estos sistemas y una vez más no pudieron establecer correlación. Leonard y colaboradores (1984) estudiaron la mutagenicidad y carcinogenicidad de un determinado número de metales industriales y listaron en orden decreciente de mutagenicidad algunos metales como : Cr, Be, As, Ni, Hg, Cd, Pb. También tomaron en cuenta el número de gente expuesta y agruparon a los metales por su potencial carcinogénico de mayor a menor : As, Cr, Ni, Be, Pb=Cd=Hg, siendo los últimos tres prácticamente inactivos. Ennever y Rosenkranz (1986) evaluaron los resultados de varias pruebas de genotoxicidad de corta duración. Algunos sistemas de evaluación demostraron que pocos iones metálicos fueron mutagénicos.

Backer (1985) estudió el porqué las pruebas genotóxicas de metales no son buenos indicadores de carcinogenicidad potencial y estableció que la falta de compatibilidad entre ensayos eucariontes y procariontes puede afectar en la correlación, debido a que frecuentemente se consideran de igual forma los resultados obtenidos de éstos dos tipos de ensayo, sin tomar en cuenta las diferencias en el metabolismo, organización del material genético, etc, o lo que es lo mismo, a la compartimentalización que presentan los eucariontes y no así los procariontes. Otro factor que puede estar influyendo es la naturaleza de los compuestos inorgánicos, incluyendo el estado físico y químico de los metales, su solubilidad y la interacción con fosfatos en el medio. Backer (1985) concluye que las pruebas que detectan daño directo al ADN constituyen los mejores indicadores de carcinogenicidad potencial. Por ello es importante la evaluación de los metales por medio de ensayos que detectan efecto sobre el ADN como lo sería la evaluación de aductos, la elución alcalina o la electroforesis de células individuales, así como también es importante continuar desarrollando pruebas de genotoxicidad de corta duración más sensibles y precisas.

Uno de los metaloides que tiene mayor interacción con el ser humano, ya sea por factores ocupacionales, ambientales o de dieta, es el arsénico (Fishbein et al. 1987). Este ha sido considerado como carcinógeno humano por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC 1987), así como por Leonard y colaboradores (1984), con base en resultados obtenidos de sistemas de prueba humanos; puesto que la evaluación de dicho metaloide en animales, tanto procariontes como eucariontes, no ha proporcionado datos confiables como para considerarlo carcinógeno en ellos (Tabla 2). La exposición humana a agentes declarados como carcinógeno por alguna agencia internacional implican un riesgo para la salud (Homminki 1990), de ahí, la importancia de conocer más acerca de su mecanismo de acción.

## ASPECTOS GENERALES DEL ARSENICO

El arsénico es un metaloide cuya abundancia en el planeta es de 5 ppm, se encuentra con valencia +3 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) y +5 ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ), principalmente en estado sólido en forma de arsenopirita ( $\text{Fe}_2\text{As}_2\cdot\text{Fe}_2\text{S}_2$ ), enargita ( $3\text{Cu}_2\text{S}\cdot\text{As}_2\text{S}_5$ ) y orpimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), en estado líquido como tricloruro de arsénico ( $\text{AsCl}_3$ ); y en estado gaseoso como arsenamina ( $\text{AsH}_3$ ) (Fishbein et al. 1987, Carson et al. 1987).

En lugares donde existen depósitos de azufre, el arsénico está presente como sulfuro de arsénico y como arseniuro de algún metal, éste último estado del arsénico es capaz de contaminar los mantos freáticos, de los cuales algunas poblaciones se abastecen de agua (Fishbein et al. 1987, Carson et al. 1987).

La naturaleza química del arsénico en el ambiente no se conoce con exactitud, pero es sabido que en muchas zonas urbanas y suburbanas se presenta como una mezcla de arsénico inorgánico trivalente y pentavalente, predominando ésta última en la mayoría de los casos. Por otro lado, la forma química del arsénico metabolizado por el hombre es un compuesto que lo podemos encontrar en forma monometilada (ácido monometilarsónico), o bien de forma dimetilada (ácido dimetilarsónico) al que se le ha llamado ácido cacodílico (Bertolero et al. 1987, Leonard et al. 1993).

En párrafos anteriores se ha hablado de las fuentes naturales de arsénico, pero éste metaloide también es liberado al ambiente durante la fundición de metales, combustión de carbón mineral, producción de vidrio, semiconductores y otros procesos industriales (Bojian et al. 1982). Es también utilizado en la agricultura como plaguicida, fungicida y herbicida. Además se ha usado en el tratamiento de algunas enfermedades como, anemia, sífilis, pelagra, asma, reumatismo (NAS 1977) y psoriasis (Toyo y Fujiwara 1986).

Actualmete el arsénico, además de ser un agente tóxico también se considera genotóxico que ha mostrado tener actividad clastogénica y teratogénica en difrentes sistemas de prueba (Tabla.2) (Rossman et al. 1980, Bojian et al. 1982, Nordenson y Beckman 1982, Toyo y Fujiwara 1986, IARC 1987, Lee et al. 1988).

Principalmente son tres las vías por las cuales el arsénico entra en contacto con el humano, éstas son la dérmica, inhalación y oral. En cuanto a la primera, aún no hay evidencia de absorción directa de arsénico (Fishbein et al. 1987).

La inhalación es una vía indirecta que se presenta con mayor frecuencia en el ámbito laboral, por lo que se podría considerar que son poblaciones específicas e identificables las expuestas de esta manera. Los limites

permisibles por el servicio de salud pública de los Estados Unidos de América en el ambiente para arsénico orgánico son de 0.5 mg/m<sup>3</sup> y los de arsénico inorgánico son de 0.01 mg/m<sup>3</sup> (Fishbein et al. 1987).

La ingestión es una vía directa y se considera la principal fuente de exposición para las poblaciones. La ingesta puede ser por agua o alimentos, en cuanto a estos últimos, la mayor ingesta se debe a los mariscos. Se estima que el rango de ingesta diaria es de 0.15 mg - 0.40 mg / persona / día. Por otro lado, respecto a la ingesta por agua los límites permisibles por el servicio de salud pública de los Estados Unidos de América en 1987 son de 50 g/litro de agua potable, y por la Organización Mundial de la Salud en 1992 son de 10.0 g/litro de agua. Aunque muchas veces, en los depósitos subterráneos de agua, el arsénico llega a alcanzar concentraciones de 1100 g/litro (Fishbein et al. 1987, WHO 1992).

En los últimos años, estudios epidemiológicos muestran que en poblaciones expuestas crónicamente a arsénico, hay una mayor incidencia de enfermedades tales como hiperqueratosis, pie negro, cánceres de piel, de pulmón, de vejiga, de hígado, de sistema hematopoyético, de tracto gastrointestinal, de cavidad nasal y de riñón (Bojian et al. 1982, Cebrian et al. 1983, Lee et al. 1988, Ostrosky-Wegman et al. 1991, Bates et al. 1992). Con base en éstos antecedentes epidemiológicos se ha tratado de demostrar la carcinogenicidad del arsénico mediante la utilización de varios sistemas de prueba, estableciéndose que el arsénico es un carcinógeno en humanos, pero no así en animales debido a que las evidencias al respecto son pocas (Tabla 2) (Lee et al. 1988).

Se ha llegado a demostrar que la forma en que se metaboliza el arsénico es diferente entre el ser humano y algunas especies animales. Se ha encontrado que su absorción, distribución, metabolismo y excreción dependen en gran medida de factores tanto fisiológicos como ambientales, lo que podría explicar en cierta medida las diferencias en toxicidad y carcinogenicidad de éste metaloide en las distintas especies estudiadas (Lanz et al. 1950, Crecelius 1977, Pomroy et al. 1980, Vahter y Norin 1980, Buchet y Lauwerys 1981).

A través de los múltiples estudios que se han realizado para evaluar el arsénico, se ha especulado sobre los mecanismos de acción por los cuales es capaz de producir daño carcinogénico. Se ha observado que el arsénico afecta la oxidación en las mitocondrias de las células, porque estimula a la ATPasa de las mitocondrias y la oxidación en ausencia de fósforo inorgánico (Schiller et al. 1977, Fishbein et al. 1987).

Los efectos del arsénico sobre la división celular consisten en alteraciones del huso mitótico, detención de las células en metafase, formación de células poliploides, formaciones diplocromatídicas, cromosomas rezagados y un

decremento en el índice mitótico. (Roldán y Altamirano 1990). Estos efectos pueden atribuirse a la afinidad de los metales por los ligandos de sulfuro (Rossman 1989) y por lo tanto, por las proteínas del huso mitótico (Cherian 1987).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de algunos metales como el Cr, Ni, Cd y Co está relacionado con la capacidad de éstos por desplazar al magnesio de los sitios activos de enzimas que intervienen en la replicación, motivo por el cual hay una incorrecta identificación de las bases en la transcripción. Algunos autores consideran que el As podría presentar éste mecanismo de acción (Rossman et al. 1977, Toyo y Fujiwara 1986, Fishbein et al. 1987).

También se han postulado otros mecanismos por los cuales el arsénico causa daño genético, por ejemplo, el que el metal produce un aducto en el ADN (ácido desoxirribonucleico), que impide la realización de una replicación completa, se explica por el hecho de que algunos iones metálicos son capaces de reaccionar con el grupo fosfato de los nucleótidos e incluso de los nucleósidos, provocando la rigidez de la hélice de ADN y algunas veces formando macro-anillos. (Fishbein et al. 1987). Este tipo de mecanismo de acción podría explicar la inducción de aberraciones cromosómicas.

Por otro lado, se ha reportado que la carcinogenicidad del arsénico puede estar relacionada con la capacidad de intensificar la amplificación de genes en el desarrollo del cáncer, básicamente en la etapa de progresión. El mecanismo de acción por el cual se cree ocurre la amplificación de genes, es el de una recombinación por inhibición de la síntesis de ADN. (Lee et al. 1988).

El arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) en cultivo de linfocitos humanos es capaz de detener la división celular en las fases de S y G2 y alterar la segregación cromosómica, motivo por el cual se especula que interfiere con los microtúbulos (Petres et al. 1977, Vega 1991); el arsénico también puede producir rompimientos en el ADN al incorporarse en vez de fósforo, causando aberraciones cromosómicas, inducir intercambio de cromátidas hermanas y actuar comutagenicamente con otros compuestos. (Petres et al. a 1977, Zanzoni 1980, Nakamuro y Sayato 1981, Sweins 1983, Cherian 1987, Jha et al. 1992, Leonard et al. 1993). Por otro lado, estudios *in vitro* simulando las concentraciones en sangre de individuos expuestos crónicamente, muestran que el arsenito y arsenato de sodio inhiben la respuesta mitogénica de la fitohemaglutinina, así como también provocan una disminución del índice de replicación de manera dependiente de la dosis. (Vega 1991 y Gonsebatt 1994). También se ha demostrado la inducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en *Vicia faba*, al recibir tratamiento de agua contaminada con arsénico (Gómez-Arroyo et al. 1988).

## ANTECEDENTES "COMARCA LAGUNERA"

Cerca de 400,000 campesinos de la Comarca Lagunera de Durango y Coahuila han estado expuestos a agua contaminada con arsénico, en concentraciones que llegan hasta 15 veces más de lo recomendado como límite por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Durante los meses de febrero, marzo y abril de 1986, el problema del arsénico ocupó grandes lugares de la prensa, a pesar de que se remonta varias décadas (Lambari 1987).

Desde 1940 se empezó a detectar este problema en la zona de la Comarca Lagunera. Para el año de 1962, se registró un total de 217 personas con síntomas de una enfermedad de gravedad variable. Incluso hubo defunciones, que se comprobó se debían al arsénico contenido en el agua supuestamente potable de la región que entonces se atribuía a una compañía metalúrgica situada en las inmediaciones (Lambari 1987).

El arsenicismo en la Región de la Laguna tiene hoy en día una amplitud considerable y participan en él fuentes contaminantes naturales que afectan grandes extensiones de mantos acuíferos. El arsénico está presente en pequeñas cantidades en casi todos los suelos y puede incidir en proporciones bajas en el agua potable. El origen del problema en la Comarca Lagunera radica en la recarga de los mantos de agua subterránea; los 2,387 pozos que hay en la región han sido sobreexplotados y a medida que continúan abatiéndose los mantos freáticos, sigue en aumento la concentración del arsénico. De acuerdo con un estudio elaborado en la Universidad Autónoma de Coahuila, se calculó que solamente un 18 % del agua extraída era recargada, por lo que en consecuencia, los pozos se abaten a razón de 1.7 m por año. Hasta el 21 de febrero de 1986, los campesinos de la región fueron enterados por las autoridades de la contaminación por arsénico. Para ésta fecha se tenía calculado que el arsenicismo crónico de la zona afectaba a un 50 % de las 400,000 personas que vivían en la zona norte de la región (Lambari 1987).

El arsénico, más pesado que el agua, tiende a depositarse en el fondo de los mantos de agua subterránea. Al abatirse el nivel de los pozos por la sobreexplotación del agua, se incrementa la concentración de arsénico (Lambari 1987).

Entre los síntomas que presentan las víctimas del arsenicismo en la Comarca Lagunera están el cáncer de piel, necrosis en dedos, manos o piernas, infartos, falta de irrigación en los vasos sanguíneos, que provoca dolor y llega a producir gangrena, así como abortos. El arsénico, además, pasa a través de la placenta materna, por lo que hay un mayor número de niños nacidos muertos o que mueren en el primer mes después del nacimiento, entre

los más graves. Los síntomas menores incluyen desgano, sudoración excesiva, callosidades en las plantas de los pies y manos (Lambari 1987).

Para el mes de abril de 1986, la SEDUE declaró a la Comarca Lagunera como "zona de emergencia" e inició las acciones para la firma de un convenio con la Comisión Nacional de Ecología a efecto de aplicar un plan de emergencia para dotar de agua potable a las comunidades que padecen arsenicismo (Lambari 1987). Actualmente la zona afectada por el arsenicismo se abastece de agua potable de regiones aledañas, a través de un sistema de entubado.

Se han realizado estudios en ésta zona en el estado de Coahuila, México, donde la población está crónicamente intoxicada con As contenido en el agua de bebida (los niveles de As pentavalente del agua para beber son de 0.412 mg/l, (Gonsebatt 1994)). El hidroarsenicismo de ésta región se ha asociado con una alta incidencia de cáncer de piel y enfermedades como hiperqueratosis y pie negro (Cebrián et al. 1983).

La determinación de biomarcadores en un estudio piloto en individuos de esta región, no mostró efectos significativos en cuanto a la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, la mutación del locus HPRT y aberraciones cromosómicas, sin embargo la cinética de proliferación linfocitaria manifestó un claro retraso en el grupo expuesto a As (Ostrosky-Wegman et al. 1991). Así mismo, en un estudio realizado recientemente en esta región se mostró una disminución de la cinética de proliferación linfocitaria y en el índice mitótico (Gonsebatt 1994).

## ENSAYO COMETA

Los ensayos o pruebas de genotoxicidad, se han clasificado según las características de los eventos que pueden identificar, de tal forma que hay cuatro grupos: el que detecta mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño al ADN y transformación morfológica, ver tabla 3 (Brusick 1987). A su vez, las pruebas que evalúan daño al ADN se dividen en dos categorías una de ellas es la de las macrolesiones, en ésta, el daño al ADN tiene efectos detectables a través de análisis citológico o cromosómico. La otra categoría es la de las microlesiones, en ésta, los cambios ocurridos en el ADN pueden ser adiciones, deleciones o sustituciones a nivel de nucleótidos (Brusick 1987).

En los últimos años se ha propuesto una técnica que cuantifica el nivel de daño en el ADN de células individuales, a la cual se le conoce como "Ensayo Cometa" o bien, electroforesis de células individuales (SCGE) (Singh et al. 1988).

Las técnicas que permiten evaluar efecto en el ADN, tienen gran utilidad en estudios de toxicología ambiental, carcinogénesis y envejecimiento celular. Estas técnicas generalmente detectan el daño en tejidos y tipos celulares específicos. Sin embargo, el ensayo cometa tiene la ventaja de poder aplicarse a cualquier tejido, células aisladas y cultivos, pudiendo ser las muestras frescas ó congeladas, además, la evaluación se hace en células individuales (Singh et al. 1988). Otra ventaja de la técnica es que se requiere de un volumen de muestra muy pequeño debido a que basta con tener de 10,000 a 50,000 células por laminilla, es decir, si se utiliza sangre entera es suficiente con 5 ó 10  $\mu$ l de muestra. Por otro lado, a diferencia de otras técnicas como la elución alcalina, el ensayo cometa se realiza en poco tiempo (5 horas aproximadamente) y en general su costo es mucho más bajo. (McKelvey-Martin et al. 1993).

El ensayo cometa ha sido utilizado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, para detectar alteraciones en el ADN y reparación inducidos por diferentes agentes en una gran variedad de células de mamífero (Tabla 4). Su particular atributo en cuanto al rompimiento del ADN, es que tiene una gran cantidad de aplicaciones en estudios de daño al ADN, reparación, biomonitorio, análisis de productos biotecnológicos, etc. (McKelvey-Martin et al. 1993).

El ensayo cometa ó SCGE (single cell gel electrophoresis), es un sistema potencialmente sensible para medir la inducción de efecto genotóxico. La inducción de daño al ADN puede ser estudiado en cultivo de células, en cultivo de tejidos, o bien, en cultivo de células primarias en suspensión. Es posible utilizar éste método de detección para estudiar genotoxicidad *in vitro* y también *in vivo*.

El ensayo cometa presenta ciertas ventajas: a) Es posible investigar la extensión del ADN roto en virtud del tejido del animal experimental o de los especímenes de biopsias en humanos, puesto que se necesita de una pequeña cantidad de células ( $< 2 \times 10^5$ ), en comparación con la elución alcalina, que requiere de  $2 - 5 \times 10^6$  células por filtro. b) El procedimiento puede llevarse a cabo en pocas horas y si se cuenta con un analizador de imágenes los resultados se pueden evaluar inmediatamente. c) Los resultados indican que el SCGE es igualmente sensible que el ensayo de elución alcalina (McKelvey-Martin et al. 1993). Con respecto a la sensibilidad que tiene la técnica de SCGE, ésta es capaz de detectar desde 1 rompimientos de ADN por cada  $10^{10}$  daltones, lo cual significa que puede evaluar desde un sitio álcali lábil, hasta rompimientos de ADN de doble cadena; pero además, la cuantificación del daño es a nivel de células individuales, lo cual permite evaluar efecto a nivel de subpoblaciones celulares de un mismo individuo.

El ensayo cometa se ha aplicado en el monitoreo de poblaciones susceptibles a daño oxidante, radiación ionizante y U.V., utilizando muestras de linfocitos humanos. Debido a que es una técnica relativamente simple, rápida y no costosa, se ha usado en el biomonitoreo de trabajadores expuestos a sustancias peligrosas. Sin embargo el monitoreo a través del ensayo cometa no sólo se limita a poblaciones humanas, por ejemplo se ha empleado en el monitoreo de peces y gusanos de tierra expuestos a contaminación ambiental. La capacidad de detectar daño en células individuales, hace posible identificar subpoblaciones resistentes o sensibles a un determinado agente. Otra ventaja del ensayo en el monitoreo, es que permite analizar un número de células estadísticamente adecuado. La identificación de subpoblaciones celulares con ADN afectado con drogas o radiación depende minimamente de la heterogeneidad en el daño detectado en poblaciones de células homogéneas. La heterogeneidad del efecto al ADN en las poblaciones es bastante pequeño (coeficiente de variación menor al 20 %) cuando las condiciones de lisis y electroforesis son óptimas. (McKelvey-Martin et al. 1993).

Este trabajo tuvo como propósitos estandarizar la técnica de electroforesis de células individuales (SCGE) en el laboratorio así como determinar si la exposición crónica a arsénico de la población de Santa Ana, Coahuila muestra mayor daño en el ADN, que la población de Nazareno la cual presenta niveles por debajo de los límites recomendados de As, ambas poblaciones localizadas en la Comarca Lagunera de los estados de Durango y Coahuila.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

La obtención de muestras se realizó del 22 de febrero al 4 de marzo de 1992. Se obtuvo sangre de 59 individuos (24 a 68 años de edad), 28 de ellos pertenecientes a la población testigo (Nazareno, Durango) y los 31 restantes, a la población expuesta (Santa Ana, Coahuila).

Las muestras de sangre se extrajeron con jeringas estériles, previamente heparinizadas, se codificaron y se enviaron al laboratorio aproximadamente en 3 horas, en dónde se separaron los linfocitos (Boyum 1968) en alicuotas a una concentración de  $1 \times 10^7$  cels/ml, en cuyo volumen final había 10 % de DMSO y 30 % de suero autólogo, se congelaron en tanques con nitrógeno líquido.

Posteriormente, los linfocitos congelados se procesaron mediante el ensayo cometa, para detectar daño al ADN.

### PROTOCOLO "ENSAYO COMETA"

La técnica, consiste en preparar laminillas embebiendo células en agarosa para darles soporte, posteriormente, se sumergen en una solución de lisis la cual tiene gran contenido de detergentes y sales para lisar las membranas celulares, después, las laminillas sumergidas en un amortiguador son sujetas a un tiempo denominado de desenrollamiento de las hebras del ADN (unwinding), posteriormente al exponerse a una corriente eléctrica y dependiendo del daño presente en el ADN se observara una mayor o menor migración. Después se neutraliza con un amortiguador de pH 7.5, al termino de lo cual se tiñen las laminillas con un fluorocromo para poder analizarlas al microscopio. El ADN roto migra más en el campo eléctrico, y las células al ser observadas asemejan un "cometa", con una cabeza altamente fluorescente y una "cola" que incrementa con el daño (Singh et al. 1988).

En el apéndice A se indica detalladamente la metodología de la técnica de electroforesis de células individuales.

## MÉTODO ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba estadística "t" de Student con una  $p < 0.05$  para evaluar las diferencias estadísticas entre la migración de ADN en individuos expuestos a hidroarsenicismo y los individuos testigos.

También se calculó la "t" de Student con una  $p < 0.05$  para comparar dos o más regresiones lineales (Zar,1989), con la finalidad de comparar los coeficientes de correlación de la migración de ADN y variables como la edad, el tiempo de residencia, índice motótico (IM-72 horas), índice de replicación (IR-72 horas), cantidad de As en orina y la frecuencia de aberraciones cromosómicas de individuos de la población testigo y la expuesta a hidroarsenicismo crónico.

## RESULTADOS

### ESTANDARIZACION DEL ENSAYO COMETA

Para estandarizar la técnica se trabajó con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es un compuesto ampliamente evaluado, siguiendo el protocolo de Singh et al. (1988). Durante ésta etapa, se evaluaron los efectos de diferentes parámetros de la técnica tales como el tiempo de desenrollamiento y electroforesis, la temperatura a la que se aplicó el tratamiento y el pH del amortiguador de lisis y neutralización.

Para valorar el efecto de los tiempos de desenrollamiento y electroforesis se realizaron experimentos dosis - respuesta en los que las condiciones de dichos parámetros fueron modificadas, éstos ensayos se hicieron con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (25, 50, 75 y 100  $\mu M$ ) en muestras de un mismo donador, ver figura 1. Teniendo como antecedente los datos obtenidos en dichos experimentos, se procedió a establecer el mejor tiempo para cada uno de los parámetros anteriores, utilizando muestras de sangre entera y linfocitos congelados (ambas sin tratamiento alguno), de tal forma que fueron variados los tiempos de desenrollamiento y electroforesis. Los resultados se muestran en la tabla 5, donde es posible observar que para muestras de sangre entera se determinó un tiempo de 20 minutos para cada uno de los parámetros y en el caso de muestras de linfocitos aislados y congelados se determinó 10 minutos para cada caso.

Una vez establecidos los tiempos para el desenrollamiento y la electroforesis, el siguiente efecto a valorar fué la temperatura a la cual se aplicó el tratamiento, comparando entre temperatura ambiente y 37° C (controlando la temperatura en un baño de agua). En primer lugar se estableció una curva dosis - respuesta con las mismas concentraciones de  $H_2O_2$ , para dos donadores a temperatura ambiente (figura 2). Al obtener repetibilidad de los resultados y debido a que la técnica también permite evaluar la recuperación de daño al ADN (reparación) a diferentes tiempos después del tratamiento, se realizó esta evaluación en dos donadores que recibieron tratamiento in vitro a temperatura ambiente con una concentración de  $H_2O_2$ , en la cual se había observado daño, dicha concentración fue 50  $\mu M$  (figura 3). Los resultados obtenidos al evaluar la recuperación del daño al ADN, coinciden con los reportados en la bibliografía (Singh et al. 1988).

Los experimentos posteriores se llevaron a cabo aplicando el tratamiento a 37° C. Se realizó nuevamente una curva dosis - respuesta con las concentraciones utilizadas en ocasiones anteriores de  $H_2O_2$  para dos donadores, ver figura 4. Al efectuar ésta curva se observó que al controlar las condiciones de temperatura, en los testigos hubo un incremento de la

migración de ADN, pero en general, el comportamiento de la curva fue el mismo. Para evaluar la recuperación del daño bajo condiciones de temperatura controlada se utilizó nuevamente la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figura 5). Al comparar los resultados de la recuperación del daño, bajo condiciones de temperatura controlada y sin controlar, se noto un comportamiento semejante aunque la recuperación del daño fue más rápida cuando las condiciones de temperatura se controlaron.

El último parámetro modificado durante la estandarización de la técnica para evaluar su efecto, fue el pH de las soluciones utilizadas para la lisis y la neutralización de las laminillas. En los experimentos anteriores el pH para la solución de lisis y neutralización fue de 12 y 9.5 respectivamente. En los posteriores el pH se modificó a 10 para la lisis y 7.5 para la neutralización. De tal manera que controlando tanto la temperatura del tratamiento, así como el pH de las soluciones se hizo una curva dosis-respuesta con las cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  previamente utilizadas (figura 6), así como también la evaluación de la recuperación de daño utilizando 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para dos donadores a 37° C (figura 7). En ambos casos el comportamiento de las curvas fue similar al obtenido bajo condiciones controladas de temperatura y pH 12 y 9.5 para la lisis y neutralización, respectivamente. Pero en la curva dosis respuesta (figura 6) es posible apreciar una aparente disminución de la migración de ADN en la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , aparente, porque al analizar las laminillas se evidencia una gran cantidad de núcleos muy dañados, denominados "nubes".

Finalmente al comparar los resultados con los descritos en la literatura mundial, se observó que los resultados son semejantes, en cuanto al comportamiento de las curvas y los rangos de migración de ADN, así como también el rango de migración que presentan nuestros testigos es igual al de la bibliografía (tabla 6); por tal motivo se consideró que la técnica de SCGE se estandarizó en el laboratorio.

## BIOMONITOREO DE LA POBLACIÓN EXPUESTA A HIDROARSENICISMO

Una vez estandarizada la técnica, fue aplicada a muestras de linfocitos congelados de individuos de la población testigo (Nazareno) y expuesta (Santa Ana). Tal como ya se mencionó en los resultados de la estandarización, se utilizaron los tiempos determinados tanto para el desenrollamiento como para la electroforesis de linfocitos congelados (10 minutos).

Los datos obtenidos de la migración de ADN de 50 células por cada laminilla de las dos analizadas por individuo, fueron promediados para manejar un sólo dato por individuo.

La migración de ADN (en micrometros  $\mu\text{m}$ ) de los individuos de la población testigo y la expuesta, con sus respectivas medias y rangos de desviación se muestran en la tabla 7 y la figura 8, al aplicar a éstos resultados la prueba "t" de Student con una  $p < 0.05$ , resulta haber diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones. Tal como se aprecia en la figura 8 la distribución de los datos correspondientes a la migración del ADN es más amplia en los individuos de la población expuesta que en la testigo.

Por otro lado, se realizó una comparación a través de la prueba "t" de Student de la media en la migración de ADN con sus respectivos rangos de desviación estándar entre los hombres de ambas poblaciones y estadísticamente resultó no haber diferencias significativas entre ellos. Esto se evidencia en la figura 9, en la misma gráfica se aprecia que los hombres de ambas poblaciones muestran rangos de desviación estándar muy pequeños, así como un valor promedio de la migración del ADN similar. Sin embargo, cuando se comparó por el mismo método la media en la migración de ADN y sus rangos de desviación estándar entre las mujeres de la población expuesta y testigo en este caso, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las poblaciones, ver figura 10, en donde es importante apreciar que los rangos de distribución dados por la desviación estándar son elevados en las mujeres de ambas poblaciones.

Al analizar las laminillas de la técnica de SCGE, se cuantificó el número de núcleos muy dañados (nubes), pero debido que no se presentaron diferencias de éste parámetro entre las poblaciones no fue posible establecer alguna correlación entre el número de núcleos muy dañados con la migración del ADN de los individuos de ambas poblaciones.

Los resultados mostrados anteriormente corresponden a los obtenidos directamente mediante la técnica de SCGE, en este estudio también se pretendió correlacionar dichos datos con variables tales como la edad, el tiempo de residencia, el nivel de arsénico en orina, el índice mitótico, el índice de replicación y la frecuencia de aberraciones cromosómicas que fueron determinadas a partir de las mismas muestras por Gonsebatt (1994), pero a pesar de no haber correlación entre dichas variables y la migración de ADN se observa que la tendencia de las correlaciones presentan un determinado comportamiento, sobre el cual se pueden hacer algunas especulaciones tomando como base evidencias bibliográficas. Además, mediante una "t" de Student para correlaciones se determinó si el comportamiento entre ambas poblaciones fue diferente.

Con respecto a la edad, en la figura 11 se muestra la tendencia en la correlación entre dicha variable y la migración de ADN de los individuos expuestos y los testigo, pudiendo observar que en los primeros hay un ligero incremento en la migración de ADN conforme aumenta la edad. A éste

respecto cabe mencionar que no fué posible establecer diferencias estadísticas ("t" de Student para correlaciones, Zar 1989).

Considerando al tiempo de residencia de los individuos de ambas poblaciones como una variable que pudiera reflejar los años de exposición, en la figura 12 se observa que hay una tendencia a incrementar ligeramente la migración de ADN en relación al incremento del tiempo de residencia únicamente por parte de los individuos expuestos puesto que los individuos testigo muestran un comportamiento constante en la migración de ADN con respecto al tiempo de residencia. Al comparar mediante una "t" de Student para correlaciones (Zar, 1989) los años de residencia y la migración del ADN de los individuos de ambas poblaciones se determinaron diferencias entre ellas ( $p < 0.05$ ).

Gonsebatt (1994) determinó que la cantidad de arsénico en orina es diferente estadísticamente entre las poblaciones como se muestra en la figura 13, en ésta se aprecia la distribución de la cantidad de arsénico en los individuos de ambas poblaciones mostrándose que los mayores niveles de arsénico se evidenciaron en los individuos expuestos y a pesar de ello no se pudo establecer una correlación entre la concentración de arsénico en orina y la migración del ADN.

Otro de los parámetros considerados fue el índice mitótico (MI) a 72 horas de cultivo, en la figura 14 se observa que la tendencia en los datos es una disminución en el IM conforme aumenta la migración de ADN por parte de ambos grupos de individuos, presentándose diferencias estadísticas determinadas de la misma forma que las correlaciones anteriores, es decir mediante una "t" de Student para correlaciones ( $p < 0.05$ ).

En la figura 15 se indica la correlación entre el índice de replicación (IR) a 72 horas de cultivo y la migración de ADN, observándose un comportamiento diferente entre ambas poblaciones. En la población testigo no se nota tendencia en la correlación, mientras que la expuesta muestra una ligera disminución en el IR, conforme incrementa la migración de ADN. De tal manera que hay diferencias estadísticas entre las poblaciones ( $p < 0.05$ ), determinadas igual que los casos anteriores.

Finalmente, con respecto a la frecuencia de aberraciones cromosómicas en la figura 16 es posible apreciar que los individuos de ambas poblaciones no son diferentes entre ellos, determinado de igual forma que los casos anteriores ("t" de Student para correlaciones).

## DISCUSIÓN

La técnica de SCGE se ha desarrollado de modo empírico y por ello hay la necesidad de estandarizar y entender el mecanismo por el cual funciona (Mackelvey-Martin et al. 1993). Para estandarizar el método de SCGE en el laboratorio se inició determinando los tiempos de dos de sus parámetros: desenrollamiento y electroforesis y se mantuvieron constantes los parámetros restantes de la técnica, esto debido a que variables como el voltaje, la corriente y el pH de las soluciones al ser modificadas alteran la migración de ADN evaluada. Por ello Singh et al. (1988), proponen que los parámetros de la técnica antes mencionadas, se pueden modificar dependiendo de lo que se desee identificar, por ejemplo, rompimiento de una sola hebra, ó bien, de doble hebra. Los rompimientos de una sola hebra son detectados por un procedimiento que incluye tratamiento a pH alto o bien un desenrollamiento bajo condiciones alcalinas (Singh et al. 1988, Mackelvey-Martin et al. 1993). El principio es que sólo si las bases apareadas del ADN están separadas por alcalinidad las discontinuidades en la hebra simple pueden ser detectadas. A pH neutro, la continuidad de la longitud de la molécula dúplex no es afectada por rompimiento de una sola hebra ocasional (Mackelvey-Martin et al. 1993). Así pues, tal como se observa en la metodología, la técnica se estandarizó bajo condiciones de alcalinidad tanto para la lisis, desenrollamiento y electroforesis, lo cual significa que se detectaron rompimientos de una sola hebra de ADN. Otro parámetro importante con respecto a la estandarización lo representa el tipo celular con el que se trabaja (tabla 5), puesto que las células se comportan de diferente manera según las condiciones bajo las que se realiza la técnica. Se observó que el comportamiento difería si se trabajaba con sangre entera o con células aisladas y congeladas, las diferencias se determinaron puesto que los testigos de cada tipo celular presentaban migración del ADN que variaba según los tiempos del desenrollamiento y la electroforesis, esto quiere decir que es preciso estandarizar la técnica para cada tipo celular. Así mismo es de suma importancia que los grupos que emplean la técnica, trabajen con las mismas condiciones para todos los parámetros de la técnica dependiendo del tipo celular, puesto que esto facilita la comparación de resultados.

Con respecto al propósito de demostrar si la exposición crónica a arsénico de la población de Santa Ana, Coahuila causa daño al ADN detectado por el ensayo cometa, se pueden discutir varios aspectos. Como se mencionó en los resultados, hay diferencias significativas en la migración de ADN de la población expuesta y la testigo, además los rangos de distribución de la población expuesta son más amplios, es decir, hay una mayor variabilidad en la migración de ADN de éstos individuos, lo cual podría deberse al grado de exposición al hidroarsenicismo. Podemos decir que la mayor migración por parte de la población expuesta es debida en gran medida a la migración que

presentan las mujeres. Esto se refleja por el hecho de que al comparar la migración entre los hombres de ambas poblaciones no hay diferencias estadísticas determinadas a través de una prueba "t" de Student, mientras que mediante ésta misma prueba, se encuentra que hay diferencias estadísticas significativas entre las mujeres de ambas poblaciones ( $p < 0.05$ ). Esto mismo sugiere que las mujeres son más susceptibles que los hombres a presentar rompimientos de una sola hebra en el ADN por efecto del hidroarsenicismo crónico. El haber encontrado una mayor migración de ADN por parte de las mujeres coincide con lo descrito por Singh et al. (1990), en un estudio de reparación del daño al ADN conforme a la edad de hombres y mujeres, en dicho estudio las mujeres presentan mayor migración de ADN que los hombres. Por otra parte hay que hacer notar que en un estudio realizado en 100 individuos normales en una ciudad italiana, Betti et al. (1994) reporta que los hombres tienen una mayor migración de ADN que las mujeres. Quizá un factor importante por parte de ambos estudios sea el número de individuos utilizados en cada uno de ellos, así como sus estilos de vida. Otro aspecto importante que sugiere una mayor susceptibilidad de las mujeres al hidroarsenicismo, es que en ésta misma población de la Comarca Lagunera, Gensebatt (1994) encuentra en las mujeres mayores alteraciones del índice mitótico y de replicación que en los hombres.

Singh et al. (1990) reporta que en personas sanas la migración de ADN es dependiente de la edad, puesto que individuos jóvenes (18 a 62 años) tienen menor migración que individuos viejos (70 a 91 años). Teniendo esto como antecedente y retomando de los resultados el hecho de que en ambas poblaciones no se presentó correlación entre la edad y la migración de ADN, podemos decir que fue debido a que los rangos de edad de las poblaciones con las que se realizó éste trabajo es de 24 a 68 años, es decir, se incluyen dentro de la categoría de individuos jóvenes que menciona Singh. Resulta favorable para los propósitos de éste trabajo el no haber correlación entre la edad y la migración de ADN entre las poblaciones, puesto que se le descarta como una variable confundente en la interpretación de los datos.

En el estudio piloto realizado en la Comarca Lagunera por Ostrosky - Wegman et al. (1991) se consideró a los años de residencia como los de exposición y no fue posible correlacionar ésta variable con la cantidad de As en creatinina. Al igual que dicho estudio, en el presente trabajo no fue posible correlacionar los años de residencia con la migración del ADN, pero si fué posible establecer diferencias en el comportamiento de ambas poblaciones ( $p < 0.05$ ). Es posible que el haber determinado diferencias entre las poblaciones con respecto a los años de residencia y la migración del ADN haya sido favorecida por haberse encontrado niveles de arsénico 29 veces mayores en la población expuesta que en la testigo.

Quizá para obtener una correlación directamente proporcional entre el tiempo de residencia y alguna otra variable, en éste caso particular la migración del ADN, sería correcto determinar la carga corporal del arsénico, así como considerar factores como la susceptibilidad individual, y ciertos aspectos del estilo de vida de las personas, tales como cuantos vasos de agua (contaminada) ingiere diariamente, el consumo de bebidas embotelladas, etc.

Se ha calculado que los niveles de arsénico indican la exposición en los tres días anteriores a la toma de la muestra (orina) (Fishbein et al. 1987), así como también se ha calculado que la eliminación total del arsénico se lleva aproximadamente siete días (Fishbein et al. 1987). Estos aspectos son muy evidentes, puesto que los niveles de As de la población expuesta son mayores y diferentes estadísticamente con los de la población testigo, (son 29 veces mayores). De manera similar, en el estudio piloto realizado por Ostrosky - Wegman et al. (1991), los individuos expuestos tuvieron diez veces más cantidad de arsénico en comparación con los de baja exposición. Estos resultados confirman que en realidad los individuos de la población expuesta (Santa Ana) ingieren mayor cantidad de As a través del agua para beber, pero a pesar de éste dato, y como ya se dijo en los resultados, no fué posible correlacionar la cantidad de arsénico con la migración del ADN. Es probable que esto se haya debido a que se trató de correlacionar un parámetro que detecta daño causado por una exposición crónica con un parámetro que indica una exposición aguda.

Al detectarse altos niveles de As en un fluido de excreción puede significar que el metal no está siendo metabolizado, ó bien, absorbido por sus órganos blanco y que debido a ello es que se excreta en altas concentraciones, pero también existe la posibilidad de que al ser muy altos los niveles internos de As, esté siendo quelado por la metalotioneína y únicamente se excreta lo que ya no fue posible absorberse (Goyer 1991).

El índice mitótico es la relación del número de metafases por un determinado número de células. La correlación de dicho parámetro con la migración del ADN no fue significativa para ambas poblaciones, pero al comparar el comportamiento de los dos grupos estudiados resultó haber diferencias estadísticas entre ellos. Cuando se analizan éstos datos se nota que ambas poblaciones tienden a presentar un menor índice mitótico conforme aumenta la migración del ADN. El hecho de que los individuos de la población expuesta tiendan a presentar una disminución del IM conforme aumenta el daño del ADN, puede deberse a que haya un arresto de las células en alguna fase del ciclo celular, lo cual es apoyado si retomamos el mecanismo de acción propuesto por Petras et al. (1977 a), el cual atribuye al arsénico el hecho de que haya un arresto de los linfocitos humanos en cultivo en las fases de S y G2.

La correlación de los datos del índice de replicación (IR), el cual es un parámetro que indica la velocidad del ciclo celular y la migración del ADN de los individuos de ambas poblaciones resultó no ser significativa, aunque nuevamente se determinaron diferencias entre las poblaciones. La población expuesta, tiende a presentar una disminución del IR conforme aumenta la migración del ADN, mientras que la población testigo no presenta tendencia alguna en dicha correlación. El comportamiento mostrado por la población expuesta podría indicar que el daño genético detectado influye en el retraso de la proliferación celular, a manera de un arresto de las células durante las primeras fases del ciclo celular, puesto que en éstas fases el daño genético puede ser reparado (Petres et al. 1977 b). Así también hay la posibilidad de que el retraso de la proliferación sea debido a la inhibición de las ligasas por parte del arsénico (Rossman 1989 y Lee-Chen 1994). Por otra parte la disminución del IR en la población expuesta coincide con Petres et al. (1977 a), Wen (1981), McCabe et al. (1983), Vega (1991) los cuales reportan que tanto el arsenito como el arsenato de sodio son capaces de inhibir la proliferación in vitro de linfocitos humanos y de bovino, así como Ostrosky-Wegman et al. (1991) y Gonsebatt (1994) que encontraron dicha inhibición en individuos de la Comarca Lagunera, en un estudio piloto, donde además proponen que la inhibición de la proliferación celular puede ser debida a inmunosupresión. Por otra parte, Walder et al. (1971) menciona que pacientes inmunosuprimidos desarrollan lesiones en la piel, similares a las observadas en individuos de la Comarca Lagunera expuestos a hidroarsenicismo crónico como lo señala Cebrián (1983 y 1987), Ostrosky-Wegman et al. (1991) y Gonsebatt (1994). Los mismos autores también relacionan esta incompetencia inmunológica como una de las causas de transformación de las lesiones en procesos de malignidad celular, es decir, cáncer.

En estudios que involucran exposición humana existen datos contradictorios, ha sido reportado que en individuos expuestos al As por razones ocupacionales, o prescripción médica hay un incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Petres et al. 1977 b y Nordenson et al. 1978). Sin embargo, Burgdorf (1977), muestra resultados negativos. Es importante señalar que en el estudio piloto realizado en la misma población del presente trabajo por Ostrosky-Wegman et al. (1991) no hubo diferencias significativas ente la población altamente expuesta y la expuesta a baja concentración en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, pero a pesar de ello, se observa un mayor número de aberraciones complejas en la población altamente expuesta. A diferencia Gonsebatt (1994), en una investigación posteriormente realizada en la misma población encuentra diferencias significativas en la frecuencia de aberraciones cromosómicas de la población testigo y la expuesta. Debido a éstas diferencias se intentó correlacionar la frecuencia de aberraciones cromosómicas con la migración del ADN pero no fue posible establecer dicha correlación, es decir, que basándose en la migración de ADN en los individuos expuestos no se puede determinar el número de aberraciones que

presentarán. Bajo condiciones de electroforesis neutra en el ensayo cometa, sería posible detectar rompimientos de doble cadena (Mackelvey-Martin et al. 1993), los cuales quizá tengan alguna correlación con la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Estos resultados son de esperarse puesto que es sabido que los rompimientos de una sola cadena y algunos de doble cadena son reparables durante la fase S en aproximadamente 10 minutos si los mecanismos de reparación son óptimos (Natarajan 1993) y sólo en caso de que un rompimiento de cadena doble no pueda repararse se traducirá en una aberración en el ciclo celular siguiente, lo cual en el caso de los linfocitos humanos ocurre únicamente si dichas células se estimulan a la división (Natarajan 1993).

## CONCLUSIONES

La técnica de electroforesis de células individuales es una prueba de alta sensibilidad y sumamente sencilla, para detectar daño al ADN a manera de rompimientos de una sola hebra.

El hidroarsenicismo crónico en la población de Santa Ana, Coahuila causa daño al ADN detectado a través del ensayo cometa, a manera de rompimientos de una sola hebra.

Las mujeres presentan mayor susceptibilidad que los hombres a la exposición crónica a arsénico, evaluada a través del ensayo cometa.

## COMENTARIOS

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos decir que es de suma importancia que los diferentes grupos que trabajan con la técnica de electroforesis de células individuales estandaricen las condiciones de la técnica, según el tipo celular con el que deseen trabajar para que de esta manera sea posible la comparación de resultados. Además, cabe mencionar que dicha técnica tiene una amplia gama de aplicaciones, no sólo en estudios de monitoreo y dependiendo de las condiciones bajo las que se realice es posible detectar rompimientos de una o dos hebras del ADN, pudiendo correlacionar éste último parámetro con aberraciones cromosómicas.

## REFERENCIAS

Backer R.S. Evaluation of metals in in vitro assays, interpretation of data and possible mechanisms of action. *Curr. Top. Environ. Toxicol. Chem.* 8:185-206 (1985)

Bates N.M., A.H. Smith y C. Hopenhayn-Rich. Arsenic ingestion and internal cancers: A Review. *Amer. J. Epidemiol. (U.S.A.)* 135:462-476 (1992)

Bertolero F., G.Pozzi, E. Sabbioni y U. Saffiotti. Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis.* 8:803-808 (1987)

Betti C., T. Davini, L. Giannesi, N. Loprieno y R Barale. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCG analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* 307:323-333 (1994).

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 77-89 (1968)

Bojian W., T.Ch. Robert y S.W. Sookup. Studies of cytogenetic effects of sodium arseniacals on mammalian cells in vitro. *Environ. Mutagen.* 4: 493-498 (1982)

Brusick D. Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press. U.S.A. p 284 (1987)

Buchet J.P., R. Lauwerys y J. Roelsh. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethyl arsenate or dimethyl arsenate in man. *Int. Arch. Occup. Environm. Health.* 48:71-79 (1981)

Carson B.L., H.V. Ellis III y J.L. McCann. Toxicology and Biological Monitoring of metals in humans. Including Feasibility and Need. Lewis, U.S.A. p 328 (1987)

Cebrián M.E., A. Albores, M. Aguilar y E. Blakely. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.* 2:121-133 (1983)

Cebrián M. E. Some potential problems in assessing the effects of chronic arsenic exposure in north Mexico. Presented of the Americal Chemical Society, Division of Environmental Chemistry. 194th Meeting. 27: 144- 116. (1987).

Clarkson W.T.; L. Friberg; G. F. Nordberg and P.R. Sager. Biological Monitoring of Toxic Metals. Plenum Press. New York, U.S.A. pp 2-7 (1988).

- Cohen L.A. Diet and cancer. *Scientific American*. 257: 42-48 (1987)
- Creclius E.A. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ. Health Perspect.* 19:147-150 (1977)
- Cherian G. Metallothionein and metal toxicity. CRC Press. U.S.A. pp 2223-2224 (1987)
- DeFlora S. Study of 106 organic and inorganic compounds in the Salmonella / microsome test. *Carcinogenesis*. 2:283-298 (1981)
- DeMéo M., M. Laget, M. Castagnaro y G. Duménil. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat. Res.* 260:295-306 (1991)
- Ennever F.K. y H. S. Rosenkranz. Evaluating betteries of short-term genotoxicity test. *Mutagenesis*. 1:293-298 (1986)
- EPA. Health Assesment Document for Inorganic Arsenic. Final Report. D. Jacobson-Kram, et al. Environmental Criteria and Assessment Office, EPA, Research Triangle Park, N. C. (1984)
- Fishbein L., A. Furt y.M. A. Mehlman. Genotoxic and carcinogenic metals: environmental and occupational occurrence and exposure. Princeton Scientific Publishing Co. Inc. U.S.A. pp 339. (1987)
- Flessel C.P. Metals as Mutagens. En:Inorganic and Nutritional Aspects of Cancer (G.N. Schrauzer, ed). Plenum Pub. Corp., New York. pp 117-128 (1978)
- Furst A. y S. B. Radding. New development in the study of metal carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health, Pt.C-Environ. Carcinogenesis*. 2:103-133 (1984)
- Gómez-Arroyo S., A. Hernández-García y R. Villalobos-Pietrini. Induction of sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat. Res.* 208:219-224 (1988)
- Gonsebatt B. M.E. Marcadores biológicos de exposición a arsénico inorgánico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. UNAM., México. pp 68. (1994).
- Goyer A. R. Cap 19 in Amdur O.M.; J. Doull; C.D. Klaassen. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Pergamont Press. U.S.A. pp 623-680 (1991).

Hansen K. y R.M. Stern. A survey of metal-induced mutagenicity in vitro and in vivo. *J. Am. Coll. Toxicol.* 3:381-430 (1984)

Homminki H. Environmental carcinogenesis. En: Cooper C., Grover P. *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I.* Springer Verlag, Berlin, Germany. pp 36-61 (1990)

IARC Monographs, Supplement 4. Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Chemicals, Industrial Processes and Industries Associated with Cancer in Humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France (1982)

IARC Monographs, Supplement 6. Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Genetic and Related Effects: An Updating of Selected. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France (1987)

Jha A.N., M. Noditi, R. Nilsson y A.T. Natarajan. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat. Res.* 284:215-223. (1992)

Lambari A.M. Calidad y Cantidad del Agua en México. *Universo Veintiuno. México.* pp 78-81. (1987)

Lanz H., P.C. Wallace y J. G. The metabolism of arsenic in laboratory animals using As 74 as trace. *Univ. California Publ. Pharmacol.* 2:263-282 (1950)

Lauwerys R.R. *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring.* Biomedical Publications, Davis, California. pp 2-4 (1983)

Lee-Chen S.F., C.T. Yu, D.R. Wu y K.Y. Jan. Differential effects of luminol, nickel, and arsenite on the rejoining of ultraviolet light and alkylating-induced DNA breaks. *Environ. Molec. Mutagen.* 23: 116-120. (1994)

Lee T. CH., N. Tanaka, P. W. Lamb, M. Tona M., J. Gilmer y C. Barrett. Induction of gene amplification by arsenic. *Science.* 241: 79-81 (1988)

Lehninger, A.L. *Principios de bioquímica.* Omega. Barcelona. pp 1031 (1984)

Leonard A., G. B. Gerber y P. Jacquet. Carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity of industrially used metals. En: *Carcinogenicity, Mutagenicity, and Teratogenicity of industrial Pollutants* (M. Kirsch-Volders, ed.), Plenum Press, New York. pp 59-126 (1984)

Leonard A. y A. Bernard. Biomonitoring exposure to metals compounds with carcinogenic properties. *Environ. Health Perspect.* 101: 127-133. (1993)

McCabe M.D., D. Maguire y M. Nowak. The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro. *Environ. Res.* 31: 323-331. (1983).

Mckelvey-Martin V.J., M.H.L.Green, P.Schmezer, B.L.Pool-Zobel, M.P. DeMéo y A. Collins. The Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.* 288:47-63 (1993)

Nakamuro K. y Y. Sayato. Comparative studies of chromosomal aberrations induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutat. Res.* 88:73-80 (1981)

NAS, Medical and Biologic effects of environmental pollutants, arsenic national research council. National Academy of Sciences, Washington,D.C., U.S.A. (1977)

Natarajan A.T. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ. Health Perspect.* 101: 225-229. (1993).

Nordenson I., G. Beckman y S. Norström. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas.* 88: 47-50. (1978).

Nordenson I. y L. Beckman. Occupational and environmental risk in and around a smelter in northern Sweden. *Hereditas.* 96: 175-181. (1982).

Okui T.y Y. Fujiwara. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 172:69-76 (1986)

Ostrosky-Wegman P., M.E. Gonsebalt, R. Montero, L. Vega y L.A. Herrera. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individual chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.* 250:477-482 (1991)

Petres J., D. Barron y M. Hagedorn. Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation; citogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* 19:227-233 (1977 a)

Petres J., D. Baron y M. Hagedorn. Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation citogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* 19:223-227. (1977 b).

Pomroy C., S. M. Charborneaus, R.S. Mc Cullough y G.K. Tam. Human retention studies with As 74. *Toxicol. App. Pharmacol.* 53:550-556 (1980)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Roldán E. y L.M.A. Altamirano. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 245:61-65 (1990)

Rossman T.G., M. S. Meyn y W. Troll Effects of arsenite on DNA repair in *Escherichia coli*. *Environ. Health Perspect.* 19:229-233 (1977)

Rossman T.G., D. Stone, M. Molina y W. Troll. Absence of arsenite mutagenesis in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ. Mutagen.* 2:371-379 (1980)

Rossman T.G. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.* 2:1-9 (1989)

Schiller C.M., B.A. Fowler y J.S. Woods. Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. *Environ. Health Perspect.* 19:205-207 (1977)

Sharma A. y G. Talukder. Effects of metals of chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutagen.* 9:191-226 (1987)

Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice y E.L. Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191 (1988)

Singh N.P., D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brant y E.L. Schneider. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 237:123-130 (1990)

Sweins A. Protective effect of selenium against arsenic induced chromosomal damage in cultured human lymphocytes. *Hereditas.* 98:249-252 (1983)

Toyo O. y Y. Fujiwara. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 172:69-76 (1986)

Vahter M. y H. Norin. Metabolism of 74 As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ. Res.* 21:446-457 (1980)

Vega L.L. El arsénico en la proliferación "in vitro" de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp 63 (1991)

Walder B. K., M.R. Robertson y J. Jeremy. Skin cancer and immunosuppression. *Lancet* ii:1282-1283 (1971)

Wen W. N., T. - L. Lieu, H. - J. Chang, S.W. Wu, M. - L. Yau y K. Y. Jan. Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with black foot disease and healthy persons. *Human Genetics* 59: 201-203. (1981).

WHO. Arsenic. Environmental Health Criteria 18. World Health Organization. Geneva, Italy (1981)

WHO Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. Report of the final task group meeting. Geneva, Switzerland (1992)

Zanzoni F., E.G. Jong. Arsenic elevates the sister chromatid exchange rate in human lymphocytes in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* 267:91-95 (1980)

Zar J. H. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs New Jersey. p 718 (1989)

## Apéndice A

### I Soluciones:

Todas las soluciones deben ser preparadas libres de Mg, debido a que éste, activa a la endonucleasa por ser su cofactor.

#### 1.- Solución de lisis "stock".

Ingredientes para 1 litro.

NaCl	2.5 M	146.1 g
Na <sub>2</sub> EDTA	100.0mM	37.2 g
Tris	10.0mM	1.2 g
Na lauril sarcosianato	1.0 %	10.0 g

Ajustar el pH a 10 con 12 g de NaOH (hojuelas).

#### 2.- Solución de lisis final.

Agregar en fresco a 35 ml de solución de lisis "stock", 400 µl de Tritón x-100, 5 ml de DMSO y refrigerar de 30 a 60 minutos antes de utilizarla.

#### 3.- Amortiguador de electroforésis.

Soluciones "stocks"

a) NaOH 10 N (200 g / 500 ml dH<sub>2</sub>O)

b) Na<sub>2</sub>EDTA 200 mM (14.89 g / 200 ml dH<sub>2</sub>O pH 10)

Para preparar 1 litro de amortiguador, agregar en fresco 30 ml de NaOH 10 N y 5 ml de Na<sub>2</sub>EDTA 200 mM.

#### 4.- Amortiguador de neutralización.

Ingredientes para 1 litro.

Tris 0.4 M \_\_\_\_\_ 48.5 g

Ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado.

#### 5.- Solución de tinción.

Bromuro de etidio "stock" 10x \_\_\_\_\_ 10 mg / 50 ml dH<sub>2</sub>O

Guardar a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Bromuro de etidio 1x \_\_\_\_\_ 1 ml "stock" 10x / 9 ml dH<sub>2</sub>O

## II Preparación de laminillas:

- 1.- Preparación de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %.

Agarosa de bajo punto de fusión 125 mg / 25 ml dH<sub>2</sub>O  
Disolver calentando en horno de microondas 20 segundos y mantenerla en un baño a 37° C.

- 2.- Preparación de agarosa regular al 0.5 %.

Agarosa regular 125 mg / 25 ml dH<sub>2</sub>O  
Disolver calentando en horno de microondas 30 segundos.

Agregar 200 µl de agarosa regular 0.5 % en una laminilla esmerilada y cubrir inmediatamente con un cubreobjetos. Refrigerar la laminilla a 4° C durante 10 minutos (hasta que solidifique).

- 3.- Remover cuidadosamente el cubreobjetos y agregar 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %, mezclada con 10 µl de muestra, colocar nuevamente el mismo cubreobjetos y refrigerar durante 5 minutos a 4° C (hasta que solidifique).

- 4.- Retirar cuidadosamente el cubreobjetos y agregar 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %, colocar nuevamente el cubreobjetos y refrigerar durante 5 minutos (hasta que solidifique).

- 5.- Retirar cuidadosamente el cubreobjetos y sumergir la laminilla en la solución de lisis fría, previamente preparada y refrigerar a 4° C durante 1 hora o más.

## III Electroforesis de laminillas:

Los pasos siguientes se realizan bajo luz amarilla.

- 1.- Después de 1 hora en la solución de lisis a 4° C, remover cuidadosamente la laminilla y colocarla en una caja de electroforesis horizontal previamente inmersa en hielo, orientando el gel hacia el ánodo (+).

- 2.- Cubrir la laminilla con el amortiguador de electroforesis y dejarla durante 20 minutos en desenrollamiento.

- 3.- Posteriormente, para correr la electroforesis encender la fuente de poder y ajustar a 25 volts y 300 ampers (adicionando o retirando amortiguador de la caja), manteniéndose encendida durante 20 minutos.

4.- Una vez apagada la fuente de poder retirar cuidadosamente la laminilla de la caja de electroforésis y enjuagarla tres veces con amortiguador de neutralización durante 5 minutos.

5.- Escurrir la laminilla del exceso de amortiguador de neutralización y teñirla adicionando 50  $\mu$ l de bromuro de etidio 1x y colocar cuidadosamente un cubreobjetos.

6.- Colocar la laminilla en una cámara húmeda y refrigerar hasta su observación al microscopio de fluorescencia.

#### IV Observación de laminillas:

1.- Secar la humedad de la laminilla y observarla al microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515 - 560 nm utilizando un aumento de 20 X.

2.- Con la ayuda de un ocular graduado, medir por cada laminilla la longitud de 25 núcleos (cometas).

3.- Contar de un total de 100 células por laminilla, el número de núcleos evaluables "cometas" y núcleos difusos "nubes" (células muy dañadas).

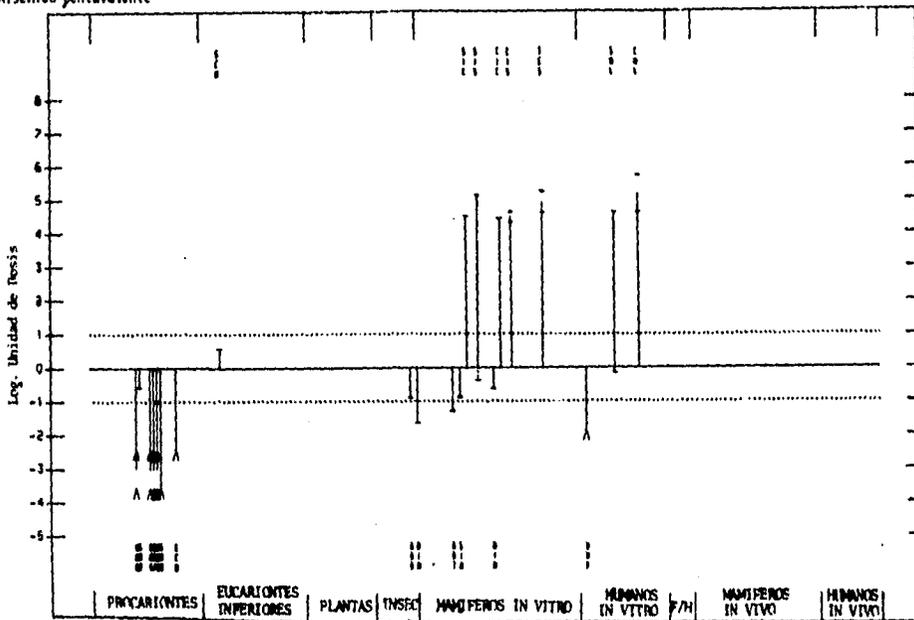
Tabla 1. Elementos necesarios en cantidades traza y su función biológica en animales y humanos.

Elemento	Función biológica ó papel aparente*
Hierro	Gpo. prostético de los hemo enzimas
Iodo	Necesario en la estructura de hormonas tiroideas
Cobre	Gpo. prostético de la citocromo oxidasa
Manganeso	Cofactor de la arginasa y otros enzimas
Zinc	Cofactor de las deshidrogenasas, polimerasas de ADN y anhidrasa carbónica
Cobalto	Componente de la vitamina B-12
Molibdeno	Cofactor de la xantina oxidasa
Selenio	Cofactor de la peroxidasa del glutatión
Vanadio	Cofactor de la reductasa del nitrato
Níquel	Cofactor de la ureasa
Cromo*	Empleo adecuado de la glucosa de la sangre
Estaño*	Formación del hueso
Flúor*	Formación del hueso
Silicio*	Formación del tejido conectivo y hueso
Arsénico*	Desconocido

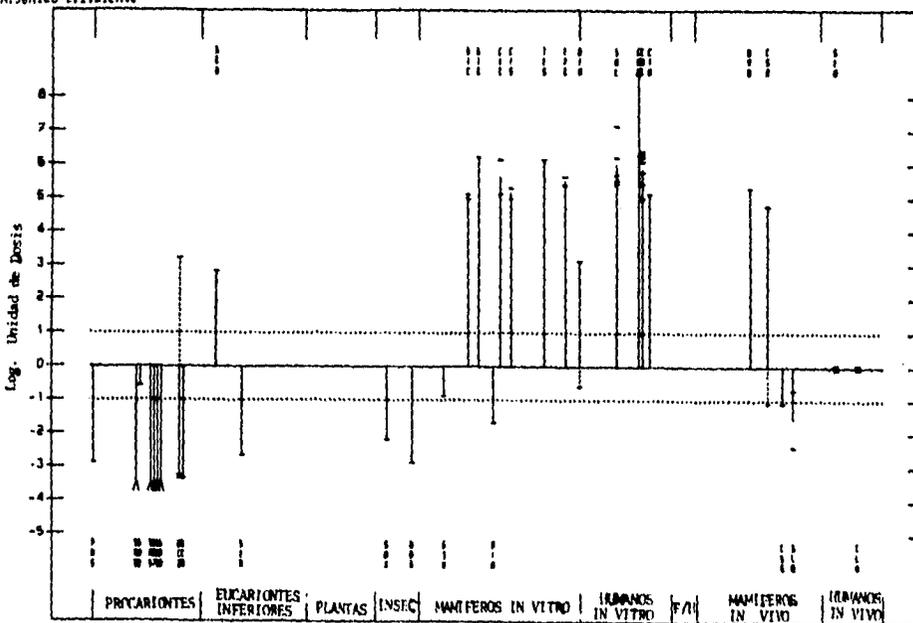
Tomado de Lehninger, 1984.

Tabla 2. Evaluación de Arsénico pentavalente y trivalente en diferentes sistemas de prueba.

Arsénico pentavalente



Arsénico trivalente



**Tabla 3. Clasificación de ensayos de corta duración.**

<b>Grupo</b>	<b>Características de los eventos detectables</b>
Mutación génica	Cambio de nucleótidos por conducto de sustitución o adición/delección.
Aberraciones cromosómicas	Cambios estructurales y/o numéricos en cariotipos normales.
Daño al ADN	Interacciones del ADN con grupos heterogéneos, incluyendo aductos en ADN, rompimientos sencillos, estimulación de la reparación del ADN, ICH (intercambio de cromátidas hermanas).
Transformación morfológica	Cambios morfológicos en células blanco asociadas con tumorigenicidad.

Tomado de Brusick, 1987.

Tabla 4. Agentes evaluados mediante el ensayo cometa.

Agente	Dosis mínima	Tipo celular	Evaluación	Referencia
UV-B	5 Jm <sup>-2</sup>	Linfocitos humanos en Go	+	Green et al. (sin publicar)
	200 Jm <sup>-2</sup>	Fibroblastos primarios humanos	+	Green et al. (sin publicar)
Luz solar	150 Jm <sup>-2</sup>	Linfocitos humanos Go	+	Green et al. (sin publicar)
UV(254 nm)	0.25 Jm <sup>-2</sup>	Linfocitos humanos Go	+	Green et al. (1992)
	1.25 Jm <sup>-2</sup>	Ciclina de linfocitos humanos	+	Green et al. (1992)
	125 Jm <sup>-2</sup>	Fibroblastos humanos	+	Green et al. (sin publicar)
	1 Jm <sup>-2</sup>	Ciclina(humano)celulas HeLa(incubadas con afidicolina)	+	Gedik et al. (1992)
Co 60	0.25 Gy	Linfocitos humanos Go	+	Green et al. (sin publicar)
	0.25 Gy	Fibroblastos primarios	+	Green et al. (sin publicar)
Rayos X	0.25 Gy	Fibroblastos primarios humanos	+	Singh et al. (1991)
	0.25 Gy	Linfocitos humanos Go	+	Singh et al. (1988)
Bleomicina	5 ug/ml	Ciclina Raji(humano) cels.linfoblastoides	+	McKelvey-Martin et al. (sin publicar)
Bajos niveles de laser(660nm)	1.25 Jcm <sup>2</sup>	Ciclina Friend (ratón) cels.eritroleucemicas	+	McKelvey-Martin et al. (sin publicar)
H2O2	9.1 uM	Linfocitos humanos Go	+	Singh et al. (1988)
	2.2 uM	Fibroblastos primarios humanos	+	Singh et al. (1991)
	10 uM	Ciclina Friend (ratón) cels.eritroleucemicas	+	McKelvey-Martin et al. (sin publicar)
	10 uM	Ciclina Raji (humano) cels.linfoblastoides	+	McKelvey-Martin et al. (sin publicar)
DMSO	5% v/v(máximo)	Linfocitos humanos Go	-	Green et al. (sin publicar)

continuación

Agente	Dosis mínima	Tipo celular	Evaluación	Referencia
KMnO <sub>4</sub>	1.8 mM	Linfocitos humanos Go	+	De Méo et al. (1991)
MnCl <sub>2</sub>	1.5 mM	Linfocitos humanos Go	+	De Méo et al. (1991)
Dexorubicina	10 ug	Linfocitos humanos Go	+	De Méo et al. (sin publicar)
Etoposide	10 ug	Linfocitos humanos Go	+	De Méo et al. (sin publicar)
MNNG	5 ug/ml	céls.de mucosa gástrica de rata	+	Poa'-Zobel et al. (1992)
Dicromato de Sodio	0.5 umoles/ml	céls.de mucosa gástrica de rata	+	Schmezer et al. (sin publicar)
Acrilamida (in vivo)	100 mg/kg	céls.de ratón:bazo linfocitos,cerebro,higado	+	Tice et al. (1990)
Tricloroetileno (in vivo)	1000 mg/kg	céls.de ratón:bazo, linfocitos,cerebro,higado	+	Tice et al. (1990)
Dimetilbenzoontraceno (in vivo)	100 mg/kg	céls.de ratón:bazo, linfocitos,higado	+	Tice et al. (1990)
Dimetilbenzoontraceno (in vivo)	100 mg/kg	céls. de cerebro de ratón	-	Tice et al. (1990)

Tomada de McKelvey-Martin (1993)

**Tabla 5. Efecto del tiempo de desenrollamiento y electroforesis en la migración del ADN, de dos tipos de muestra.**

Muestra # de células	T. de desenrollamiento (minutos)	T. de electroforesis (minutos)	Migración ADN (micrometros)
Sangre 800 entera	20	20	43.96 ± 4.4
Sangre 800 entera	10	10	27.46 ± 3.1*
Linfocitos 800 congelados	20	20	65.38 ± 5.8
Linfocitos 800 congelados	10	10	35.11 ± 4.0*
Linfocitos 800 congelados	20	05	53.73 ± 10.9

Todos los datos corresponden a muestras del mismo donador.

\* p < 0.05

**Tabla 6. Rangos de migración del ADN (micrometros), correspondientes a testigos tomados de la bibliografía.**

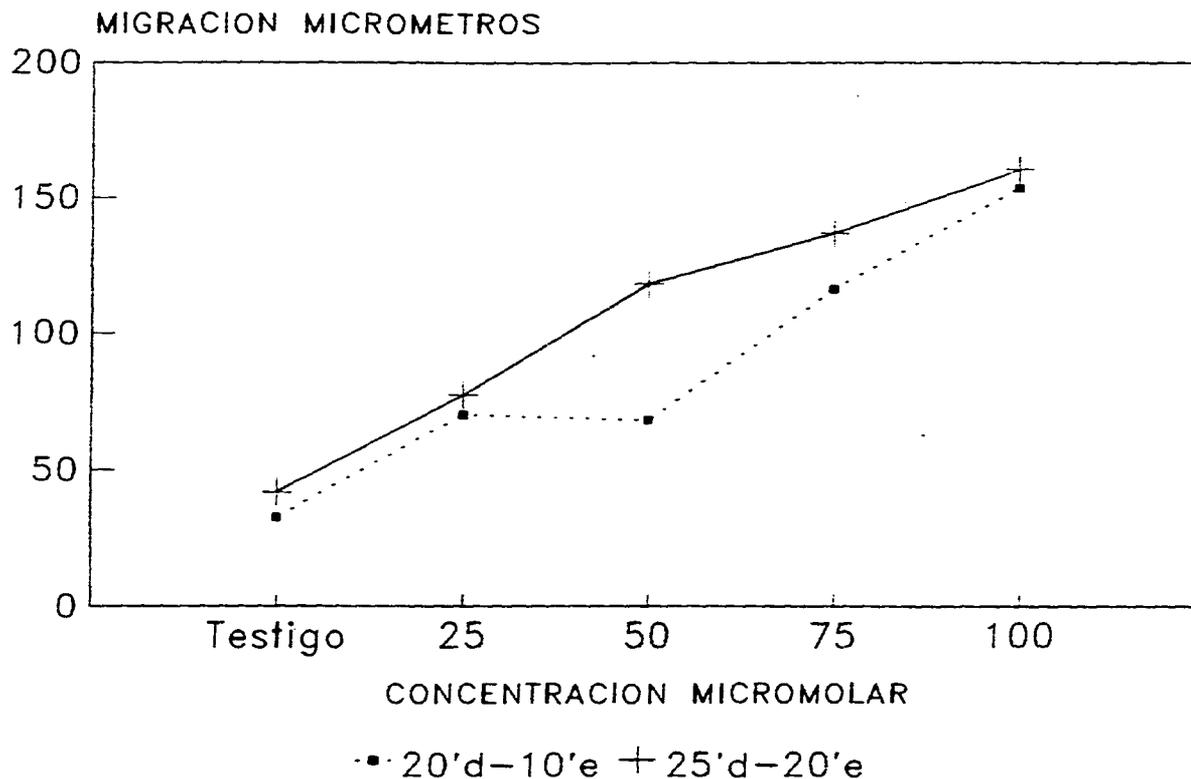
<b>Migración del ADN (micrometros)</b>	<b>Según</b>
31.14 - 39.67	Betti, et al. 1994
46.26 - 55.70 (fumadores)	Betti, et al. 1994
30.00 - 40.00	Tice, comunicación personal 1993
43.96	Testigos históricos del laboratorio

**Tabla 7. Promedio y desviación estándar de la migración del ADN en individuos de la población testigo y la expuesta crónicamente a arsénico.**

Sexo	Testigos Migración ADN (micrometros)	Sexo	Expuestos Migración ADN (micrometros)
femenino	61.87 ± 6.81	femenino	58.80 ± 2.99
femenino	56.60 ± 3.95	femenino	44.93 ± 2.88
femenino	56.40 ± 3.85	femenino	55.87 ± 2.57
femenino	59.47 ± 3.11	masculino	65.07 ± 6.22
femenino	44.60 ± 3.73	femenino	59.53 ± 3.98
femenino	48.47 ± 3.57	femenino	55.47 ± 2.50
masculino	53.40 ± 2.90	masculino	40.67 ± 3.98
masculino	53.93 ± 4.70	masculino	57.13 ± 2.52
femenino	61.67 ± 3.70	femenino	56.67 ± 3.50
masculino	61.87 ± 3.38	masculino	57.73 ± 3.46
masculino	54.20 ± 11.14	masculino	59.07 ± 4.14
masculino	48.20 ± 4.77	femenino	53.13 ± 2.72
masculino	54.87 ± 3.70	masculino	52.00 ± 2.23
femenino	60.73 ± 4.77	masculino	63.73 ± 0.00
femenino	44.53 ± 2.59	masculino	77.20 ± 5.73
masculino	57.20 ± 2.83	femenino	66.73 ± 2.97
femenino	59.93 ± 4.34	masculino	46.47 ± 2.89
femenino	33.73 ± 2.99	masculino	70.73 ± 7.66
femenino	38.13 ± 5.90	masculino	39.80 ± 5.89
femenino	48.67 ± 2.43	femenino	54.13 ± 2.63
femenino	53.40 ± 3.90	femenino	93.27 ± 5.32
masculino	62.73 ± 3.14	masculino	73.80 ± 6.28
masculino	61.53 ± 3.38	masculino	95.33 ± 4.86
masculino	56.93 ± 2.22	femenino	92.33 ± 5.09
masculino	56.80 ± 2.69	femenino	45.07 ± 5.60
femenino	57.80 ± 2.27	masculino	53.73 ± 4.40
masculino	58.80 ± 3.14	femenino	55.60 ± 2.89
masculino	54.07 ± 8.31	femenino	65.40 ± 4.46
		masculino	49.87 ± 4.50
		femenino	54.60 ± 5.17
		femenino	57.73 ± 2.28
Media	54.23 ± 7.32	Media	60.37 ± 14.06
Rango	33.73 - 62.73	Rango	39.80 - 95.33
N=	28	N=	31
Células	1400	Células	1550

"t" de Student p < 0.05

Figura 1. Migración del ADN debido al tratamiento con peróxido de hidrógeno, en un mismo donador a temperatura ambiente y diferentes tiempos de desenrollamiento y electroforesis



'd: minutos de desenrollamiento  
'e: minutos de electroforesis

Figura 2. Migración del ADN debido al tratamiento con peróxido de hidrógeno en dos donadores a temperatura ambiente

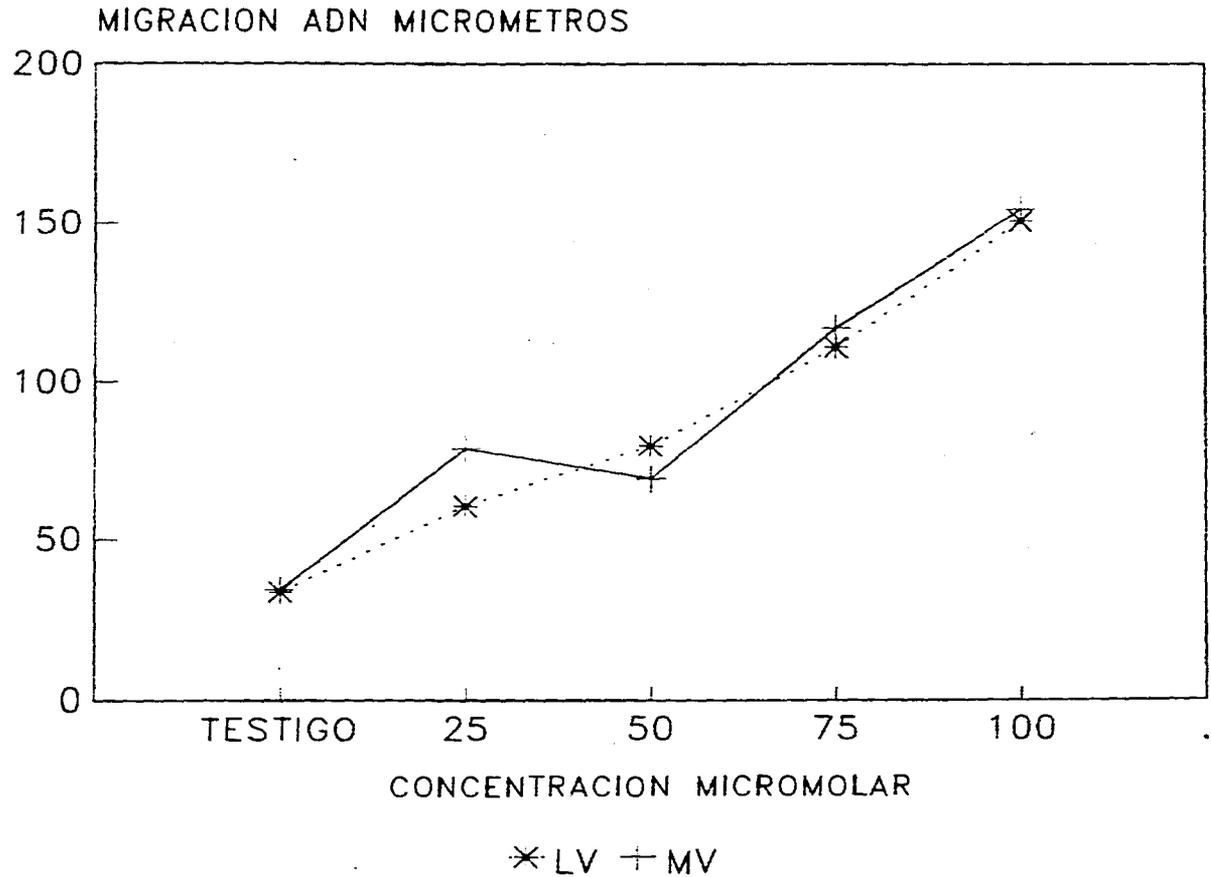


Figura 3. Efecto del tratamiento (50  $\mu\text{M}$ ) con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente y solución de lisis a pH12, con diferentes tiempos de recuperación

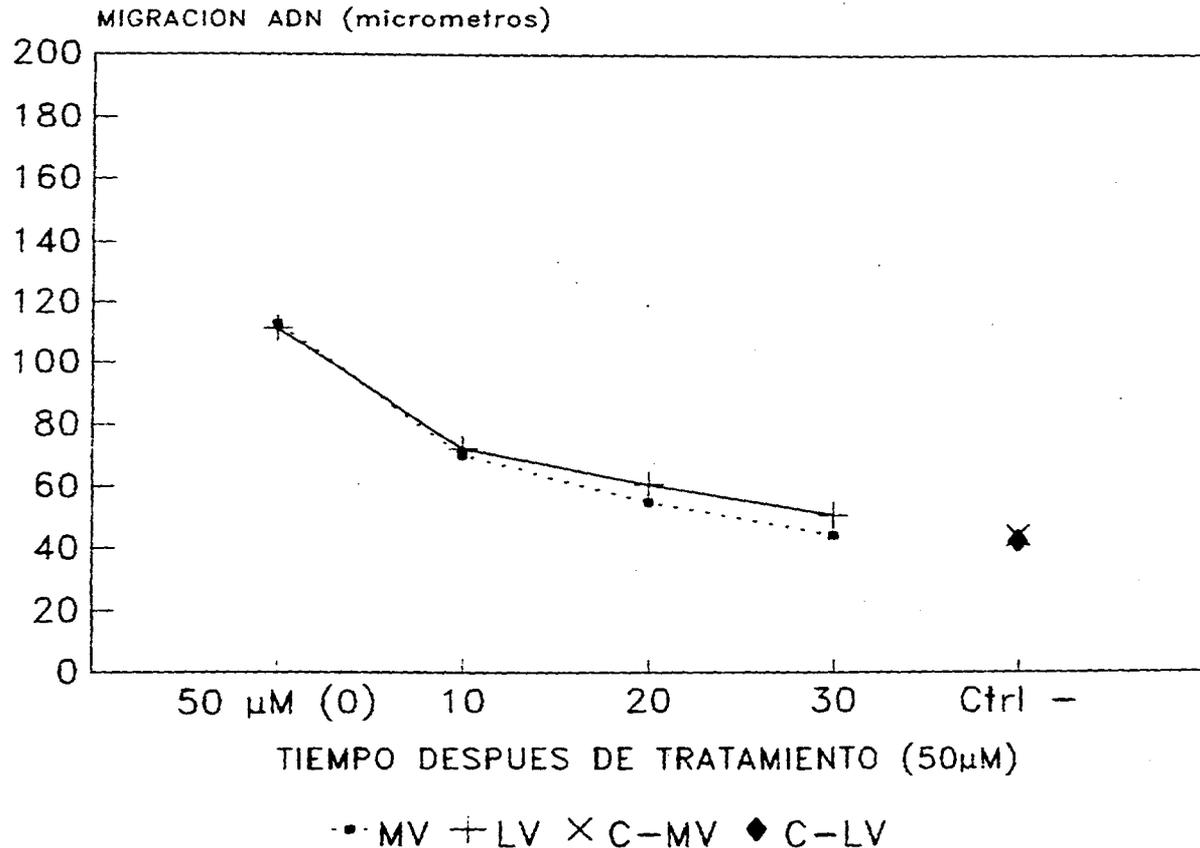


Figura 4. Migración del ADN debida al tratamiento con peróxido de hidrógeno, en dos donadores a 37°C y solución de lisis con pH 12.

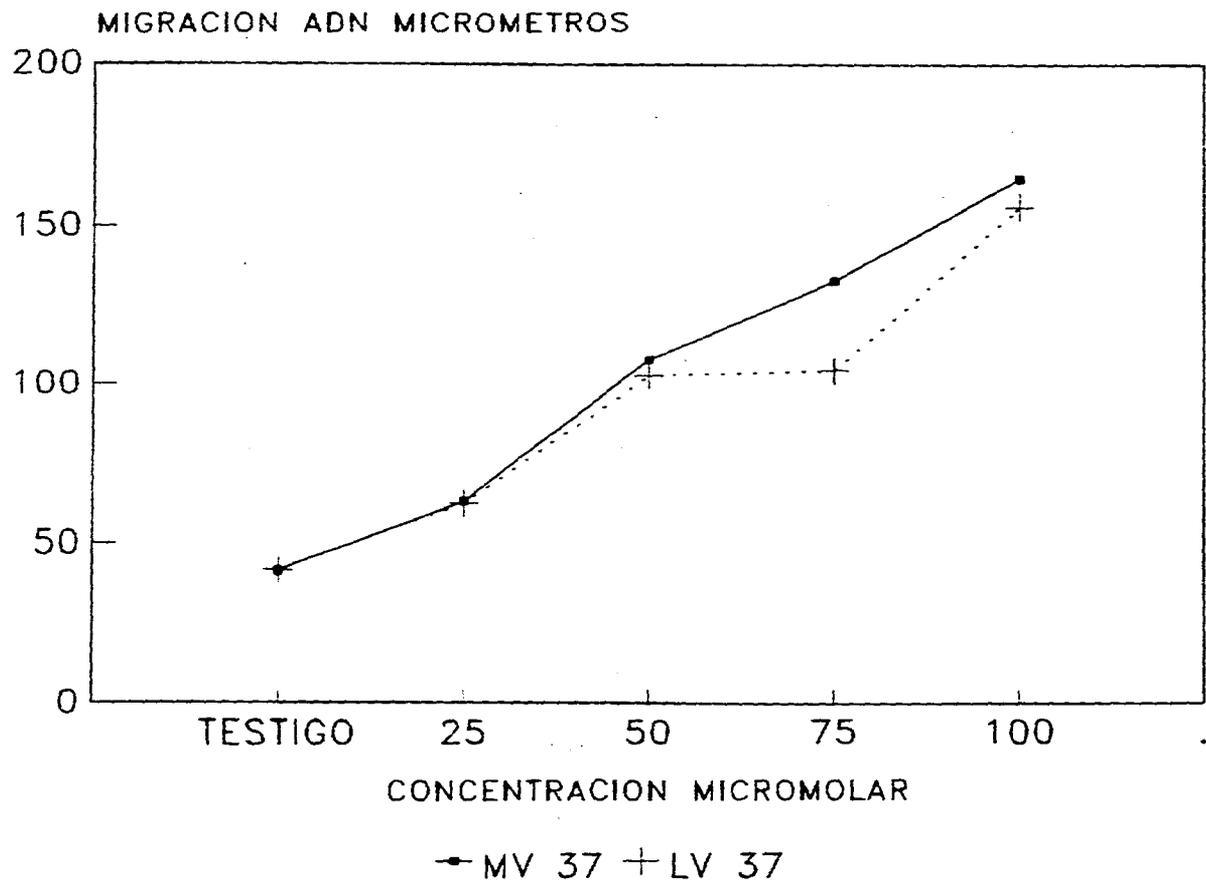


Figura 5. Efecto del tratamiento (50 $\mu$ M) con peróxido de hidrógeno a 37°C y solución de lisis a pH 12, con diferentes tiempos de recuperación

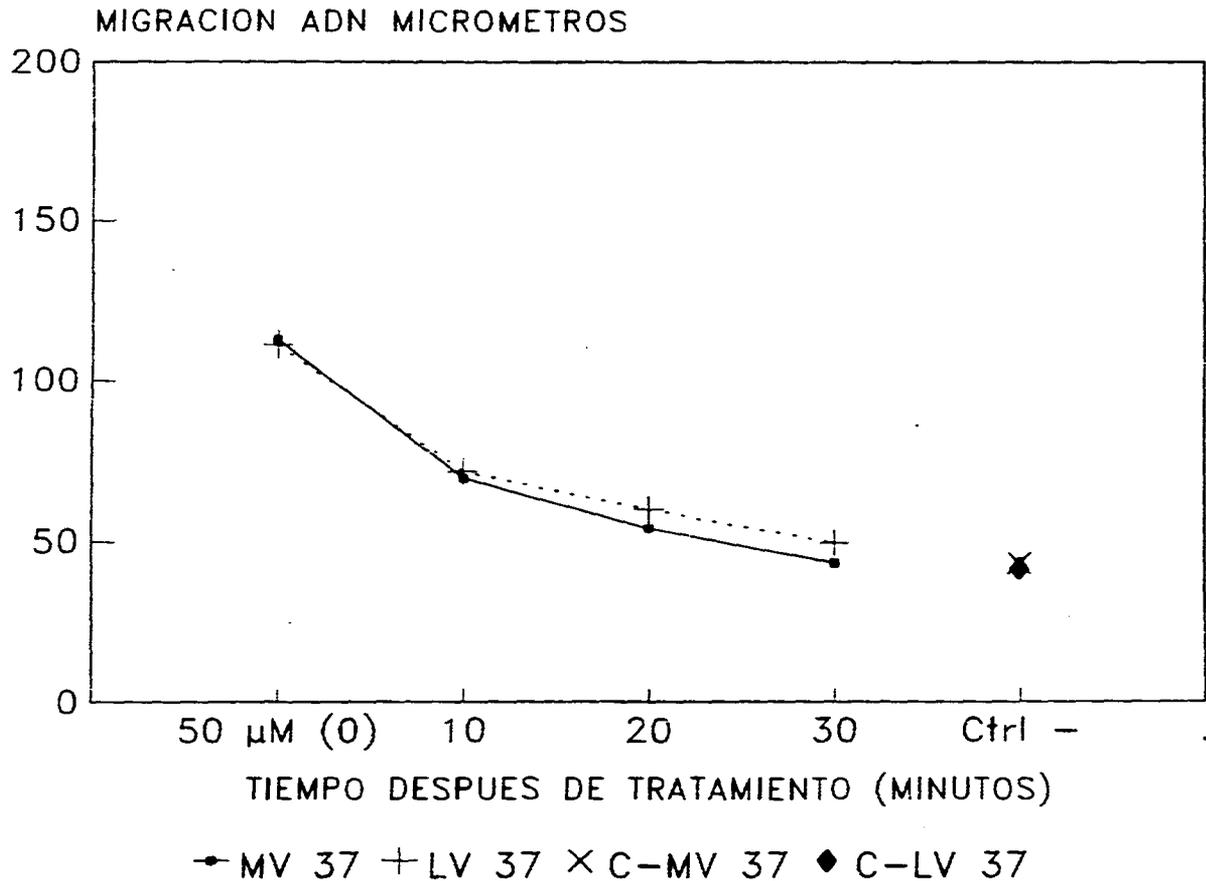


Figura 6. Migración del ADN debida al tratamiento con peróxido de hidrógeno, en dos donadores a 37°C y solución de lisis a pH 10

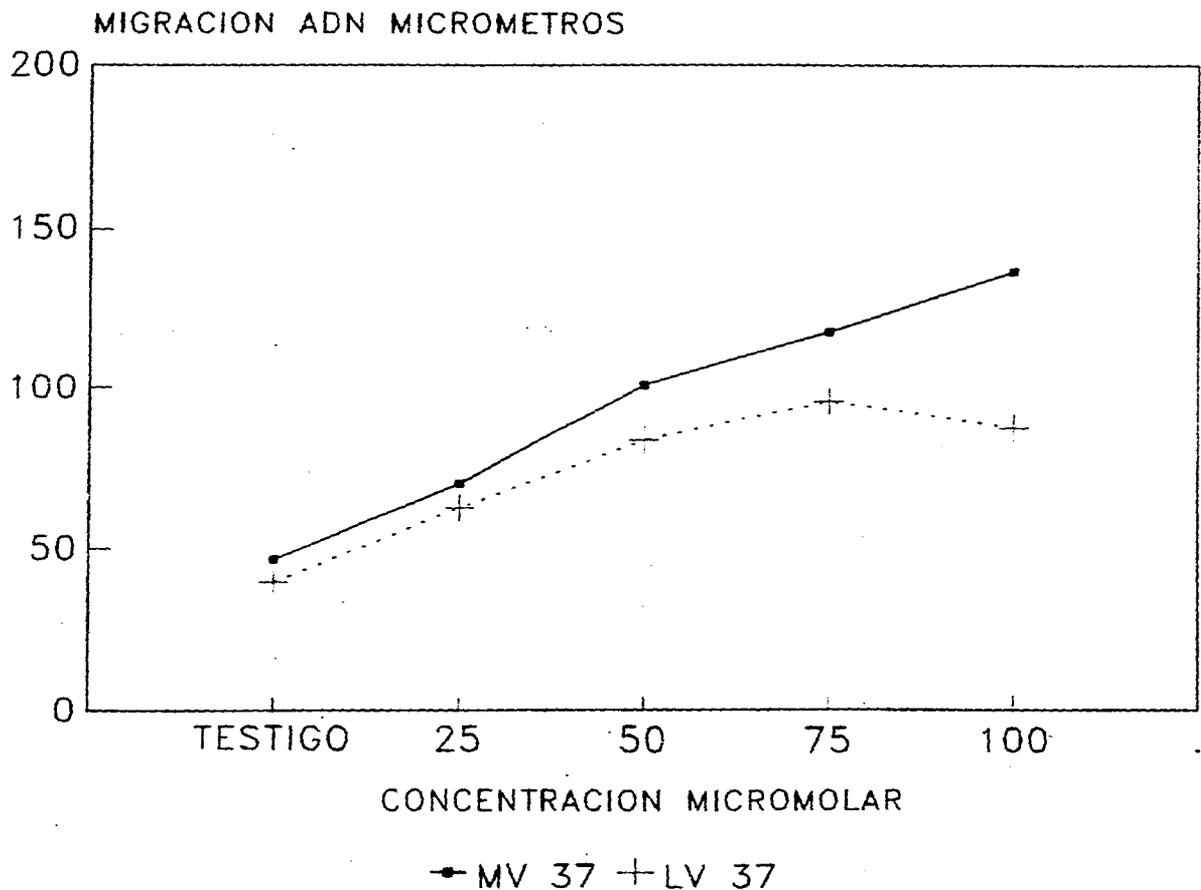


Figura 7. Efecto del tratamiento ( $50\mu\text{M}$ ) con peróxido de hidrógeno a  $37^\circ\text{C}$  y solución de lisis a pH 10, con diferentes tiempos de recuperación

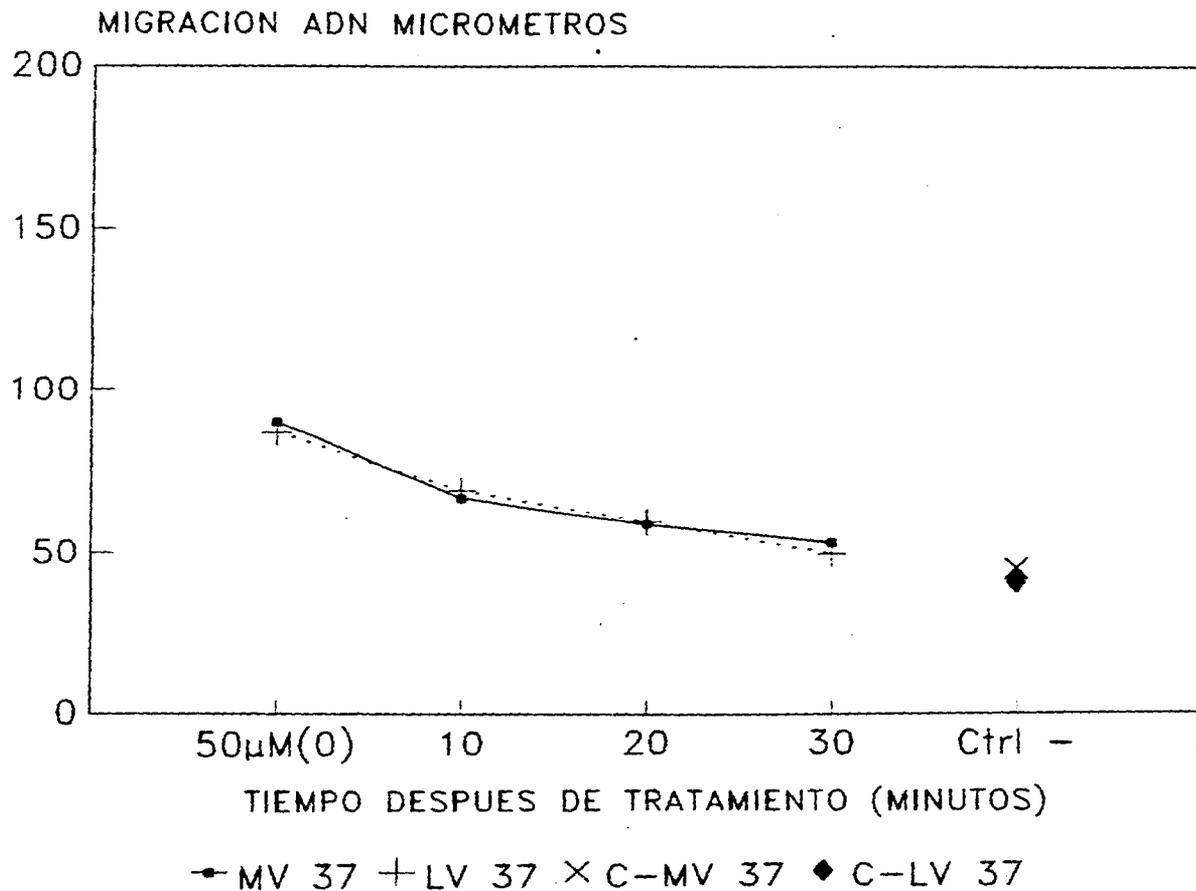
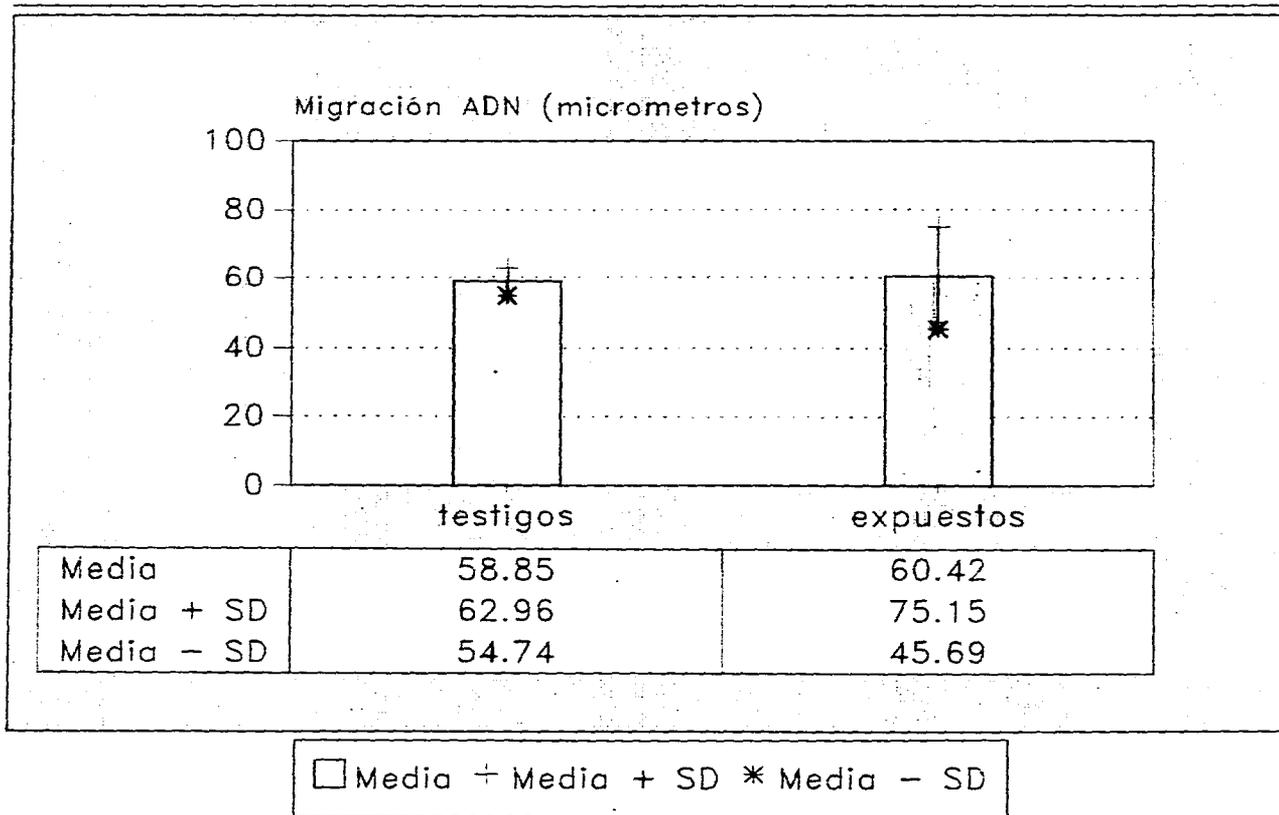


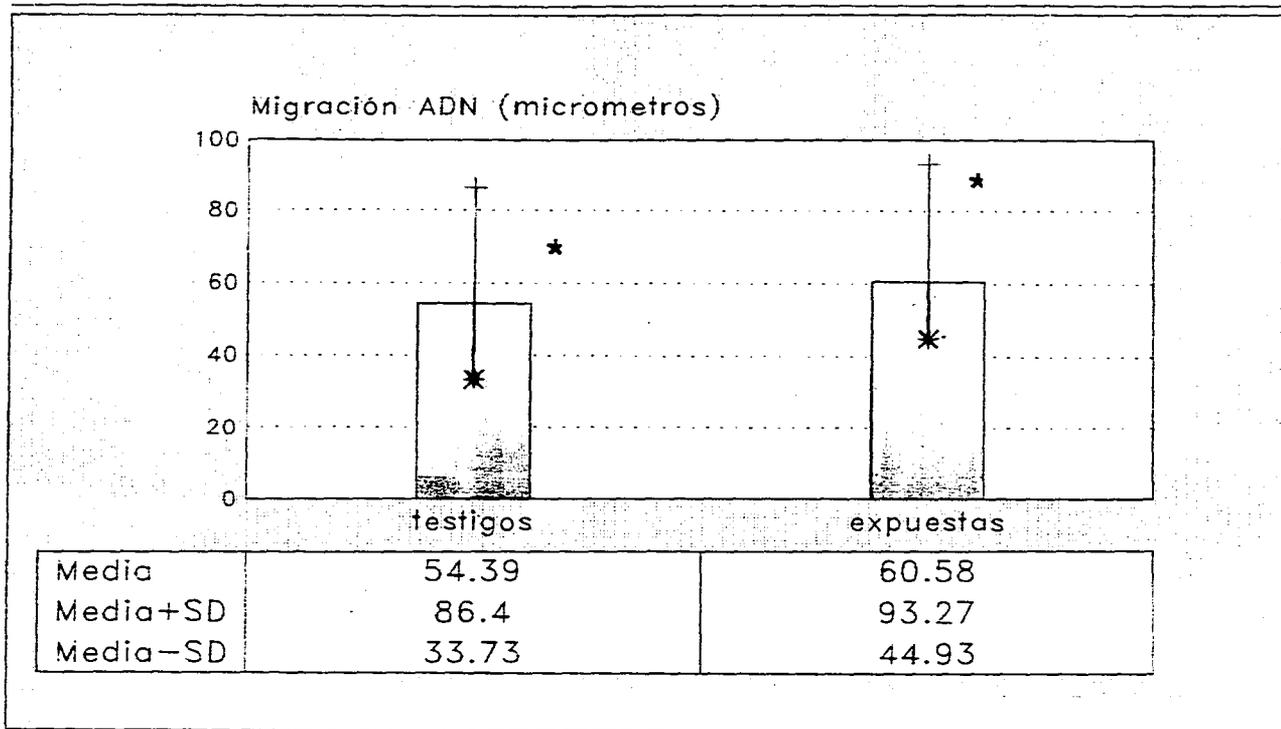


Figura 9. Promedio y rangos de desviación estandar de la migración del ADN en hombres testigo y expuestos a hidroarsenicismo



No hay diferencias significativas

Figura 10. Promedio y rangos de desviación estándar en la migración del ADN en mujeres testigo y expuestas a hidroarcenismo



□ Media + Media+SD \* Media-SD

\* p < 0.05

Figura 11. Tendencia en la correlación entre la migración del ADN y la edad.

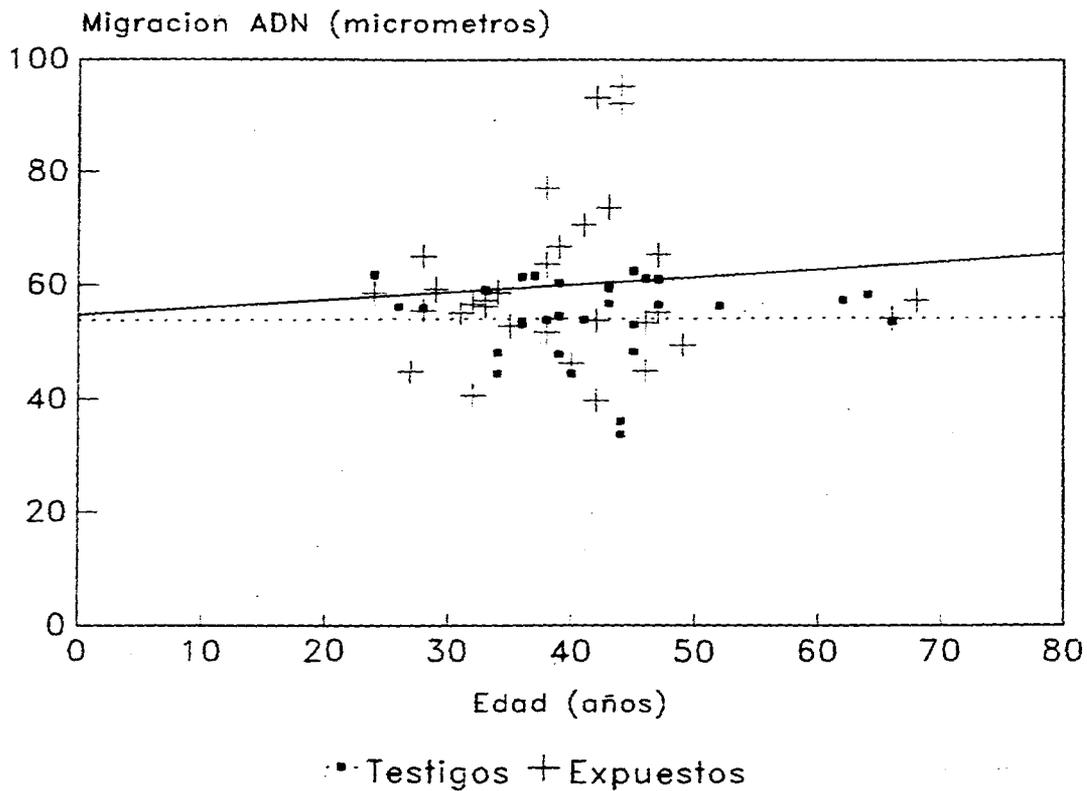


Figura 12. Tendencia en la correlación entre la migración del ADN y el tiempo de residencia.

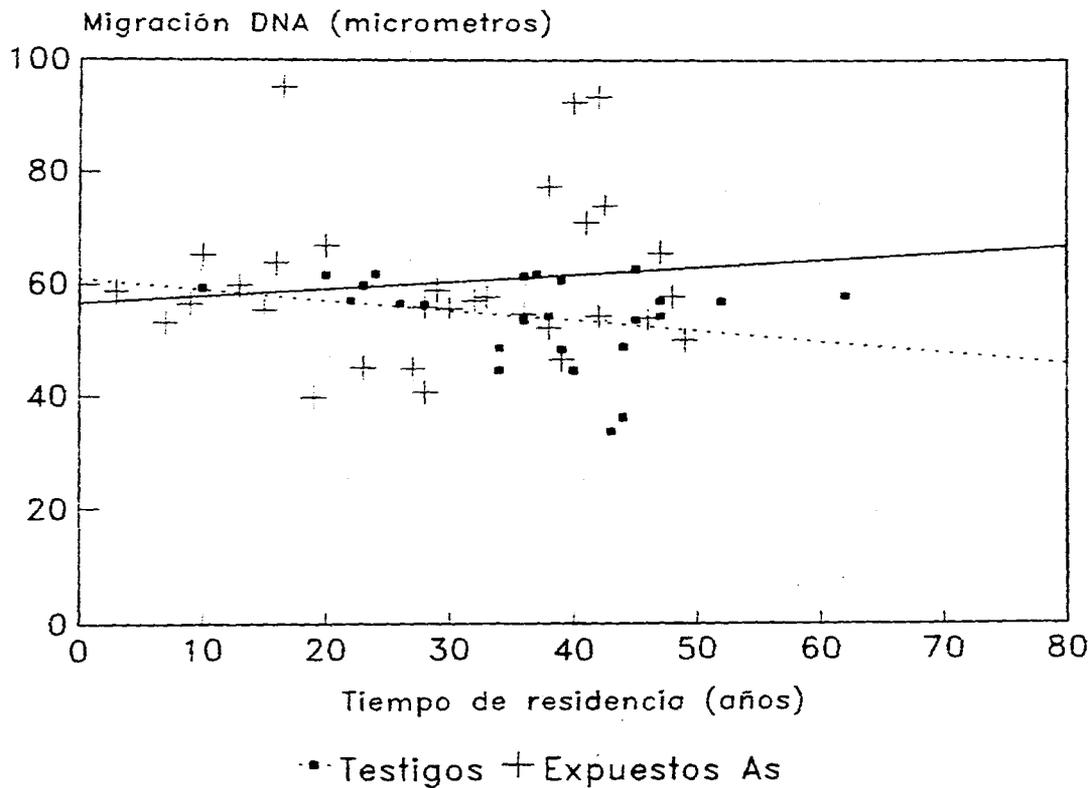
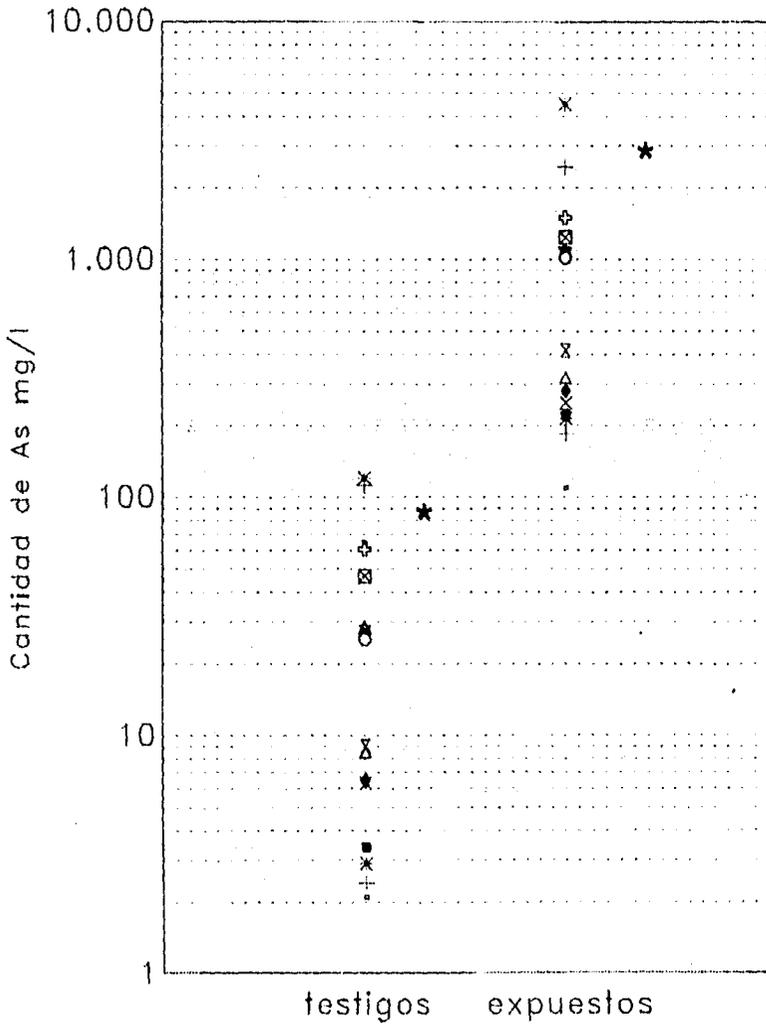


Figura 13. Cantidad de arsénico en orina en individuos de la población testigo y la expuestos a hidroarsenicismo



\*p<0.05

Figura 14. Tendencia en la correlación entre la migración del ADN y el índice mitótico a 72 horas de cultivo

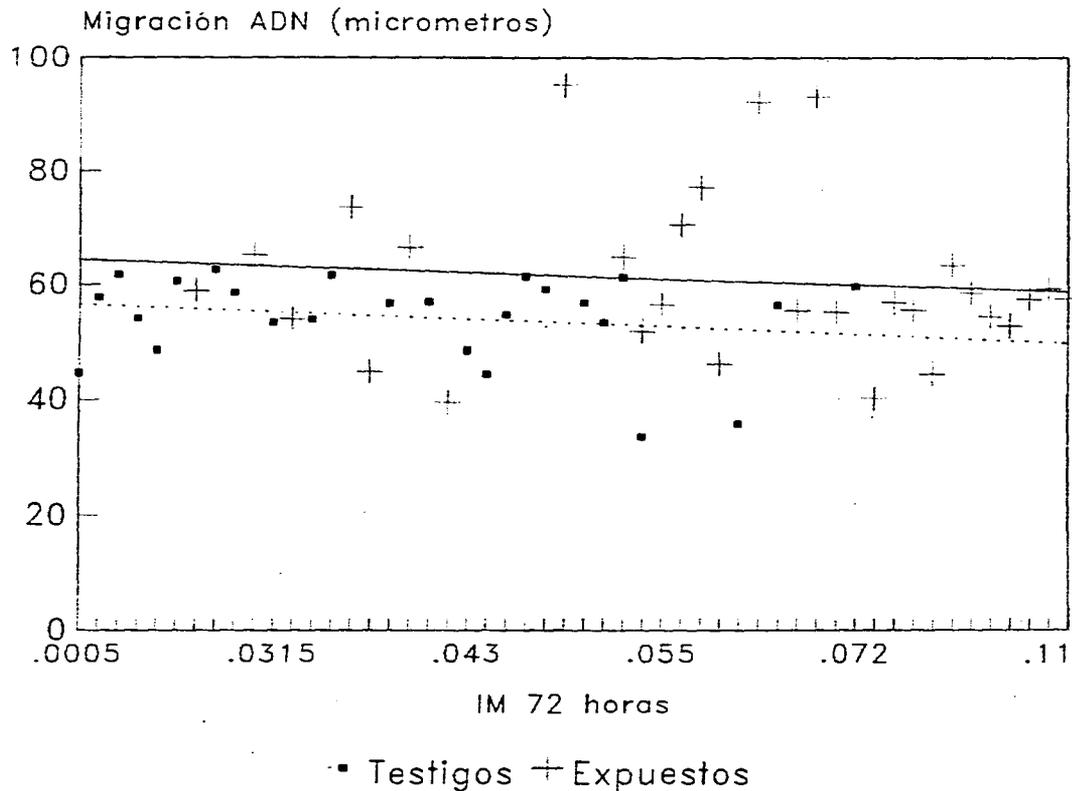


Figura 15. Tendencia en la correlación entre la migración del ADN y el índice de replicación

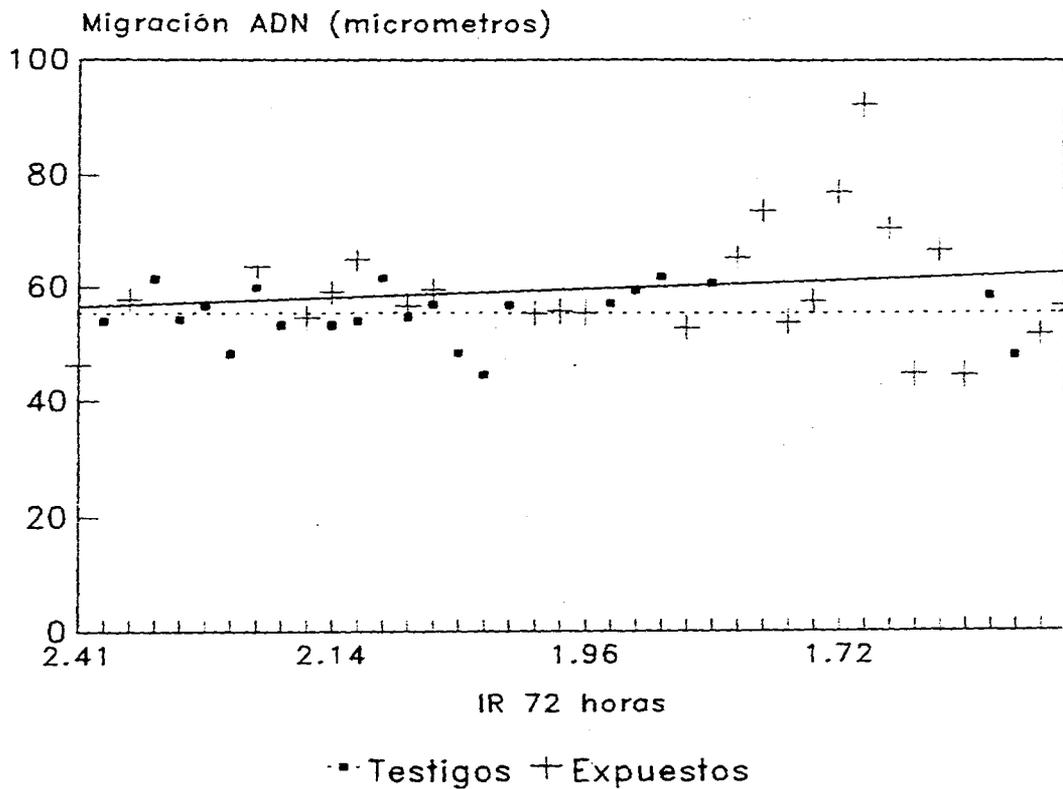


Figura 16. Tendencia en la correlación entre la migración del ADN y la frecuencia de aberraciones cromosômicas

