



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO EN LEUCOCITOS DE HABITANTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO, UTILIZANDO EL ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

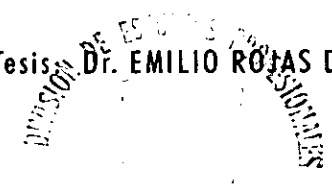
ANGEL RIVAS ESPINOZA

274372

Director de Tesis **Dr. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO**



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE CINGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"EVALUACION DEL DAÑO GENOTOXICO EN LEUCOCITOS DE HABITANTES DE LA CIUDAD DE MEXICO, UTILIZANDO EL ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR"

realizado por ANGEL RIVAS ESPINOZA

con número de cuenta 7853190-1 , pasante de la carrera de BIOLOGO

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO.	<i>Emilio Rojas del Castillo</i>
Propietario		
Propietario	DRA. JUDITH ISABEL GUZMAN RINCON.	<i>Judith Isabel Guzman Rincon</i>
Propietario	DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO.	<i>Mario Agustín Altamirano Lozano</i>
Suplente	DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ.	<i>René de Jesús Cardenas Vázquez</i>
Suplente	M. EN C. TERESA IMELDA FORTIOL VAN DER GONST	<i>Teresa Imelda Fortioul van der Gonst</i>

Consejo Departamental de BIOLOGIA.
Edna Maria Suarez Diaz
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ
COORDINADORA DE LICENCIATURA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U N A M, bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México a quien le debo mi formación profesional.

Al Dr. Emilio Rojas por su acertada dirección y paciencia para el término de éste trabajo.

A la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman por haberme permitido participar en su equipo de trabajo.

A los miembros de jurado examinador: Mta. Teresa Fortoul, Dra. Judith Guzman, Dr. Mario Altamirano y al Dr. Rene Cárdenas por la revisión y comentarios a este trabajo.

A Vianney Vega, Enrique Guauxochitl e Ignacio Callejas por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

Y muy especialmente:

A mis padres Ernesto y Carmen por su apoyo incondicional.

A mi esposa Teresa, a mis hijos Angelica y Héctor por su comprensión y cariño.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CONTAMINACIÓN DEL AIRE	4
PARTÍCULAS SUSPENDIDAS TOTALES	5
PLOMO	6
GASES	6
MONÓXIDO DE CARBONO	6
ÓXIDOS DENITRÓGENO	8
ÓXIDOS DE AZUFRE	9
HIDROCARBUROS	11
OZONO	12
OZONO Y SUS EFECTOS EN LA SALUD	15
Estudios epidemiológicos	16
EL PROBLEMA DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE EN LAS ZONAS URBANAS	17
Zona metropolitana de la Ciudad de México	17
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR. MARCADORES BIOLÓGICOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN	21
MARCADORES DE EXPOSICIÓN	23
MARCADORES BIOLÓGICOS DE EFECTO	24
MARCADORES BIOLÓGICOS DE SUSCEPTIBILIDAD	27
TÉCNICA DEL ENSAYO COMETA	28

OBJETIVO	29
HIPÓTESIS	30
JUSTIFICACIÓN	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
MÉTODO ESTADÍSTICO	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	41
TABLAS	52
GRÁFICAS	57
APÉNDICE A	68

RESUMEN.

Debido a los problemas que ocasiona a la salud humana la exposición a niveles tan altos de contaminación atmosférica en la ciudad de México, se realizó el presente trabajo, para determinar la posible relación entre el ozono, como contaminante fotoquímico principal y el daño en el material genético de células humanas sanguíneas (leucocitos). Para dicho estudio se realizó un muestreo en una población de jóvenes estudiantes de la Facultad de Medicina, con una edad promedio de 18 años.

En este trabajo se utilizó la técnica de electroforesis en células individuales ó "ensayo cometa" que puede detectar daño en el material genético de diferentes células. Por otro lado se obtuvieron los datos de concentración de ozono (O_3) a través de los monitores ubicados en distintas zonas de la ciudad de México pertenecientes a la red automática de monitoreo atmosférico (RAMA).

Los resultados mostraron que no existe una relación directa de daño entre el material genético de leucocitos humanos y la concentración de ozono entre los habitantes del Norte de la ciudad comparados con los del Sur, como lo suponía la hipótesis de trabajo. Sin embargo después agrupar a los individuos que habitan en la zona Oeste con los habitantes de la zona Este los resultados muestran una correlación importante, sugiriendo con esto, que sí existe una relación directa entre el aumento de la concentración de ozono con respecto al daño en el material genético de células sanguíneas en la población estudiada.

INTRODUCCIÓN.

Desde hace siglos el hombre ha resentido los efectos de la contaminación en su salud. Los primeros problemas de contaminación del aire se hicieron notar desde el Imperio Romano, y en el siglo XIV las autoridades inglesas prohibieron las fundiciones de plata y armaduras porque se dieron cuenta que contaminaban el aire. En 1895 en la ciudad de Pittsburgh se emitieron ordenanzas para reducir la cantidad de contaminantes liberados por las fundidoras de acero (Moeller, 1992).

Aunque la contaminación ha estado presente en el ambiente durante varios siglos, no es sino hasta el presente, en particular a partir de los años treinta, cuando el desarrollo tecnológico industrial se incrementa y las ciudades comienzan a crecer en forma desproporcionada, y se acelera el deterioro del medio llegando, en estas dos últimas décadas, a alcanzar niveles tan altos que no solamente se ve afectada la naturaleza, sino la misma existencia humana. Prácticamente no hay río o lago que no se encuentre contaminado por aguas negras municipales, plaguicidas, aceites, detergentes y en general por una gran cantidad de desechos que afectan la pureza de sus aguas y la vida acuática en las mismas.

La degradación de la calidad del aire en las ciudades, debida a la acumulación de gases provenientes de automóviles e industrias, a la materia putrefacta de la basura y a vapores generados por altas concentraciones urbanas ha provocado un gran número de problemas, no solo de tipo local sino que hay evidencias de que la composición de la atmósfera de la tierra esta siendo

modificada a medida que los contaminantes aumentan. Casos específicos de esto son el calentamiento de la atmósfera terrestre y la disminución de la capa de ozono (Mugica y Figueroa, 1996).

El uso de plaguicidas y fertilizantes, la descarga de aguas contaminadas con sustancias tóxicas y la disposición de toneladas de desechos sólidos municipales, industriales y tóxicos, han provocado la deforestación, la aceleración de la erosión, la desertificación y la inutilización de millones de hectáreas de tierra antes cultivable.

Todo esto trae como consecuencia una disminución en la calidad de vida de los habitantes del planeta. Este deterioro muchas veces no se percibe con claridad. Los habitantes de las grandes ciudades respiran plomo, hidrocarburos, partículas y gases, ingieren plaguicidas y otras sustancias químicas a través de los alimentos contaminados; sin embargo, el aumento de enfermedades respiratorias, cánceres, dermatitis, y otros padecimientos no se atribuyen directamente a la contaminación, ya que son tantas las sustancias involucradas que es muy difícil separar los efectos de cada una (Suárez, 1991).

El deterioro del medio ha sido cada vez más evidente para los seres humanos que sufren las consecuencias de ello. Una serie de acontecimientos han afectado la salud y la vida de poblaciones expuestas a altas concentraciones de distintos contaminantes en distintas partes del mundo: Minamata, Londres, Bhopal y Chernobyl; grandes derrames de petróleo y otras sustancias químicas en el mar han provocado una mayor concientización del peligro que implica la pérdida del control sobre la emisión o derrame de contaminantes (Mugica y Figueroa, 1996).

En términos generales los problemas ambientales relacionados con la contaminación se clasifican en: contaminación del suelo agrícola, contaminación de cuerpos de agua (ríos, lagos y océanos), contaminación del aire, contaminación por desechos sólidos (basura), contaminación radiactiva, contaminación por ruido y contaminación térmica. Si bien los temas anteriores son importantes para desarrollarse, en este trabajo se abordará únicamente el tema de la contaminación del aire y sus efectos en una muestra poblacional humana.

CONTAMINACIÓN DEL AIRE.

El término "Contaminación atmosférica" se comenzó a utilizar en forma frecuente en la década de los setenta, por los habitantes de las grandes ciudades, ya que para entonces se hizo evidente el deterioro en la calidad del aire, como consecuencia de las actividades productivas concentradas en dichas urbes, del número creciente de vehículos en circulación, de las emanaciones e incineración de toneladas de basura, del uso de sustancias químicas y, en gran medida, de los procesos de producción de energía eléctrica que requieren estas ciudades para su funcionamiento (Guerra, 1995).

El problema de la contaminación atmosférica no es solamente un problema local de cada ciudad, ya que debido a las características de movimiento del viento, los contaminantes en el aire pueden viajar kilómetros y trasladar los problemas a otras localidades del país e incluso pasar las fronteras de los países; como fue el

En términos generales los problemas ambientales relacionados con la contaminación se clasifican en: contaminación del suelo agrícola, contaminación de cuerpos de agua (ríos, lagos y océanos), contaminación del aire, contaminación por desechos sólidos (basura), contaminación radiactiva, contaminación por ruido y contaminación térmica. Si bien los temas anteriores son importantes para desarrollarse, en este trabajo se abordará únicamente el tema de la contaminación del aire y sus efectos en una muestra poblacional humana.

CONTAMINACIÓN DEL AIRE.

El término "Contaminación atmosférica" se comenzó a utilizar en forma frecuente en la década de los setenta, por los habitantes de las grandes ciudades, ya que para entonces se hizo evidente el deterioro en la calidad del aire, como consecuencia de las actividades productivas concentradas en dichas urbes, del número creciente de vehículos en circulación, de las emanaciones e incineración de toneladas de basura, del uso de sustancias químicas y, en gran medida, de los procesos de producción de energía eléctrica que requieren estas ciudades para su funcionamiento (Guerra, 1995).

El problema de la contaminación atmosférica no es solamente un problema local de cada ciudad, ya que debido a las características de movimiento del viento, los contaminantes en el aire pueden viajar kilómetros y trasladar los problemas a otras localidades del país e incluso pasar las fronteras de los países; como fue el

caso de la contaminación radioactiva dispersada por varios países europeos por el viento.

Dentro de los principales contaminantes atmosféricos tenemos a las partículas suspendidas totales, al plomo y diversos gases como el monóxido de carbono, los óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, el ozono y los hidrocarburos (Seinfeld, 1988).

PARTÍCULAS SUSPENDIDAS TOTALES.

Se conoce con el nombre de partículas a cualquier material sólido o líquido en el que los agregados individuales son mayores que una simple molécula, pero menores a 500 micras (Seinfeld, 1978).

Dentro de este grupo existe una gran variedad de partículas de naturaleza variada: partículas de origen natural formadas por materiales de los suelos y de origen biológico como: polen, hongos, esporas y microbios. También se cuentan partículas provenientes de los procesos de combustión (cenizas), las que son producto de actividades de la industria de la construcción y que resultan de las reacciones de los contaminantes como los sulfatos y los nitratos (Moeller, 1992). De casi todos los tipos de partículas en la atmósfera, los correspondientes a trazas de metales conocidos como tóxicos, constituyen uno de los riesgos más altos en la salud. El cadmio, por ejemplo, está implicado como causa de enfermedades cardiovasculares e hipertensión e interfiere con el metabolismo del zinc y el cobre (Mugica y Figueroa, 1996).

caso de la contaminación radioactiva dispersada por varios países europeos por el viento.

Dentro de los principales contaminantes atmosféricos tenemos a las partículas suspendidas totales, al plomo y diversos gases como el monóxido de carbono, los óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, el ozono y los hidrocarburos (Seinfeld, 1988).

PARTÍCULAS SUSPENDIDAS TOTALES.

Se conoce con el nombre de partículas a cualquier material sólido o líquido en el que los agregados individuales son mayores que una simple molécula, pero menores a 500 micras (Seinfeld, 1978).

Dentro de este grupo existe una gran variedad de partículas de naturaleza variada: partículas de origen natural formadas por materiales de los suelos y de origen biológico como: polen, hongos, esporas y microbios. También se cuentan partículas provenientes de los procesos de combustión (cenizas), las que son producto de actividades de la industria de la construcción y que resultan de las reacciones de los contaminantes como los sulfatos y los nitratos (Moeller, 1992). De casi todos los tipos de partículas en la atmósfera, los correspondientes a trazas de metales conocidos como tóxicos, constituyen uno de los riesgos más altos en la salud. El cadmio, por ejemplo, está implicado como causa de enfermedades cardiovasculares e hipertensión e interfiere con el metabolismo del zinc y el cobre (Mugica y Figueroa, 1996).

PLOMO.

El plomo (Pb) es uno de los contaminantes más vigilados por su alta toxicidad sobre el organismo humano. El riesgo de intoxicaciones debidas a la ingestión de este metal, obligo a regular su presencia en envases metálicos para alimentos y bebidas, pintura, cerámica y alfarería (Mc Connell, 1995).

Una de las fuentes más importantes de Pb incluye a la gasolina ya que éste se deposita en el ambiente durante su combustión y queda como residuo en el suelo.

Este metal afecta al sistema nervioso, al tejido sanguíneo y también puede dañar el desarrollo mental de los niños, sin embargo sus efectos carcinogénicos son controvertidos (OMS, 1992).

GASES.

MONÓXIDO DE CARBONO (CO).

El monóxido de carbono es un gas incoloro, inodoro, insípido y se encuentra en altas concentraciones en la atmósfera.

Este gas se forma por la incompleta combustión del carbono que reacciona con el oxígeno o de compuestos que contienen carbono. Esto ocurre cuando el oxígeno disponible es menor que la cantidad que se requiere para la

PLOMO.

El plomo (Pb) es uno de los contaminantes más vigilados por su alta toxicidad sobre el organismo humano. El riesgo de intoxicaciones debidas a la ingestión de este metal, obligo a regular su presencia en envases metálicos para alimentos y bebidas, pintura, cerámica y alfarería (Mc Connell, 1995).

Una de las fuentes más importantes de Pb incluye a la gasolina ya que éste se deposita en el ambiente durante su combustión y queda como residuo en el suelo.

Este metal afecta al sistema nervioso, al tejido sanguíneo y también puede dañar el desarrollo mental de los niños, sin embargo sus efectos carcinogénicos son controvertidos (OMS, 1992).

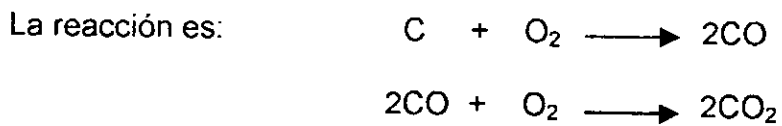
GASES.

MONÓXIDO DE CARBONO (CO).

El monóxido de carbono es un gas incoloro, inodoro, insípido y se encuentra en altas concentraciones en la atmósfera.

Este gas se forma por la incompleta combustión del carbono que reacciona con el oxígeno o de compuestos que contienen carbono. Esto ocurre cuando el oxígeno disponible es menor que la cantidad que se requiere para la

combustión, en el cual el bióxido de carbono es el producto cuando hay una pobre mezcla de combustión en el aire (Landis y Yu, 1995).



La presencia de este gas está asociado con el desarrollo industrial de cada ciudad, sin embargo existen personas con un mayor riesgo de exposición a éste contaminante como son las personas que laboran en la fundición de metales, en los hornos de coque, agentes de tránsito vehicular y bomberos.

El efecto fisiológico más conocido del CO es su interferencia en la transferencia del oxígeno. Ello trae como consecuencia la combinación del gas CO con la hemoglobina dando como resultado la carboxi-hemoglobina. La exposición a concentraciones altas de CO produce dolor de cabeza, disnea, alteración de la frecuencia respiratoria, desvanecimientos, ataxia, síncope, ataque apopléjico y estado de coma (Seeger y Welch, 1992).

Además el CO se une a otras proteínas tales como: la mioglobina, la citocromo c oxidasa y el citocromo P-450. El monóxido de carbono dificulta la difusión del oxígeno a la mitocondria, desplazando la curva de disociación de la oxihemoglobina hacia la izquierda de tal manera que se dificulta la liberación de oxígeno a los tejidos (Landis y Yu, 1995).

ÓXIDOS DE NITRÓGENO (NO_x).

Son producto de la combustión y precursores del ozono. Una vez en la atmósfera pueden reaccionar para formar ácidos y sales que contribuyen a la formación de la lluvia ácida y a la disminución de la visibilidad (Landis y Yu, 1995).

Existen seis formas de óxidos de nitrógeno: óxido nitroso (N₂O), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂), trióxido de nitrógeno (N₂O₃), tetraóxido de nitrógeno (N₂O₄) y pentaóxido de nitrógeno (N₂O₅).

De los óxidos anteriores el dióxido de nitrógeno es el más tóxico y ubicuo, también juega un papel esencial en la producción de oxidantes fotoquímicos, absorbe la energía de la luz ultravioleta y se descompone formando NO y oxígeno atómico. Este oxígeno energizado reacciona con el oxígeno molecular y forma ozono, el cual reacciona después con el NO para formar oxígeno molecular y NO₂, terminando de esta manera el ciclo fotolítico del NO₂ (Landis y Yu, 1995).

La relativa baja solubilidad de los óxidos de nitrógeno produce irritación mínima en la mucosa superior respiratoria, siendo el principal sitio de toxicidad en el tracto inferior respiratorio. El olor de NO₂ es detectable entre 1 y 3 ppm, mientras que la irritación de la membrana mucosa no ocurre a concentraciones menores de 13 ppm. Los individuos no familiarizados con el olor de éste gas pueden tener riesgo de sufrir toxicidad respiratoria. La seriedad de los efectos clínicos dependen primariamente de la concentración de los óxidos de nitrógeno inhalados y no de la duración de la exposición. La exposición a concentraciones

masivas de óxidos de nitrógeno puede producir muerte repentina debido a espasmo broncolaríngeo ó asfixia (Lypsett 1992).

Los estudios epidemiológicos realizados con NO_2 bajo techo sobre los efectos respiratorios en población humana, se ve incrementada para enfermedades respiratorias y déficit en la función pulmonar. La exposición al aire libre del NO_2 (la cual es menor bajo techo) demuestra un efecto de exposición crónica. Repetidas exposiciones a NO_2 causan daño en el sistema inmune. El NO_2 genera reacciones que producen radicales libres y es genotóxico in vitro y potencialmente carcinogénico o cocarcinogénico (Lypsett 1992).

ÓXIDOS DE AZUFRE (SO_x).

Los óxidos de azufre incluyen tanto al dióxido de azufre (SO_2) como al trióxido de azufre (SO_3), el SO_2 es el más importante como contaminante del aire, éste es un gas incoloro que en altas concentraciones tiene un olor irritante, se difunde fácilmente en el aire, es muy soluble en el agua y forma ácido sulfuroso ($\text{H}_2 \text{SO}_3$). De sus fuentes naturales la principal es la erupción volcánica. Su presencia en la atmósfera se debe a la quema de combustibles fósiles que contienen azufre, como el DIESEL y el combustóleo, utilizados en la industria o por transportes de carga, también los emite la industria de la fundición, la de papel y la del petróleo (ISGMEEPA, 1992).

El SO₂ puede reaccionar en forma catalítica o fotoquímica para formar trióxido de azufre SO₃. En el aire, por la presencia de algunos metales como el hierro o manganeso que actúan como catalizadores se lleva a cabo la siguiente reacción:



El mecanismo fotoquímico por el cual el SO₂ se convierte en SO₃ depende mucho de la atmósfera que lo rodea y puede deberse al oxígeno, al ozono y a la presencia de óxidos de nitrógeno o hidrocarburos. El trióxido de azufre se disuelve en las gotas presentes en la atmósfera formando el ácido sulfuroso, para después pasar a ácido sulfúrico (OMS/OPS, 1982).

El dióxido de azufre es rápidamente absorbido en la región nasofaringea. Las personas expuestas a 5 ppm de este gas presentan un aumento en la frecuencia respiratoria y disminución en el volumen respiratorio. Se han llevado a cabo observaciones similares en animales. La exposición a SO₂ en seres humanos altera la manera de respirar, manifestándose como un aumento en la frecuencia y un descenso del flujo inspiratorio y expiratorio. Se ha demostrado sinergismo y una elevada resistencia por vía respiratoria provocada por SO₂ y aerosoles de agua y solución salina (Landis y Yu, 1995).

Por su alta solubilidad el SO₂ es muy irritante para los ojos y tracto superior respiratorio. Su olor es detectable a 0.5 ppm, mientras que a 6 ppm produce irritación instantánea de la mucosa y sus síntomas son lagrimeo, rinorrea, tos,

sangrado por la nariz, falla en la respiración y dolor en el pecho. Los síntomas asociados con SO_2 en el tracto respiratorio bajo son: bronco-constricción y sensación de asfixia (Lypsett, 1992).

En accidentes industriales de donde se presentó una exposición elevada a altas concentraciones de SO_2 , Charan y Myers (1979), reportaron el caso de dos trabajadores que murieron en pocos minutos, encontrándose en sus pulmones una degradación extensiva en la mucosa bronquial y broncoquiliar; Galea y cols., (1964), reportaron un caso de un empleado en una fábrica de papel quien murió 17 días después de haberse expuesto durante 15-20 minutos a vapores de SO_2 (Lypsett, 1992).

Los resultados de algunos estudios en comunidades, resultan algo sorprendentes porque la exposición a SO_2 está asociada no únicamente con síntomas de aumento en la frecuencia respiratoria y decremento en la función pulmonar, sino también con un aumento en la mortalidad diaria. Tales efectos aparecen en 24 horas con exposiciones menores a 0.10 ppm. En estas situaciones el SO_2 parece ser un indicador de una compleja mezcla de contaminantes, incluyendo probablemente sulfatos ácidos y otras partículas (Lypsett 1992).

HIDROCARBUROS.

Son precursores importantes en la formación de ozono troposférico.

Como su nombre lo indica, son compuestos constituidos principalmente por carbono e hidrógeno. Son los componentes principales de combustibles como la

sangrado por la nariz, falla en la respiración y dolor en el pecho. Los síntomas asociados con SO_2 en el tracto respiratorio bajo son: bronco-constricción y sensación de asfixia (Lypsett, 1992).

En accidentes industriales de donde se presentó una exposición elevada a altas concentraciones de SO_2 , Charan y Myers (1979), reportaron el caso de dos trabajadores que murieron en pocos minutos, encontrándose en sus pulmones una degradación extensiva en la mucosa bronquial y broncoquiliar; Galea y cols., (1964), reportaron un caso de un empleado en una fábrica de papel quien murió 17 días después de haberse expuesto durante 15-20 minutos a vapores de SO_2 (Lypsett, 1992).

Los resultados de algunos estudios en comunidades, resultan algo sorprendentes porque la exposición a SO_2 está asociada no únicamente con síntomas de aumento en la frecuencia respiratoria y decremento en la función pulmonar, sino también con un aumento en la mortalidad diaria. Tales efectos aparecen en 24 horas con exposiciones menores a 0.10 ppm. En estas situaciones el SO_2 parece ser un indicador de una compleja mezcla de contaminantes, incluyendo probablemente sulfatos ácidos y otras partículas (Lypsett 1992).

HIDROCARBUROS.

Son precursores importantes en la formación de ozono troposférico.

Como su nombre lo indica, son compuestos constituidos principalmente por carbono e hidrógeno. Son los componentes principales de combustibles como la

gasolina y el petróleo. La gran variedad de hidrocarburos emitidos a la atmósfera por fuentes naturales y artificiales es tan alta que es muy difícil medirla o estimar el grado de emisión de cada una de ellas (Mugica y Figueroa, 1996).

Entre las fuentes naturales de hidrocarburos tenemos la emisión de metano de pantanos y arrozales y los terpenos provenientes de la vegetación, como las más importantes. De entre las fuentes antropogénicas, las más importantes son la combustión incompleta de las gasolinas y la evaporación de la misma, seguida por las actividades industriales de refinación y petroquímica y de evaporación de productos químicos utilizados en pinturas, tintorerías y producción de químicos. En general, se ha estimado que la vida media de la mayoría de los hidrocarburos en la atmósfera es del orden de días a meses, mientras que la del metano es del orden de años (Mugica y Figueroa, 1996).

Con respecto a la salud, los hidrocarburos producen somnolencia, irritación de ojos y tos (OMS, 1992).

OZONO (O₃).

El ozono es una molécula altamente reactiva compuesta de tres átomos de oxígeno. Es un gas que se encuentra normalmente en la estratosfera protegiendo a los seres vivos de la radiación ultravioleta y se encuentra presente en la troposfera.

El ozono no es un contaminante que se emita directamente a la atmósfera, sino que se forma en ésta a partir de reacciones muy complejas en las que

gasolina y el petróleo. La gran variedad de hidrocarburos emitidos a la atmósfera por fuentes naturales y artificiales es tan alta que es muy difícil medirla o estimar el grado de emisión de cada una de ellas (Mugica y Figueroa, 1996).

Entre las fuentes naturales de hidrocarburos tenemos la emisión de metano de pantanos y arrozales y los terpenos provenientes de la vegetación, como las más importantes. De entre las fuentes antropogénicas, las más importantes son la combustión incompleta de las gasolinas y la evaporación de la misma, seguida por las actividades industriales de refinación y petroquímica y de evaporación de productos químicos utilizados en pinturas, tintorerías y producción de químicos. En general, se ha estimado que la vida media de la mayoría de los hidrocarburos en la atmósfera es del orden de días a meses, mientras que la del metano es del orden de años (Mugica y Figueroa, 1996).

Con respecto a la salud, los hidrocarburos producen somnolencia, irritación de ojos y tos (OMS, 1992).

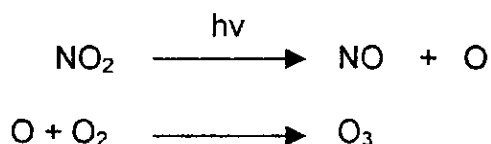
OZONO (O₃).

El ozono es una molécula altamente reactiva compuesta de tres átomos de oxígeno. Es un gas que se encuentra normalmente en la estratosfera protegiendo a los seres vivos de la radiación ultravioleta y se encuentra presente en la troposfera.

El ozono no es un contaminante que se emita directamente a la atmósfera, sino que se forma en ésta a partir de reacciones muy complejas en las que

participan los óxidos de nitrógeno, los hidrocarburos y la radiación solar. El resultado de todas estas complejas reacciones es la formación de lo que se conoce como *smog* fotoquímico. La palabra *smog* se deriva de la combinación de los vocablos *smoke*, humo y *fog* niebla, el término fotoquímico implica la participación de la energía radiante ($h\nu$).

El mecanismo que inicia la producción de este *smog* fotoquímico es la absorción de energía por el NO_2 , lo que ocasiona el rompimiento de la molécula en óxido nítrico y oxígeno atómico. Este último elemento es muy reactivo e inestable y reacciona inmediatamente con el oxígeno molecular, para formar ozono.



Normalmente hay un ciclo en el cual el ozono reacciona con el NO y regresa a la molécula inicial de NO_2 . Sin embargo, en episodios con altas concentraciones de ozono el ciclo se rompe, ya que algunos hidrocarburos reaccionan con el NO impidiendo que reaccione con el ozono.



Este grupo de reacciones forma el llamado ciclo fotolítico del óxido de nitrógeno, y se representa en el siguiente esquema.

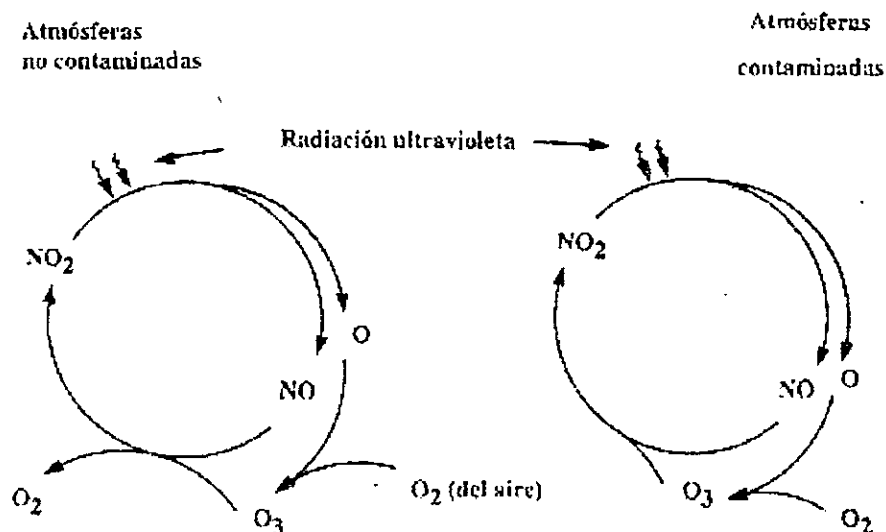


Figura 1: Ciclo fotoquímico de los óxidos de nitrógeno.

Fuente: Hilborn, 1990.

El *smog* fotoquímico en la actualidad representa uno de los mayores problemas de contaminación en las grandes ciudades con alto flujo vehicular y fuerte radiación como es la ciudad de México, Los Angeles y Nueva York en época de calor. En los lugares en donde se ha suprimido el plomo para mejorar el octanaje de las gasolinas, se ha adicionado una serie de compuestos orgánicos que realizan la misma función del plomo, pero a su vez intervienen en la formación de *smog* fotoquímico (Mugica y Figueroa, 1996).

El patrón de producción de ozono a partir de dióxido de nitrógeno, durante todo el día, es característico en las ciudades a horas altas de tránsito. El NO comienza a aparecer con el inicio del tránsito vehicular, al comienzo de la

radiación solar el NO se oxida a NO₂, la concentración de NO₂ comienza a aumentar y alcanza un máximo cuando se establece un equilibrio entre su velocidad de formación de ácido nítrico y nitratos orgánicos. Aproximadamente al mismo tiempo que se alcanza ese máximo comienza a formarse ozono, que alcanza su punto máximo y disminuye a medida que se eleva la concentración inicial de NO (Bravo y cols., 1992).

OZONO Y SUS EFECTOS EN LA SALUD.

Tyler y cols., (1988), en estudios con primates mostró que existía modificación en las vías conductoras del aire y alteración en la mecánica pulmonar después de exposición crónica.

La exposición aguda a este contaminante ocasiona inflamación pulmonar con aumento en la permeabilidad de las vías aéreas y alteración de la mecánica pulmonar, (Lippman 1992).

En un estudio con voluntarios sanos, se notó que el ejercicio aumenta la dosis de O₃ que llega al aparato respiratorio, disminuyendo la función pulmonar, así como la capacidad física y el agravamiento de la sintomatología respiratoria con niveles tan bajos como 0.12 ppm, valor arriba de los 100 IMECAS (Lippmann, 1992).

Mc Donnell y cols., (1985) y Avol y cols., (1989), concluyeron que se requiere de ejercicio intenso y sostenido para provocar disminución en los volúmenes y en las capacidades pulmonares en adultos jóvenes sanos.

radiación solar el NO se oxida a NO₂, la concentración de NO₂ comienza a aumentar y alcanza un máximo cuando se establece un equilibrio entre su velocidad de formación de ácido nítrico y nitratos orgánicos. Aproximadamente al mismo tiempo que se alcanza ese máximo comienza a formarse ozono, que alcanza su punto máximo y disminuye a medida que se eleva la concentración inicial de NO (Bravo y cols., 1992).

OZONO Y SUS EFECTOS EN LA SALUD.

Tyler y cols., (1988), en estudios con primates mostró que existía modificación en las vías conductoras del aire y alteración en la mecánica pulmonar después de exposición crónica.

La exposición aguda a este contaminante ocasiona inflamación pulmonar con aumento en la permeabilidad de las vías aéreas y alteración de la mecánica pulmonar, (Lippman 1992).

En un estudio con voluntarios sanos, se notó que el ejercicio aumenta la dosis de O₃ que llega al aparato respiratorio, disminuyendo la función pulmonar, así como la capacidad física y el agravamiento de la sintomatología respiratoria con niveles tan bajos como 0.12 ppm, valor arriba de los 100 IMECAS (Lippmann, 1992).

Mc Donnell y cols., (1985) y Avol y cols., (1989), concluyeron que se requiere de ejercicio intenso y sostenido para provocar disminución en los volúmenes y en las capacidades pulmonares en adultos jóvenes sanos.

Rivero y cols., (1993) y Koenig y cols., (1987), consideran especialmente susceptibles a los efectos del ozono a personas asmáticas y enfermos pulmonares obstructivos crónicos y enfermos del corazón, sin embargo sus resultados no parecen ser muy diferentes a los referidos en los sujetos sanos.

Estudios epidemiológicos.

En estudios epidemiológicos a corto plazo de la variación en los niveles de función respiratoria en relación con los niveles de ozono, han dado evidencia de que este gas puede ocasionar una reducción temporal de la ventilación, esto es, de la capacidad de introducir aire a nuestros pulmones (Fourtoul, 1996).

En 1986 Namihira estudió la función respiratoria entre dos poblaciones de niños y niñas entre 6 y 14 años de edad. Una población se localizaba en el sureste de la ciudad de México, San Lorenzo y la otra se encontraba en el noreste, Xalostoc (zona industrial). Observó una ligera disminución en los valores normales para estas pruebas en los niños de Xalostoc, sin embargo se limita el estudio por la falta de mediciones de niveles de exposición ambiental en las poblaciones estudiadas.

La doctora Castillejos y cols., (1992), realizaron una investigación sobre los efectos del ozono a en poblaciones de alumnos de escuelas primarias (6-14 años), una población localizada en suroeste (Pedregal de Sn. Angel) y otra en el noroeste (Xalostoc), encontró que los niños expuestos a niveles altos de ozono presentaban una disminución de su función pulmonar, aunque menciona que esta disminución

es transitoria, no debe subestimarse, ya que existen algunas hipótesis que indican que el ozono puede tener efectos a largo plazo, como puede ser la disminución en el crecimiento del pulmón y el aumento en el ritmo de envejecimiento del mismo, también mencionan que el ozono provoca inflamación del epitelio que reviste el aparato respiratorio, reduce la función ciliar, disminuyendo por tanto las respuestas defensivas del organismo, también causa daño a la mucosa respiratoria y reduce la función de los macrófagos alveolares (células encargadas de contrarrestar la acción nociva de cuerpos extraños que penetran a los pulmones), lo cual facilita las infecciones de las vías respiratorias.

Por otra parte Fortoul (1995), reporta en un estudio con niños realizado en verano, encontró que cuando los niños jugaban en días con niveles elevados de ozono su función respiratoria disminuía y los días con ozono por abajo de la norma mexicana de calidad del aire, la función respiratoria no se modificaba.

Del ozono también se conocen sus efectos dañinos tales como: irritación de los ojos, nariz y garganta (Young y cols., 1964).

EL PROBLEMA DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE EN LAS ZONAS URBANAS.

Zona metropolitana de la Ciudad de México. (ZMCM)

En la ciudad de México se produce una gran cantidad de desechos tanto orgánicos como inorgánicos de origen antropogénico, se aportan 14000 toneladas de heces y orina al día, 15000 toneladas de residuos sólidos, 6500 toneladas de

es transitoria, no debe subestimarse, ya que existen algunas hipótesis que indican que el ozono puede tener efectos a largo plazo, como puede ser la disminución en el crecimiento del pulmón y el aumento en el ritmo de envejecimiento del mismo, también mencionan que el ozono provoca inflamación del epitelio que reviste el aparato respiratorio, reduce la función ciliar, disminuyendo por tanto las respuestas defensivas del organismo, también causa daño a la mucosa respiratoria y reduce la función de los macrófagos alveolares (células encargadas de contrarestar la acción nociva de cuerpos extraños que penetran a los pulmones), lo cual facilita las infecciones de las vías respiratorias.

Por otra parte Fortoul (1995), reporta en un estudio con niños realizado en verano, encontró que cuando los niños jugaban en días con niveles elevados de ozono su función respiratoria disminuía y los días con ozono por abajo de la norma mexicana de calidad del aire, la función respiratoria no se modificaba.

Del ozono también se conocen sus efectos dañinos tales como: irritación de los ojos, nariz y garganta (Young y cols., 1964).

EL PROBLEMA DE LA CONTAMINACIÓN DEL AIRE EN LAS ZONAS URBANAS.

Zona metropolitana de la Ciudad de México. (ZMCM)

En la ciudad de México se produce una gran cantidad de desechos tanto orgánicos como inorgánicos de origen antropogénico, se aportan 14000 toneladas de heces y orina al día, 15000 toneladas de residuos sólidos, 6500 toneladas de

desechos industriales peligrosos al día, 4000 toneladas de partículas contaminantes y 4000 toneladas de gases contaminantes primarios. Por lo anterior es una las ciudades que produce más desechos per capita en el mundo.

Existen 135 millones de personas que residen en áreas urbanas como la ciudad de México en las que se excede el estándar americano de calidad del aire para el O₃, que es de 0.12 ppm en una hora al día, un día al año en un período de tres años (Menéndez, 1993).

Según datos oficiales, el transporte urbano contribuye con el 75% de los óxidos de nitrógeno y el 52% de emisiones de hidrocarburos a la ZMCM (Menéndez, 1993).

Los problemas de contaminación atmosférica urbana se presentan principalmente en las megalópolis de las llamadas "naciones en desarrollo". El crecimiento demográfico, la concentración industrial y el acelerado incremento del parque vehicular, provoca que sus habitantes estén expuestos a problemas graves de contaminación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) en su estudio "La contaminación del Aire en las megalópolis del mundo" (WHO, 1992), señala que las ciudades de Latinoamérica tienden a presentar una mayor concentración de vehículos que en otras regiones en desarrollo y por lo tanto, la contribución de los vehículos motorizados a la contaminación es mayor.

La zona Metropolitana de la ciudad de México esta situada a 2240 m sobre el nivel del mar y cubre un área de 255 kilómetros cuadrados. Su población en 1990 fue mayor a 15 millones de personas que producen el 36% del producto

interno bruto del país y que consumen el 17% de la energía generada en él (ISGMEEPA, 1992). Además cuenta con una densidad de población que varía desde casi 7000 personas por km² en la zona centro hasta 500 personas por km² en zonas circundantes. De esta población el 55% reside en el Distrito Federal y el 45% en los municipios del Estado de México. La temperatura en la Ciudad de México es en promedio de 15°C (12°C en enero y 17°C en mayo). La precipitación durante el verano (de junio a septiembre) es de 735 mm por año. La ventilación es pobre dadas sus características geográficas, ya que está rodeada por montañas que van de los 3000 a 5000 m de altura, lo cual no facilita la dispersión de contaminantes (ISGMEEPA, 1994).

La contaminación atmosférica está ligada estrictamente al consumo de combustibles. En la ciudad de México el consumo promedio diario de gasolinas presenta un crecimiento acelerado. En 1989 se consumieron en promedio cada día un total de 15 millones de litros de gasolina. En 1994 el consumo fue de 19 millones de litros. Entre 1989 y 1994 el consumo anual, aumentó a 800,000 litros, incrementándose en 4 millones de litros en un lapso solamente 5 años.

Se estima que en la ZMCM operan 12,000 establecimientos de servicios que utilizan procesos de combustión e incineración. La producción, almacenamiento y distribución de combustibles genera alrededor del 14% de la contaminación proveniente de fuentes fijas. Casi la tercera parte de estas emisiones están constituidas por hidrocarburos y alrededor de la sexta parte por bióxido de azufre. Se sabe que los vapores de gasolina y combustibles en general son especialmente nocivos para la salud. La contaminación del aire por ozono,

óxidos de nitrógeno y azufre se asocian con una mayor frecuencia de ataques asmáticos y de admisiones a hospitales por enfermedades respiratorias agudas (ISGEEPA, 1992).

La norma mexicana para el ozono ambiental indica que éste no debe sobrepasar 0.11 ppm por hora promedio, la Organización Mundial de la Salud para la calidad del aire en Europa establece una norma de (0.076-0.1 ppm) por hora promedio y de 0.05-0.06 ppm para 8 horas (WHO, 1987). En Estados Unidos la norma federal es de 0.12 ppm para una hora en promedio que no debe excederse más de una vez al año (EPA 1991). En México, para la ZMCM se estableció en 0.11 ppm como promedio máximo horario o 110 ppb como promedio para una hora una vez al año, las que son rebasadas en forma casi permanente y provocan el mayor grado de exposición conocido en cualquier ciudad del mundo (ISGMEEPA 1992).

Las normas con las que se cuantifican a los principales contaminantes fueron establecidas por el sector salud mediante un decreto publicado el 29 de noviembre de 1982 (ISGEEPA 1994).

Normatividad de la Calidad del Aire (ISGMEEPA, 1994)

CONTAMINANTE	NORMAS 1994
Monóxido de Carbono	11 ppm en 8 Hrs.
Bióxido de Azufre	0.13 ppm en 24 Hrs. 0.03 ppm en 1 Año
Bióxido de Nitrógeno	0.21 ppm en 1 Hora
Ozono	0.11 ppm en 1 Hora
Partículas menores a 10 μm	150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 Horas 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1 Año
Partículas suspendidas totales	260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 Horas 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1 Año
Plomo	1.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (promedio de 3 meses)

Cuadro 1

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR. MARCADORES BIOLÓGICOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN.

Recientemente se han incrementado estudios en el área de Genética Toxicológica que se define como la rama de la Toxicología que trata de identificar y analizar los efectos derivados de la exposición a sustancias tóxicas en el

Normatividad de la Calidad del Aire (ISGMEEPA, 1994)

CONTAMINANTE	NORMAS 1994
Monóxido de Carbono	11 ppm en 8 Hrs.
Bióxido de Azufre	0.13 ppm en 24 Hrs. 0.03 ppm en 1 Año
Bióxido de Nitrógeno	0.21 ppm en 1 Hora
Ozono	0.11 ppm en 1 Hora
Partículas menores a 10 μm	150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 Horas 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1 Año
Partículas suspendidas totales	260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 Horas 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1 Año
Plomo	1.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (promedio de 3 meses)

Cuadro 1

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR. MARCADORES BIOLÓGICOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN.

Recientemente se han incrementado estudios en el área de Genética Toxicológica que se define como la rama de la Toxicología que trata de identificar y analizar los efectos derivados de la exposición a sustancias tóxicas en el

material genético, así como descubrir los posibles mecanismos de acción y sus consecuencias al nivel de la patología humana (Ostrosky y Gonsebatt, 1996).

La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis de exposición y de la función que desempeñe en el organismo él (los) tejido (s) afectado (s) (NRC, 1989; 1992, Klaasen y Eaton, 1991).

Se llaman indicadores o marcadores biológicos a aquellos elementos relacionados con la actividad de los seres vivos, que permiten determinar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa.

La detección de un xenobiótico en fluidos o tejidos es una señal de que el organismo tuvo contacto con éste, es decir, ha estado expuesto a él, por lo que constituirá un marcador de exposición. Cuando ésta ha causado cambios en los organismos, es posible caracterizarlos cuali o cuantitativamente a través de diferentes estrategias. Los marcadores o indicadores biológicos de efecto son las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud. Finalmente, un marcador biológico de susceptibilidad es aquel indicador de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico (NRC, 1989).

MARCADORES DE EXPOSICIÓN.

La exposición externa es la cantidad o concentración de material xenobiótico en el ambiente de un organismo, mientras que la dosis interna se refiere a la cantidad de xenobiótico que es transferida o absorbida por el organismo. La dosis biológicamente efectiva, en términos generales es la dosis interna que está cuantitativamente relacionada con un efecto biológico; sin embargo es mucho más preciso considerarla como la cantidad de material xenobiótico que ha interactuado con un receptor celular crítico o con un blanco celular o tisular en donde el efecto biológico se inicia. Dado que estos sitios de recepción son a menudo desconocidos, o no son accesibles al muestreo, es necesario frecuentemente usar un sitio o compartimento sustituto, para el cual la concentración ha sido correlacionada con la dosis biológicamente efectiva o con el efecto biológicamente identificable en el tejido blanco (Elinder y cols., 1987).

Existe una continua necesidad de desarrollar, a través de la investigación, los marcadores adecuados de dosis interna que reflejan la dosis biológicamente efectiva, puesto que la cantidad de xenobiótico que es realmente absorbida por el organismo es generalmente desconocida, y a veces puede estar dentro de los límites de detección (Wild, 1990; Gonschatt, 1994). La dosis biológicamente efectiva puede depender de las características individuales, las cuales son responsables a su vez, de una gran parte de las diferencias que se observan al momento de cuantificar los efectos. Los marcadores de exposición se pueden basar en mediciones farmacocinéticas, como las concentraciones circulantes, la

dosis acumulada o la vida media del compuesto en el plasma. Las variaciones individuales en características fisiológicas como el sexo, la edad, el flujo sanguíneo, la permeabilidad de membranas y la tasa respiratoria, afectan significativamente la absorción y distribución de una sustancia química y sus metabolitos (Doull, 1980).

La dosis interna de un xenobiótico puede variar con la ruta de exposición, la especie química y la forma física. Para hacer estimaciones cuali o cuantitativas de la exposición mediante marcadores biológicos, la concentración, la duración y el patrón de exposición y la naturaleza fisicoquímica de una sustancia tóxica deben ser consideradas en la selección de un marcador apropiado de exposición (Gibaldi y Perrier, 1982).

MARCADORES BIOLÓGICOS DE EFECTO.

Para la investigación en salud ambiental, los marcadores biológicos de efecto a un agente tóxico son considerados en el contexto de su relación con la salud del individuo (NRC, 1989; 1992), por lo que un efecto se define como:

- Una alteración en un tejido u órgano.
- Un evento temprano en un proceso biológico predictivo de desarrollo de un padecimiento.
- Un padecimiento o una enfermedad clínicamente identificable.

- Una respuesta periférica o paralela al desarrollo de una enfermedad, pero correlacionado con él y por lo tanto útil para predecir la evolución de un padecimiento.

Por ello, un marcador biológico de un efecto puede ser cualquier cambio cuali o cuantitativo predictivo de un daño a la salud y que resulta de la exposición a un agente exógeno. El mismo marcador biológico puede también utilizarse como un indicador de la fisiología normal, por ejemplo, la concentración de la glucosa o de la colinesterasa en sangre.

Los marcadores de efectos biológicos tempranos incluyen alteraciones en las funciones de los tejidos blanco después de la exposición. Como señales de alarma, estos marcadores pueden ser dosímetros para guiar la intervención para reducir o prevenir la exposición. Estas señales tempranas pueden también observarse en órganos o tejido diferentes de los sitios que son críticos para la acción de la sustancia tóxica (NRC, 1989).

Un tejido afectado por una sustancia tóxica puede exhibir una función alterada aún si la persona afectada no presenta manifestaciones de ello. Estas funciones alteradas pueden en algunos casos determinarse mediante pruebas, particularmente con métodos bioquímicos o biológicos. Los marcadores biológicos de estas funciones alteradas son muy útiles si ellas están relacionadas a órganos específicos o funciones, por ej. la beta microglobulina para la función renal y la hormona luteinizante para la ovárica, la respuesta proliferante de linfocitos T para la función inmune celular (NRC, 1989; Ostrosky y cols., 1991; Gonsebatt y cols., 1992; Burns y Munson, 1993).

Si la exposición a una sustancia tóxica y la dosis interna es lo suficientemente alta, se desarrollará una enfermedad porque la dosis biológicamente efectiva será suficiente para afectar alguna función irreversiblemente o por un período sustancial (IARC, 1992). La enfermedad que ocurre después de la exposición puede ligarse directamente a la sustancia tóxica. El padecimiento que se manifiesta mucho tiempo después de la exposición, será difícilmente relacionable con la exposición (por ej. la disfunción testicular u ovárica y cáncer, cáncer de vejiga e ingestión de solución de Fowler), a menos que los hallazgos sean patognómicos, es decir que sean relativamente específicos de un tipo particular de exposición (como un mesotelioma o un cáncer de piel) o sean raros en personas no expuestas (como angiosarcoma o adenocarcinoma vaginal) (ATSDR, 1989; NRC, 1989).

La transición a la manifestación de la enfermedad puede depender de la propiedades de la sustancia tóxica, la naturaleza de la exposición, el proceso de la enfermedad en sí mismo, o de susceptibilidades individuales (Elinder y cols., 1987; NRC, 1989). Las personas responden de manera diferente a los agentes tóxicos, y no resulta sorprendente que solo algunos miembros de una población similarmente expuesta a un determinado agente ambiental, desarrollen un padecimiento dado (Harden, 1990).

MARCADORES BIOLÓGICOS DE SUSCEPTIBILIDAD.

Algunos marcadores biológicos indican acerca de la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a agentes ambientales. Estos factores son independientes de la ocurrencia de la exposición, a pesar de que la exposición a veces incrementa la susceptibilidad al efecto de posteriores exposiciones (por ejemplo, la sensibilización al formaldehído). Una característica intrínseca o una enfermedad preexistente que aumente la dosis interna o la dosis biológicamente efectiva, o que amplifique el efecto en el tejido blanco, puede ser un marcador biológico de susceptibilidad incrementada (NIEHS, 1985; Omenn, 1986; Harden, 1990). Estos marcadores pueden incluir diferencias congénitas en el metabolismo, variaciones en las concentraciones de inmunoglobulinas producidas y en su afinidad por el antígeno, baja capacidad de reserva orgánica, y otros factores ambientales o genéticamente inducidos que modifiquen la absorción, el metabolismo, la desintoxicación y el efecto de agentes ambientales (Harden, 1990).

A pesar de que los científicos tienden a dividir a los marcadores biológicos en grupos, se hace evidente que hay un proceso continuo entre la salud y la enfermedad, y las evidencias indican que también existe un proceso continuo entre la exposición y el efecto (IARC, 1992). De acuerdo con esto, lo que una vez pareció ser un grupo más o menos discreto de marcadores biológicos, son ahora más difíciles de discriminar. Los marcadores biológicos se dividen mejor operacionalmente, dependiendo de cómo son identificados y cómo serán

utilizados, pero las divisiones no deberían ser interpretadas en el sentido de distinciones al nivel de los mecanismos (NRC, 1989).

TÉCNICA DEL ENSAYO COMETA.

A partir del año de 1988 se ha propuesto una prueba o ensayo que detecta daño al nivel de DNA, llamada técnica de electroforesis de células individuales (SCGE) ó ensayo cometa, la cual ha tenido una gran aplicación. Esta técnica se ha utilizado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, en cultivo de tejidos y cultivo de células primarias en suspensión, y detectar con esto rompimientos en el DNA inducidos por determinados agentes en una gran variedad de células de mamíferos. Se ha aplicado para estudios de biomonitoreo en poblaciones humanas como lo muestran los trabajos de Genotoxicidad de pentaóxido de Vanadio (Rojas y cols., 1996), el de Exposición crónica a Hidroarsenicismo (Valverde, 1995), así como estudios en poblaciones susceptibles a daños ocasionados por agentes oxidantes, radiación ionizante y radiación ultra-violeta, utilizando linfocitos humanos, su uso se extiende al análisis de productos biotecnológicos, también se han utilizado para el estudio de peces y gusanos terrestres expuestos a contaminación ambiental. Lo mencionado anteriormente se debe en gran parte por las ventajas que ofrece la técnica de electroforesis de células individuales y el interés de realizar estudios de biomonitoreo ambiental así como estudios de carcinogénesis y envejecimiento celular (Rojas y cols., 1996; Tice, 1995).

utilizados, pero las divisiones no deberían ser interpretadas en el sentido de distinciones al nivel de los mecanismos (NRC, 1989).

TÉCNICA DEL ENSAYO COMETA.

A partir del año de 1988 se ha propuesto una prueba o ensayo que detecta daño al nivel de DNA, llamada técnica de electroforesis de células individuales (SCGE) ó ensayo cometa, la cual ha tenido una gran aplicación. Esta técnica se ha utilizado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, en cultivo de tejidos y cultivo de células primarias en suspensión, y detectar con esto rompimientos en el DNA inducidos por determinados agentes en una gran variedad de células de mamíferos. Se ha aplicado para estudios de biomonitorio en poblaciones humanas como lo muestran los trabajos de Genotoxicidad de pentaóxido de Vanadio (Rojas y cols., 1996), el de Exposición crónica a Hidroarsenicismo (Valverde, 1995), así como estudios en poblaciones susceptibles a daños ocasionados por agentes oxidantes, radiación ionizante y radiación ultra-violeta, utilizando linfocitos humanos, su uso se extiende al análisis de productos biotecnológicos, también se han utilizado para el estudio de peces y gusanos terrestres expuestos a contaminación ambiental. Lo mencionado anteriormente se debe en gran parte por las ventajas que ofrece la técnica de electroforesis de células individuales y el interés de realizar estudios de biomonitorio ambiental así como estudios de carcinogénesis y envejecimiento celular (Rojas y cols., 1996; Tice, 1995).

Por otro lado en cuanto a sus características, tenemos que es una técnica sensible por ser capaz de detectar 1 rompimiento de DNA por cada 10 daltones; puede dependiendo del pH utilizado evaluar desde un sitio álcali lábil hasta rompimientos de DNA de doble cadena, además permite cuantificar el daño al nivel de células individuales, por lo que puede indicar un efecto al nivel de subpoblaciones celulares del mismo individuo.

Dentro de las ventajas que implica utilizar esta técnica tenemos las siguientes:

- Cuantificar la extensión del DNA roto de tejidos animales o especímenes de biopsias en humanos, ya que se requiere de una pequeña muestra.
- Realizar en poco tiempo, si se cuenta con un analizador de imágenes.
- Es una prueba sensible al igual que la elución alcalina.
- Permite analizar un número de células estadísticamente adecuado.

OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es determinar el daño al DNA en leucocitos de jóvenes que residen en la Ciudad de México, mediante la técnica de electroforesis unicelular y comprobar si este daño esta correlacionado con las zonas de mayor índice de contaminación atmosférica. Además detectar diferencias de migraciones del DNA al agrupar por las zonas norte, sur, este y

Por otro lado en cuanto a sus características, tenemos que es una técnica sensible por ser capaz de detectar 1 rompimiento de DNA por cada 10 daltones; puede dependiendo del pH utilizado evaluar desde un sitio álcali lábil hasta rompimientos de DNA de doble cadena, además permite cuantificar el daño al nivel de células individuales, por lo que puede indicar un efecto al nivel de subpoblaciones celulares del mismo individuo.

Dentro de las ventajas que implica utilizar esta técnica tenemos las siguientes:

- Cuantificar la extensión del DNA roto de tejidos animales o especímenes de biopsias en humanos, ya que se requiere de una pequeña muestra.
- Realizar en poco tiempo, si se cuenta con un analizador de imágenes.
- Es una prueba sensible al igual que la elución alcalina.
- Permite analizar un número de células estadísticamente adecuado.

OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es determinar el daño al DNA en leucocitos de jóvenes que residen en la Ciudad de México, mediante la técnica de electroforesis unicelular y comprobar si este daño esta correlacionado con las zonas de mayor índice de contaminación atmosférica. Además detectar diferencias de migraciones del DNA al agrupar por las zonas norte, sur, este y

oeste de la ciudad de México y notar si existen diferencias debido al sexo de los individuos muestreados.

HIPÓTESIS.

Si la zona con mayores índices de contaminación atmosférica por ozono, es la región sur de la ciudad de México, es ahí donde tendrá que existir un mayor daño en el material genético de las células analizadas por la prueba de electroforesis de células individuales.

JUSTIFICACIÓN.

En estudios histopatológicos realizados en 76 personas clínicamente sanas del suroeste de la ciudad de México, área en la que se presenta una mayor concentración de ozono, se encontró que el epitelio nasal presentaba: hiperplasia, células escamosas, queratinización y atrofia (Calderon-Garcidueñas y cols., 1992). Utilizando la técnica de Electroforesis Unicelular (Calderon-Garcidueñas y cols., 1996), reportan un incremento en la frecuencia de daño al DNA aunada a los cambios histopatológicos ya mencionados en personas que habitan en el suroeste de la Ciudad de México con respecto a personas que habitan en la ciudad de Manzanillo, Colima. Así mismo reportan en personas provenientes de la provincia

oeste de la ciudad de México y notar si existen diferencias debido al sexo de los individuos muestreados.

HIPÓTESIS.

Si la zona con mayores índices de contaminación atmosférica por ozono, es la región sur de la ciudad de México, es ahí donde tendrá que existir un mayor daño en el material genético de las células analizadas por la prueba de electroforesis de células individuales.

JUSTIFICACIÓN.

En estudios histopatológicos realizados en 76 personas clínicamente sanas del suroeste de la ciudad de México, área en la que se presenta una mayor concentración de ozono, se encontró que el epitelio nasal presentaba: hiperplasia, células escamosas, queratinización y atrofia (Calderon-Garcidueñas y cols., 1992). Utilizando la técnica de Electroforesis Unicelular (Calderon-Garcidueñas y cols., 1996), reportan un incremento en la frecuencia de daño al DNA aunada a los cambios histopatológicos ya mencionados en personas que habitan en el suroeste de la Ciudad de México con respecto a personas que habitan en la ciudad de Manzanillo, Colima. Así mismo reportan en personas provenientes de la provincia

oeste de la ciudad de México y notar si existen diferencias debido al sexo de los individuos muestreados.

HIPÓTESIS.

Si la zona con mayores índices de contaminación atmosférica por ozono, es la región sur de la ciudad de México, es ahí donde tendrá que existir un mayor daño en el material genético de las células analizadas por la prueba de electroforesis de células individuales.

JUSTIFICACIÓN.

En estudios histopatológicos realizados en 76 personas clínicamente sanas del suroeste de la ciudad de México, área en la que se presenta una mayor concentración de ozono, se encontró que el epitelio nasal presentaba: hiperplasia, células escamosas, queratinización y atrofia (Calderon-Garcidueñas y cols., 1992). Utilizando la técnica de Electroforesis Unicelular (Calderon-Garcidueñas y cols., 1996), reportan un incremento en la frecuencia de daño al DNA aunada a los cambios histopatológicos ya mencionados en personas que habitan en el suroeste de la Ciudad de México con respecto a personas que habitan en la ciudad de Manzanillo, Colima. Así mismo reportan en personas provenientes de la provincia

un incremento en el daño al DNA conforme al tiempo que las personas permanecían en la ciudad de México (Calderon-Garcidueñas y cols., 1996).

En un estudio piloto en jóvenes estudiantes de la Facultad de Medicina de la UNAM se evaluó la frecuencia basal de rompimientos de una sola hebra de DNA, en células sanguíneas y células epiteliales bucales y nasales. Se encontraron diferencias en la frecuencia basal entre individuos que vivían en la zona norte de la ciudad y los que vivían en el sur. Estas diferencias en la frecuencia basal de rompimientos de DNA, y la topografía de la ciudad de México sugiere que los habitantes de la misma están expuestos a diferentes contaminantes ambientales (Rojas y cols., 1996).

MATERIAL Y MÉTODOS.

El estudio se realizó con una población estudiantil de la Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria, de la cual se obtuvo una muestra sanguínea de 96 individuos con un promedio de 18 años de edad de los cuales 40 fueron varones y 56 mujeres, siendo estos individuos aparentemente sanos. Las muestras fueron obtenidas los días 3 y 4 de diciembre de 1996 y el 16 de febrero de 1997.

A cada muestra de sangre de 10 (μ l, extraída por punción del dedo índice, utilizando una lanceta, se le agregó a 1 ml de medio RPMI- 1640 con heparina y se trasladó al laboratorio. Donde se centrifugó durante 5 seg. a 6000 r. p. m., se

un incremento en el daño al DNA conforme al tiempo que las personas permanecían en la ciudad de México (Calderon-Garcidueñas y cols., 1996).

En un estudio piloto en jóvenes estudiantes de la Facultad de Medicina de la UNAM se evaluó la frecuencia basal de rompimientos de una sola hebra de DNA, en células sanguíneas y células epiteliales bucales y nasales. Se encontraron diferencias en la frecuencia basal entre individuos que vivían en la zona norte de la ciudad y los que vivían en el sur. Estas diferencias en la frecuencia basal de rompimientos de DNA, y la topografía de la ciudad de México sugiere que los habitantes de la misma están expuestos a diferentes contaminantes ambientales (Rojas y cols., 1996).

MATERIAL Y MÉTODOS.

El estudio se realizó con una población estudiantil de la Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria, de la cual se obtuvo una muestra sanguínea de 96 individuos con un promedio de 18 años de edad de los cuales 40 fueron varones y 56 mujeres, siendo estos individuos aparentemente sanos. Las muestras fueron obtenidas los días 3 y 4 de diciembre de 1996 y el 16 de febrero de 1997.

A cada muestra de sangre de 10 μ l, extraída por punción del dedo índice, utilizando una lanceta, se le agregó a 1 ml de medio RPMI- 1640 con heparina y se trasladó al laboratorio. Donde se centrifugó durante 5 seg. a 6000 r. p. m., se

retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión.

Se prepararon laminillas embebiendo las células en agarosa para darles soporte, posteriormente, se colocaron dentro de una solución de lisis la cual tiene una gran cantidad de detergentes y sales para lisar las membranas celulares, después, las laminillas se sumergieron en un amortiguador durante un tiempo denominado de desenrollamiento de las hebras del DNA (*unwinding*), posteriormente se expusieron a una corriente eléctrica. Después se neutralizó con un amortiguador de pH 7.5, al término de lo cual se tiñeron las laminillas con bromuro de etidio, para poder analizarlas al microscopio. El DNA 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 se incrementa con el daño (Singh y cols., 1988).

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

Con respecto a los datos de niveles de ozono estos fueron obtenidos de la RAMA (red automática de monitoreo atmosférico) de la ZMCM.

MÉTODO ESTADÍSTICO.

Se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitman con una $p < 0.05$ para evaluar las diferencias estadísticas del daño al DNA entre los grupos y la

prueba t de Student para ver diferencias entre los valores de los diversos contaminantes.

RESULTADOS.

Al agrupar y comparar los resultados obtenidos en la migración del DNA en μm entre la zona norte (noreste y noroeste) con respecto a la zona sur (sureste y suroeste) no se encontró diferencia significativa, utilizando la prueba estadística. Los valores fueron para la zona norte de $24.85 \mu\text{m}$ y para la zona sur de $27.27 \mu\text{m}$ (tabla y gráfica no. 1).

La tabla y gráfica no. 2 muestra la migración de daño del DNA, comparando la zona norte y sur con respecto al sexo de cada zona y de tal comparación no se observa diferencia significativa, sin embargo las mujeres muestran ligeramente una mayor migración.

Comparando las concentraciones de ozono entre el norte (0.041 ppm) y el sur (0.048 ppm), utilizando la prueba U de Mann-Whitman no existe diferencia significativa (tabla y gráfica no. 3).

La tabla y gráfica no. 4 muestra los resultados obtenidos de la migración del DNA como indicador de daño genético en células sanguíneas de una población de estudiantes clasificados por su zona de residencia. La zona con mayor migración de DNA fue la suroeste con $29.71 \mu\text{m}$, después la zona noroeste

prueba t de Student para ver diferencias entre los valores de los diversos contaminantes.

RESULTADOS.

Al agrupar y comparar los resultados obtenidos en la migración del DNA en μm entre la zona norte (noreste y noroeste) con respecto a la zona sur (sureste y suroeste) no se encontró diferencia significativa, utilizando la prueba estadística. Los valores fueron para la zona norte de $24.85 \mu\text{m}$ y para la zona sur de $27.27 \mu\text{m}$ (tabla y gráfica no. 1).

La tabla y gráfica no. 2 muestra la migración de daño del DNA, comparando la zona norte y sur con respecto al sexo de cada zona y de tal comparación no se observa diferencia significativa, sin embargo las mujeres muestran ligeramente una mayor migración.

Comparando las concentraciones de ozono entre el norte (0.041 ppm) y el sur (0.048 ppm), utilizando la prueba U de Mann-Whitman no existe diferencia significativa (tabla y gráfica no. 3).

La tabla y gráfica no. 4 muestra los resultados obtenidos de la migración del DNA como indicador de daño genético en células sanguíneas de una población de estudiantes clasificados por su zona de residencia. La zona con mayor migración de DNA fue la suroeste con $29.71 \mu\text{m}$, después la zona noroeste

con 24.29 μm , posteriormente la sureste con 22.73 μm y finalmente la noreste con 22.24 μm .

La tabla y gráfica no. 5 nos muestra los valores obtenidos en las diferentes zonas (noreste, noroeste, sureste y suroeste), divididas por sexo, los cuáles no muestran diferencias significativas comparándolos entre sí. Por otro lado al comparar los datos entre Norte y Sur los resultados tampoco muestran alguna diferencia, sin embargo la comparación entre el Este con el Oeste si demuestran diferencia.

La tabla y gráfica no. 6 muestra los valores de concentración de ozono en ppm registrados durante el periodo de muestreo (dic. y feb.) en las diferentes zonas de acuerdo a la distribución realizada por la RAMA (red automática de monitoreo atmosférico), la zona con menor concentración de ozono fue el noreste con 0.034 ppm, le siguió el sureste con 0.042 ppm, después el noroeste con 0.049 ppm y la mayor concentración se registro en el suroeste con 0.052 ppm.

Al aplicar la misma prueba estadística para los valores de concentración de ozono para el Este (0.038 ppm) y el Oeste (0.051 ppm) la diferencia resultó ser significativa (tabla y gráfica no. 7).

La tabla y gráfica no. 8 muestra los resultados de migración del DNA obtenidos de la suma de las zonas noreste y sureste en comparación con las zonas noroeste y suroeste, resultado para el grupo Este de 23.38 μm con una N = 49 y para el grupo Oeste de 29.18 μm con una N= 43 siendo esta diferencia significativa.

La tabla y gráfica no. 9 agrupa a los individuos del Oeste y del Este, separados por diferentes sexos, de los cuales no se observa ninguna diferencia significativa en cuanto a la migración del DNA.

La tabla y gráficas no. 10 nos indica los intervalos de migración en material genético, en μm , de la población estudiada y se divide en poco migración (0 a 20 μm), mediana migración (20 a 40 μm) y demasiada migración (40 a 60 μm); esto se relaciona con el daño al DNA y por lo tanto las muestras que presentan mayor daño el porcentaje más alto lo presentan los de la zona suroeste con 24%, después el noroeste con 17%, le siguió el noreste con el 8% y finalmente el sureste con el 1%, para los valores obtenidos de poco daño, el porcentaje más alto fue para el sureste (45%), después el noreste con 44%, posteriormente fue el suroeste con 28% y por último el noreste con 22%.

En la gráfica no. 11 se observa la correlación entre la concentración de ozono y la migración del DNA, no importando la zona de la ciudad en la que habitan. A cada persona se le asignó el valor de ozono del monitor de la RAMA más cercano a su lugar de residencia y para cada monitor se hizo el promedio de migración, bajo estos parámetros se encontró una alta correlación ($r= 0.91$) entre los valores de ozono y la migración del DNA.

DISCUSIÓN.

La contaminación ambiental siempre ha existido y en parte es inherente a las actividades del hombre, sin embargo, en años recientes se le ha prestado cada

La tabla y gráfica no. 9 agrupa a los individuos del Oeste y del Este, separados por diferentes sexos, de los cuales no se observa ninguna diferencia significativa en cuanto a la migración del DNA.

La tabla y gráficas no. 10 nos indica los intervalos de migración en material genético, en μm , de la población estudiada y se divide en poco migración (0 a 20 μm), mediana migración (20 a 40 μm) y demasiada migración (40 a 60 μm); esto se relaciona con el daño al DNA y por lo tanto las muestras que presentan mayor daño el porcentaje más alto lo presentan los de la zona suroeste con 24%, después el noroeste con 17%, le siguió el noreste con el 8% y finalmente el sureste con el 1%, para los valores obtenidos de poco daño, el porcentaje más alto fue para el sureste (45%), después el noreste con 44%, posteriormente fue el suroeste con 28% y por último el noreste con 22%.

En la gráfica no. 11 se observa la correlación entre la concentración de ozono y la migración del DNA, no importando la zona de la ciudad en la que habitan. A cada persona se le asignó el valor de ozono del monitor de la RAMA más cercano a su lugar de residencia y para cada monitor se hizo el promedio de migración, bajo estos parámetros se encontró una alta correlación ($r= 0.91$) entre los valores de ozono y la migración del DNA.

DISCUSIÓN.

La contaminación ambiental siempre ha existido y en parte es inherente a las actividades del hombre, sin embargo, en años recientes se le ha prestado cada

vez mayor atención ya que han aumentado la frecuencia y gravedad de los incidentes de contaminación en todo el mundo y cada día hay más pruebas de sus efectos adversos sobre el ambiente y la salud (Albert, 1996).

La contaminación ambiental es generada principalmente por la actividad antropogénica, dentro de esta, las industrias aportan cerca del 20 % de la contaminación, mientras que el incremento del uso de automóviles y tecnología dependiente de la quema de combustibles fósiles aporta cerca del 75 % de dicha contaminación, situación que no es extraña en una ciudad como la de México.

La ciudad de México presenta condiciones geográficas únicas que la hacen un campo de estudio muy particular con respecto a la distribución de los contaminantes en diversas zonas de la ciudad, lo que lleva a pensar que los posibles efectos de la contaminación tampoco están distribuidos de manera homogénea en toda la población. A este respecto, en un estudio piloto Valverde y cols., (1997), reportan diferencias en el daño basal de DNA en leucocitos y células epiteliales nasales de adultos jóvenes que residían en la zona sur y norte de la ciudad de México.

El propósito de este trabajo fue el evaluar si estas diferencias en el daño basal en el DNA se repetían incrementando el tamaño de muestra que la estudiada por Valverde, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la migración de DNA observada entre los jóvenes que residían en la zona sur con respecto a los que residían en la zona norte. Así mismo no se observaron

diferencias debidas al sexo en ambas poblaciones aunque son ligeramente altas para el sexo femenino en la zona Este.

Esto se puede explicar al menos de dos diferentes maneras; que los resultados encontrados por Valverde y cols., (1997) no estuvieran relacionados directamente con la contaminación ambiental o bien, que los patrones de contaminación ambiental hubieran cambiado entre las dos tomas de muestra.

Con respecto a la primera posibilidad existen algunos reportes que involucran tanto un efecto sobre la función respiratoria como de efectos genotóxicos debidos a la contaminación, que sugieren un mayor daño en los habitantes de la zona sur de la ciudad (Calderón Garcidueñas y cols., 1996), lo cual nos indicaría que la contaminación ambiental presente en esta zona si está relacionada con los efectos observados en los habitantes del sur de la ciudad.

Por otro lado se sabe que la generación de los contaminantes ambientales es un proceso dinámico y que puede ser alterado por diversas causas, entre ellas; las meteorológicas y las estacionales.

No se encontraron diferencias en la concentración de ozono reportadas por la red automática de monitoreo atmosférico (RAMA) de la ciudad de México, en especial entre los valores de la concentración de ozono a la cual estuvieron expuestos los individuos de este estudio, esto se puede deber a que la toma de muestras de este estudio fue realizada en los meses de diciembre y febrero de 1996 y 1997 respectivamente, temporada en la cual la distribución de contaminantes es más restringida, lo cual podría explicar las diferencias

encontradas entre este estudio y el de Valverde y cols., (1997), que se realizó en el mes de marzo.

Sin embargo cuando se agruparon a los individuos en las cuatro zonas metropolitanas reportadas por la RAMA, se observó un mayor daño, estadísticamente significativo, en las personas que viven en el suroeste de la ciudad con respecto a las personas que habitan en el noreste y el sureste de la ciudad. Con respecto a las personas que habitan en el noroeste, y las personas que habitan en el suroeste, esta últimas presentan un mayor daño en el DNA, pero este no es estadísticamente significativo. Cabe mencionar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de migración del DNA entre mujeres y hombres de cada zona. Los daños encontrados correlacionan con los valores promedio de exposición a ozono en cada zona.

Cuando se analizan los valores de los contaminantes ambientales entre la zona Oeste y la zona Este de la ciudad, se observa que solo los valores de ozono son estadísticamente diferentes entre las dos zonas. La migración del DNA de las personas que habitan en la zona Oeste de la ciudad con respecto a las que habitan la zona Este, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. No se encontraron diferencias debidas al sexo entre las dos zonas.

Otra manera de analizar los resultados de la migración del DNA es la categorización en individuos que mostraron poco daño, daño moderado y personas que presentaron mucho daño en sus células, estas categorías se fijaron con respecto al valor promedio de núcleo de linfocitos sin daño; el valor promedio para esta condición es de 20 μm . De esta manera se clasificó a las personas que

presentaban valores de migración entre 0 y 19 μm como con poco daño, a las personas que presentaban una migración entre 20 y 39 μm se les clasificó como con daño moderado y a las personas que presentaban una migración mayor a 40 μm se les considero como muy dañadas, basándonos en el estudio de Anderson y cols., 1994.

Los resultados del porcentaje de personas para cada categoría dependiendo de la zona en la que habita, siendo las personas que habitan en el suroeste y noroeste las que presentan una frecuencia mayor de células muy dañadas. Este análisis nos permite corroborar que las diferencias observadas utilizando los valores de migración del DNA se deben a que un gran número de células de las personas provenientes de las zonas noroeste y suroeste presentan mayor daño.

Con respecto al valor de la correlación ($r=0.91$), nos sugiere que el daño observado se debe a la acción del ozono y no a otros contaminantes. Esto coincide con la sensibilidad propuesta para el ensayo cometa (Tice 1995; Speit y cols., 1997), en cuanto a la capacidad de detectar rompimientos en el DNA generados por las especies de oxígeno reactivas, mecanismo de acción propuesto para el ozono.

Por otro lado se observa que los resultados no muestran ninguna diferencia significativa con respecto al sexo de los individuos lo cual nos indica que el sexo no es determinante para tener una mayor o menor susceptibilidad a los contaminantes atmosféricos, en particular al ozono.

CONCLUSIONES.

No se encontraron diferencias en la migración de daño de material genético entre la zona Norte y Sur de la ciudad de México, sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre los habitantes del Este y el Oeste, lo cual correlaciona con la concentración de ozono en esta zona.

Los mayores intervalos de porcentaje de daño lo presentan los individuos de la zona suroeste.

La técnica de la electroforesis de células individuales fue una herramienta adecuada y sensible para detectar la migración del DNA en las células sanguíneas estudiadas.

Si bien estos resultados nos sugieren que el ozono es el causante de los daños observados y no otros contaminantes, es necesario continuar estos estudios utilizando medidores de los contaminantes personalizados, los cuales nos ayudarán a conocer la concentración a la que esta expuesta cada persona.

Estos resultados, nos indican que la exposición prolongada a este contaminante podría ser un riesgo para desarrollar algunas enfermedades, entre ellas, enfisema pulmonar, cáncer, etc.

REFERENCIAS.

- Albert, A. L. (1996): **Introducción a la Toxicología Ambiental**. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México.
- Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B. J. y Schmezer, P. (1994): The effect of varios antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. **Mutation Res.**, 307: 261-271.
- ATSDR (1989): **Toxicological Profile for Arsenic**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U.S. Public Health Service, Oak Ridge National Laboratory, USA.
- Avol, E.L., Lin, W. S., Venet, T. G., Shamoo, D. A., y Hackney, J. D. (1989): Comparative respiratory effects of ozone and ambient oxidant pollution exposure during heavy exercise. **J. Air Pollut.**, 34: 804 - 809.
- Bravo, A. H., Roy-Ocotla, R.G., Sánchez, A.P. y Torres, J.R. (1992): La contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la cd. de México, en: **La contaminación atmosférica en México, sus causas y efecto en la salud**. Comisión Nacional de Derechos Humanos. México.

- Burns, L.A. y Munson, A. E. (1993): Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD 25 (IL - 2R/p 55), **J. Pharmacol Exp. Therapeutics**, 225: 178-186.
- Calderón-Garcidueñas, L., Osorno-Velazquez, A., Bravo-Alvarez, H., Delgado-Chávez, y Barrios-Marquez, R. (1992): Histopathological changes of the nasal mucosa in south west Metropolitan Mexico City inhabitants. **American Journ. of Pathol.**, 40: 225-232.
- Calderón-Garcidueñas, L., Onnaya-Brisuela, N., Ramírez -Martínez, L. y Villarreal, Calderón, A. (1996): DNA strand breaks in human nasal respiratory Epithelium are induced upon exposure to urban pollution. **Enviromental Health Perspectives**, 104: 160-162.
- Castillejos, M., Gold, D. R., Dockery, Tosteson, T., Baum, T. y Speizer, F. E. (1992): Effects of ambient ozone on respiratory function and symptoms in Mexico City schoolchildren. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 145: 276- 282.
- Charan, N. B. y Myers, C.G. (1979): Pulmonary injuries associated with acute sulfur dioxide inhalation. **Amer. Respir. Dis.**, 119: 555-560.

- Doull, J. (1980): Factors influencing toxicology, en: Cassaret and Doull's **Toxicology: The basic science of Poisons**, Doull, J., Klaassen, C. D. and Ambur, M. O. Eds., New York, 2: 70-83.

- Elinder, C. G., Gerhadsson, L. y Oberdoerster, G. (1987): Biological monitoring of toxic metals, en: **Biological monitoring of Toxic Metals**. T. W. Clarkson, L. Fiberg, G. F. Nordberg y P. R. Sager (Eds.), Plenum Press, New York. pp 1-71.

- EPA (1991): Nacional air quality and emissions trends report 1990. U. S. Environmental Protection Agency. epa. 450- 4 - 91- 023.

- Fortoul, T. I., Lambert, W., Bliss, M., Bravo, H., Sánchez, P., López, I., Sánchez, I., Villa del Mar, L., Rivero, O. y Samert, J. (1995): Acute changes in lung function associated with daily ozone exposures of children attending a day camp in Mexico City. **Am. J. of Resp. and Critical Care Med.**, 151:489 - 496.

- Fortoul, T. Y., Lambert, W.E., Samet, J.M., Oláiz, F.G., López, M. Y., Sánchez, C. Y., Doyer, M., Villadelmar, R.L., Bliss, M. S., Moncada, H. S., Montaña, B., Navaarro, D., Bravo, A. H., Sánchez, A. P. y Rivero, S. O. (1996): Efectos del ozono en niños habitantes de la Ciudad de México, en **Riesgos ambientales para la salud en la ciudad de México**. Rivero y Ponciano. PUMA.

- Galea, M. (1964): Fatal sulfur dioxide inhalation. **Can. Med. Assoc.**, 91: 345-347.
- Gibaldi, M. y Perrier, D. (1982): **Pharmacokinetics**. 2 de., Marcel Dekker, New York. 459 pp.
- Gonsebatt, M. E., Vega, L., Herrera, L. A., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M. E. y Ostrosky-Wegman, P. (1992): Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. **Mutation Res.**, 283: 91-95.
- Gonsebatt, B. M. (1994). **Marcadores biológicos de exposición a arsénico inorgánico**. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 67 pp.
- Guerra, L. M. (1995). **El aire nuestro de cada día**. Ed. Diana, México. 146 pp.
- Harden, D. G. (1990): The molecular basis for unherited susceptibility to and action of carcinogens, en : **Basic Science in Toxicology**, G. N. Volans, J. Sims, F. M. Sullivan y P. Turner (Eds). Taylor an Francis, London, New York, Philadelphia. pp 7-21.
- Hilborn, J y Still M. (1990), Canadian perspectives on air pollution,

- IARC (1992): Mechanisms of carcinogenesis in risk identification, Vainio, H. MaGee, P. , McGregor, D. McMichael, A. J. (Eds.) International Agency for Resarch on Cancer, Lyon, France.
- Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente (ISGMEEPA) (1992): México. Comisión Nacional de Ecología. 255 pp.
- Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente (ISGMEEPA) (1994). México. Secretaria de Desarrollo Social. Instituto Nacional de Ecología. pp 203 -233.
- Klassen, C. D. y Eaton, D. D. (1991): Principles of Toxicology, en: Casarett and Doull's Toxicology. **The basic sicence of Poisons**, M. O. Amdour, J. Doull y C. D. Klassen (Eds.). Pergamon Press, 4ta edición. New York,. pp 12-49.
- Koenig, J. Q., Covert, D. S., Marshall, S. G. et al. (1987): The effects of ozone and nitrogen dioxide on pulmonary funtion in asthmatic adolescents. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 136: 152-157.
- Landis, W. y Yu, M. H. (1995): **Introduction to Enviromental Toxicology**. Impacts of Chemical open Ecological Systems. Lewis Publishers. London, pp 135- 159.

- Lippmann, M. (1992): Ozone. en (Lippmann M., ed.) **Enviromental Toxicants**. Human exposures and their health effects. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 465-519.
- Lypsett, M. (1992): Oxides of Nitrogen and Sulfur in Hazardous Materials Toxicology, en: **Clinical Principles of Enviromental Health**. Williams and Wilkins Baltimore. USA, pp 963 - 967.
- Mc Connell, R., (1995): Intoxicación por plomo: de la detección a la prevención primaria. **Salud Pública de México**, Vol.37 3: 263- 275.
- Mc. Donnell, W. F., Chapman, R. S., Leogh, M. N. , et al (1985): Respiratory responses of vigorous exercising children to 0.12 ppm. ozone exposure. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 132: 875- 879.
- Menéndez, G. F. (1993). Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México. México.
- Moeller, D. W. (1992): **Enviromental Health**. London. Harvard University Press, 1-32 pp.

- Mugica, A. V. y Figueroa, L. J. (1996): **Contaminación Ambiental. causas y control.** Universidad Autónoma Metropolitana. México. 367 pp.
- Namihira, D., Strobe, G.L., Helms, R.W., Bojalil, B.M. y Fernández, F. al. (1986): A study of respirometry in children from Mexico City. **Pediatr. Pulmonol.**, 2: 337-343.
- NIEHS (National Institute for Environmental Health) Task Force 3 (1985): **Biochemical and Cellular Marks of Chemical Exposure and Preclinical Indicators of Disease**, Washington, D.C., U.S. Department of Health and Human Services.
- NRC (1989): National Research Council. Biological Marks, en **Reproductive Toxicology**, Commission on Life Sciences. National Academic Press. Washington, D. C. pp 15-29.
- NRC (1992): National Research Council. **Board on Environmental Studies and Toxicology. Markers in Immunology**, National Academic Press. Washington, D. C., pp 68-71.
- Omenn, G.S. (1986): Susceptibility to occupational and environmental exposure to chemicals, **Prog. Clin. Biol. Res.**, 214: 527- 545.

- OMS / OPS. (1982): Criterios de Salud Ambiental 8. Óxidos de azufre y partículas en suspensión, Publicación Científica. no. 424. OPS.
- OMS (1992): **El impacto del automóvil sobre el Medio Ambiente.** Organización Mundial de la Salud. Green Peace, Chile. 59 pp.
- Ostrosky - Wegman, P., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García Vargas, G. del Razo, L. M. y Cebrián, M. (1991): Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. **Mutation Res.**, 250: 477 - 482.
- Ostrosky - Wegman, P. y Gonsebatt, M. E. (1996): Environmental toxicants in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, 104: 3: 599-602.
- Rivero, O., Ponciano, G. y Fortoul, T. (1993): **Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria.** Biblioteca de la Salud. México, F. C. E. pp 139-147.
- Rojas. E., Valverde, M., Sordo, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1996): DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Res.**, 370: 115-120.

- Rojas, E., Valverde, M., Herrera, L. A., Altamirano, L. M. y Ostrosky-Wegman, P. (1996): A genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. **Mutation Res.**, 359: 77-84.
- Seger y Welch. (1992): Carbon Monoxide in Hazardous Materials Toxicology, en **Clinical Principles of Environmental Health**. Williams and Wilkins. Baltimore USA, pp 1161- 1163.
- Seinfeld., J. H. (1978): **Contaminación Atmosférica**. Fundamentos físicos y químicos, Madrid.
- Seinfeld, J.H. (1988): Urban Air Pollution. State of the Science. **Science**, 243: 745-752.
- Singh, P. N., Mc.Coy, T. M., Tice, R. R. y Schneider, L E. (1988): A simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, 175: 184- 191.
- Speit, G. y Helbig, R. (1997): DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studiend with the comet assay. **Mutation Research**, 377: 279-86.
- Suárez, B. G. (1991): Análisis de la calidad atmosférica en la ciudad de México, en: **Información Científica y Tecnológica**. México, vol. 13, 173: 36-40.

- Tice, R. R. (1995): The single cell gel / comet assay: a microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, en **Environmental Mutagenesis**. D. H. Phillips and S. Venitt Eds., Bios Scientific Publishers, Oxford. pp. 315-340.
- Tyler, W. S., Tyler, N. K., y Lost, J. A. (1988): Comparison of daily and seasonal exposures of young monkeys to ozone. **Toxicology**, 50: 131-44.
- Valverde, R. M. (1995): **Estudio de una población expuesta a hidroarsenicismo crónico por medio de la técnica de electroforesis de células individuales (SCGE)**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 34 pp.
- Valverde, M., López, M. C., López, I., Sánchez, I., Fortoul, T. I., Ostrosky-Wegman, P. y Rojas, E. (1997): DNA Damage in Leukocytes and Buccal and Nasal Epithelial Cells of Individuals Exposed to Air Pollution in Mexico city. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 30:147-152.
- WHO (1987): Air quality guidelines for Europe. WHO. Regional publications. European Series, No. 23. WHO Copenhagen 315- 326 pp.

- WHO (1992): Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. Report of the final task group meeting Ginebra.

- Wild, C. P. (1990): Antibodies to DNA alkylation as analytical tools in chemical carcinogenesis. **Mutation Res.**, 233: 219-233.

- Young, W. A., Shaw D. B. y Bates, D. V. (1964): Effects of low concentrations of ozone on pulmonary function in man. **J. Appl. Physiol.**, 19 (4): 765-768.

TABLAS.

TABLA NO. 1 MIGRACIÓN DEL DNA ENTRE LA ZONA NORTE Y SUR				
ZONA	MEDIA (μm)	DESV. EST.	ERROR EST.	Nº DATOS
NORTE	24.85	11.41	1.70	45
SUR	27.27	12.76	1.86	47

TABLA NO. 2 MIGRACIÓN DEL DNA ENTRE ZONA NORTE Y SUR POR SEXOS				
	ZONA	MEDIA (μm)	DESV. EST.	Nº DATOS
MASCULINO	NORTE	24.38	12.3	18
	SUR	26.34	11.9	20
FEMENINO	NORTE	25.16	11.23	26
	SUR	28.12	13.3	25

TABLA NO. 3 VALORES DE OZONO EN ppm ENTRE ZONA NORTE - SUR		
	NORTE	SUR
	0.057	0.041
	0.04	0.042
	0.036	0.057
	0.031	0.048
		0.064
		0.06
		0.036
		0.048
		0.041
PROMEDIO	0.041	0.049
DESV. EST.	0.011	0.010
NO. DATOS	N = 4	N = 9

TABLA NO. 4				
MIGRACIÓN DE DNA EN MICRAS (μm) POR ZONAS				
	NORESTE	NOROESTE	SURESTE	SUROESTE
	7.6	23.2	17.0	12.0
	11.6	28.6	7.0	19.0
	10.8	33.2	17.8	42.4
	22.6	23.2	24.6	43.8
	16.0	16.4	31.2	40.0
	15.8	10.6	13.0	23.4
	17.2	26.8	17.4	22.2
	10.8	24.0	40.0	45.2
	20.8	22.0	34.2	16.0
	22.6	25.0	10.8	37.6
	27.6	26.6	27.6	24.2
	27.6	18.2	35.4	39.6
	33.8	47.0	36.4	18.8
	14.4	15.6	13.6	23.2
	37.4	46.0	33.6	17.8
	7.4	22.2	18.8	16.4
	30.2	28.6	19.2	34.0
	50.0	54.6	29.6	69.6
	31.0		20.6	38.8
	50.2		10.6	10.2
	25.6		41.6	28.2
	18.0		19.0	36.8
	14.6			34.0
	19.6			49.6
	23.6			20.2
	33.6			
	26.4			
PROMEDIO	23.21	27.32	23.59	30.52
DES. EST.	11.28	11.48	10.30	13.99
No. DATOS	27	18	22	25

TABLA NO. 5										
MIGRACIÓN DEL DNA EN μm POR ZONAS Y SEXO										
NORESTE			NOROESTE			SURESTE			SUROESTE	
MASCULINO	FEMENINO		MASCULINO	FEMENINO		MASCULINO	FEMENINO		MASCULINO	FEMENINO
7.6	10.8		28.6	23.2		17.0	7.0		49.6	10.2
11.6	22.6		33.2	10.6		17.8	31.2		42.4	28.2
17.2	16.0		23.6	26.8		24.6	35.4		43.8	36.8
20.8	15.8		16.4	24.0		13.0	36.4		23.4	34.0
27.6	10.8		18.2	22.0		17.4	33.6		22.2	20.2
14.4	22.6		47.0	25.0		40.0	18.8		16.0	12.0
37.4	27.6			26.6		34.2	29.6		37.6	19.0
7.4	33.8			15.6		10.8	20.6		17.8	40.0
50.0	30.2			46.0		27.6	19.0		38.8	45.2
18.0	31.0			22.2		13.6			24.2	24.2
33.6	50.2			28.6		19.2			39.6	39.6
26.4	14.6			54.6					18.8	18.8
	19.6								23.2	23.2
	23.6								16.4	16.4
									34.0	34.0
									69.6	69.6
PROMEDIO	22.67	23.83	27.83	27.10		21.38	25.73		32.40	29.46
DESV. EST.	12.89	10.64	11.30	12.06		9.25	9.90		12.55	15.04
Nº DATOS	12	14	6	12		11	9		9	16

TABLA NO. 6				
VALORES DE OZONO				
EN ppm POR ZONAS				
	PROMEDIO	DESV. EST.	ERROR EST.	NO. DATOS
NOROESTE	0.049	0.012	0.0085	2
NORESTE	0.034	0.004	0.0003	2
SUROESTE	0.052	0.010	0.0030	6
SURESTE	0.042	0.006	0.0003	3

TABLA NO. 7		
VALORES DE OZONO		
EN ppm ENTRE ESTE - OESTE		
	OESTE	ESTE
	0.057	0.036
	0.04	0.031
	0.041	0.036
	0.042	0.048
	0.057	0.041
	0.048	
	0.064	
	0.06	
PROMEDIO	0.051	0.038
DESV. EST.	0.010	0.006
NO. DATOS	8	5

TABLA NO. 8				
MIGRACIÓN DEL DNA ENTRE ZONAS ESTE Y OESTE				
ZONA	MEDIA (μm)	DESV. EST.	ERROR EST.	Nº DATOS
ESTE	23.38	10.74	1.53	49
OESTE	29.18	12.95	1.97	43

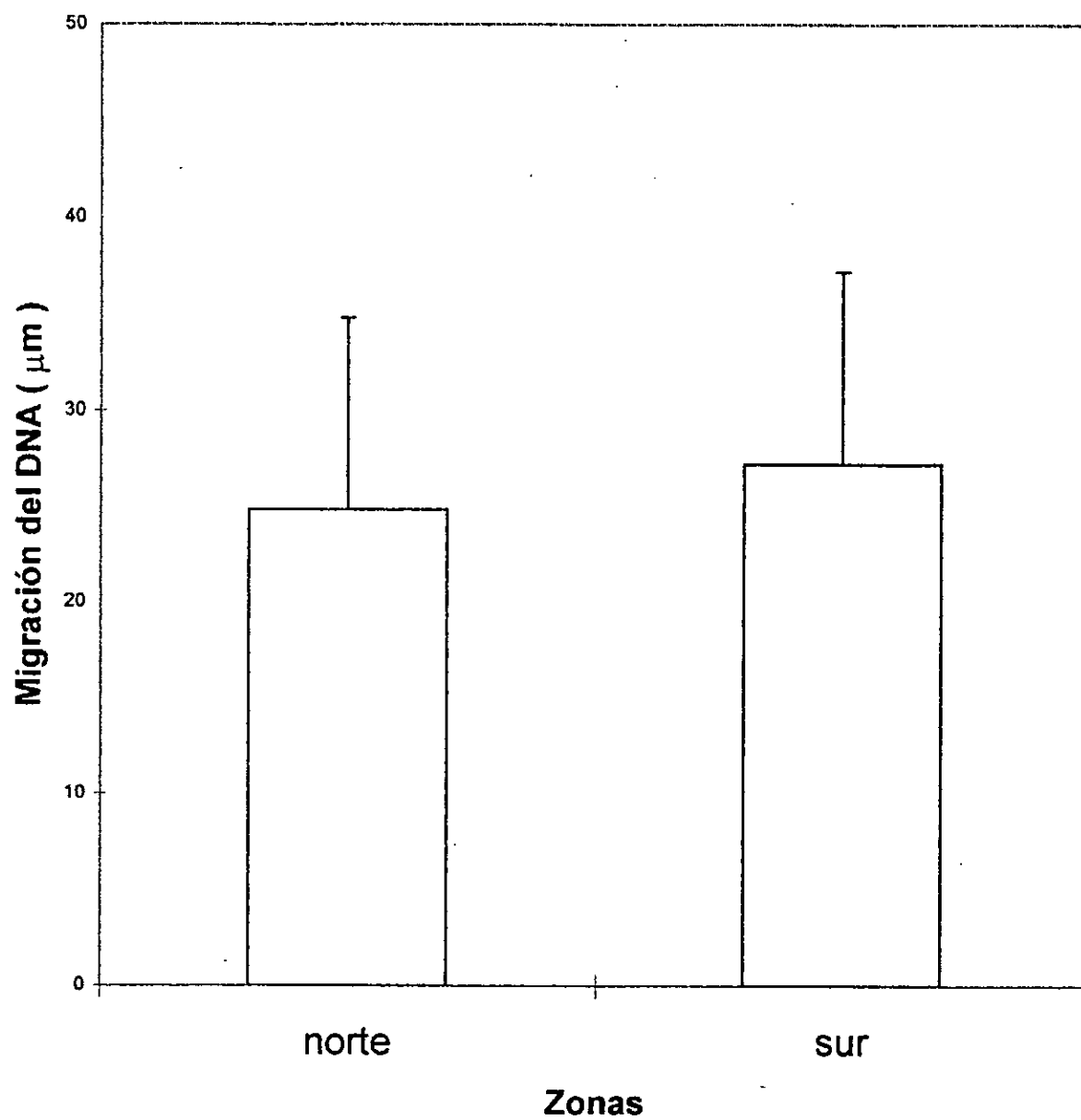
TABLA NO. 9				
MIGRACIÓN ENTRE ZONA ESTE Y OESTE POR SEXO				
MASCULINO	ZONA	MEDIA ($\mu\mu$)	DESV. EST.	Nº DATOS
	OESTE	30.54	11.85	15
	ESTE	22.05	11.06	23
FEMENINO	ZONA	MEDIA ($\mu\mu$)	DESV. EST.	Nº DATOS
	OESTE	28.45	13.64	28
	ESTE	24.38	10.18	23

TABLA NO. 10			
INTERVALOS DE MIGRACIÓN DEL DNA ($\mu\mu$)			
COMO INDICADOR DE DAÑO GENÉTICO			
	0-20	20-40	40-60
ZONA	POCO	MEDIANO	DAÑADO
Noreste	12 (44%)	13 (48%)	2 (8%)
Noroeste	4 (22%)	11 (61%)	3 (17%)
Sureste	10 (45%)	12 (54%)	2 (1%)
Suroeste	7 (28%)	12 (48%)	6 (24%)

GRÁFICAS.

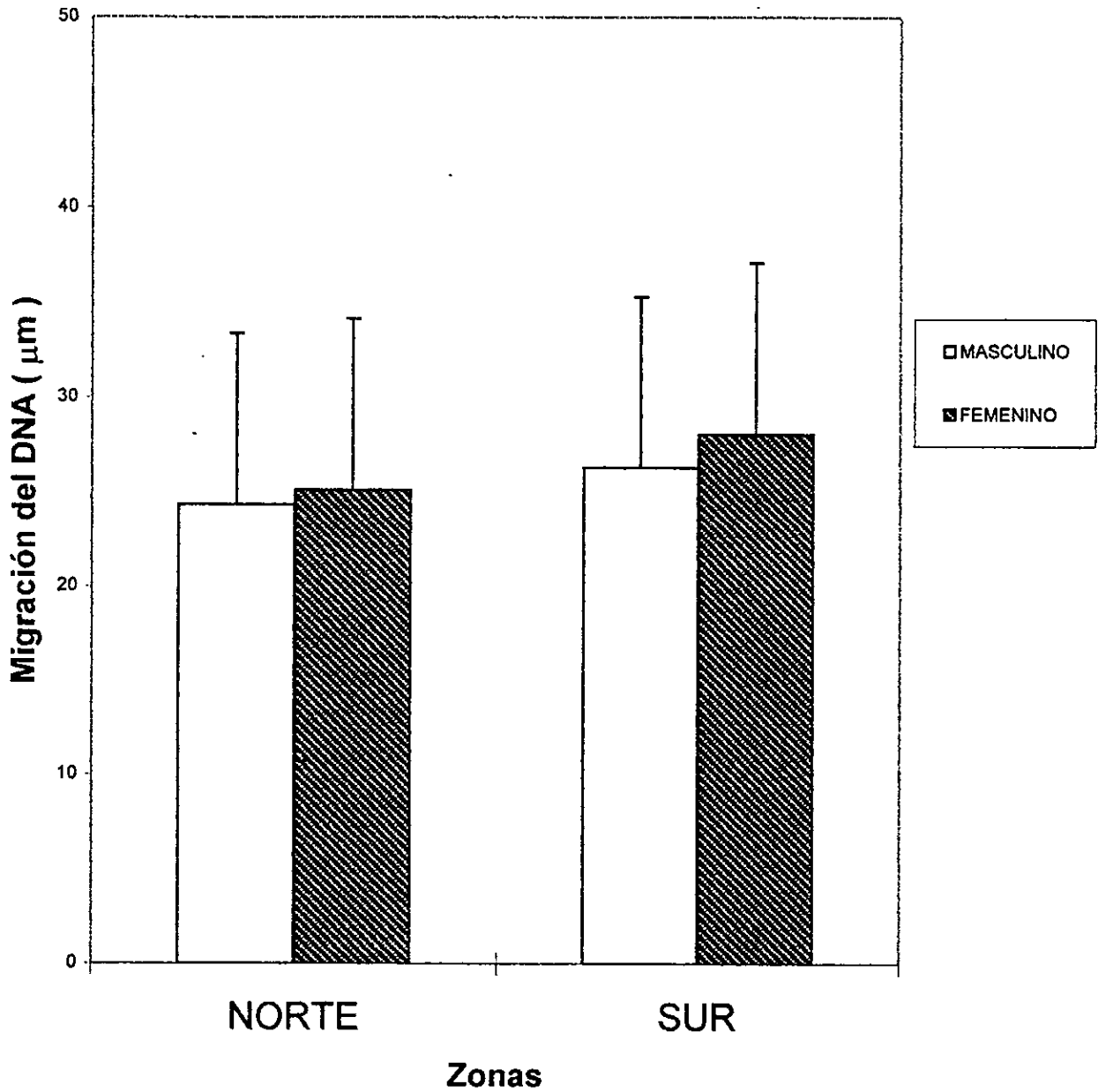
GRÁFICA 1

MIGRACIÓN DE DAÑO DEL DNA POR ZONAS



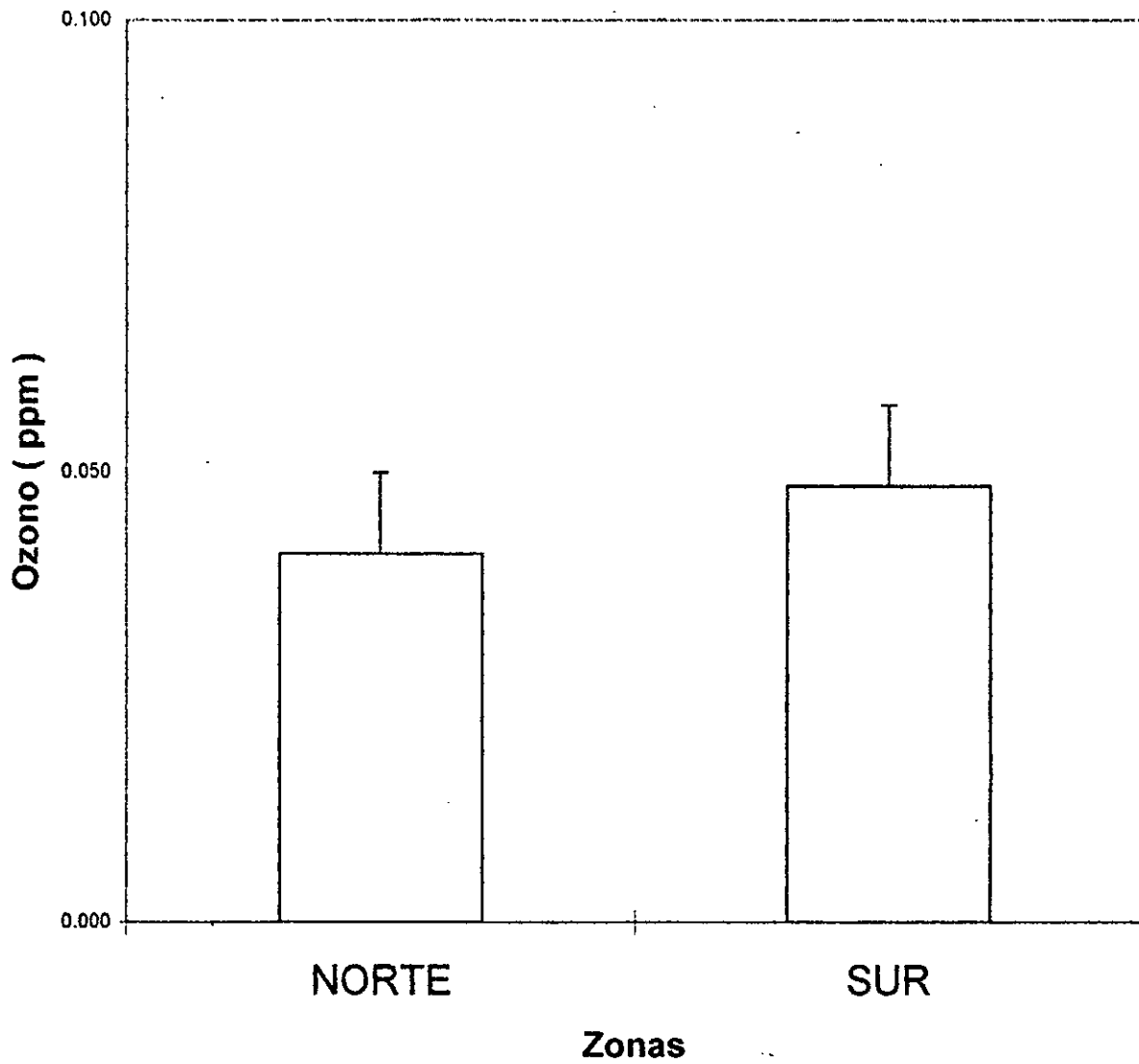
GRÁFICA 2

MIGRACIÓN DEL DNA ENTRE ZONA NORTE Y SUR POR SEXO



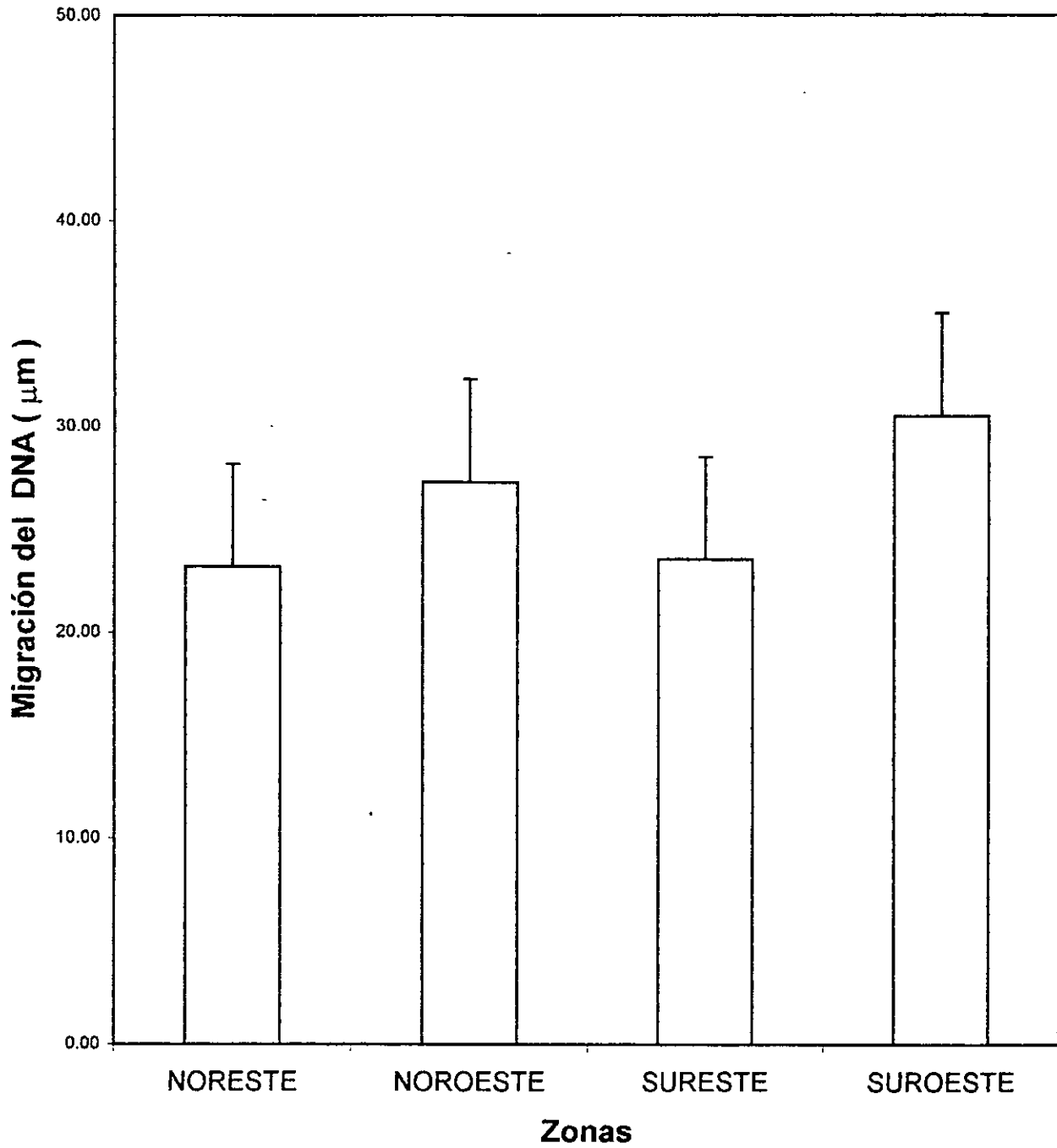
GRÁFICA 3

VALORES DE OZONO EN ppm ENTRE LAS ZONAS NORTE - SUR



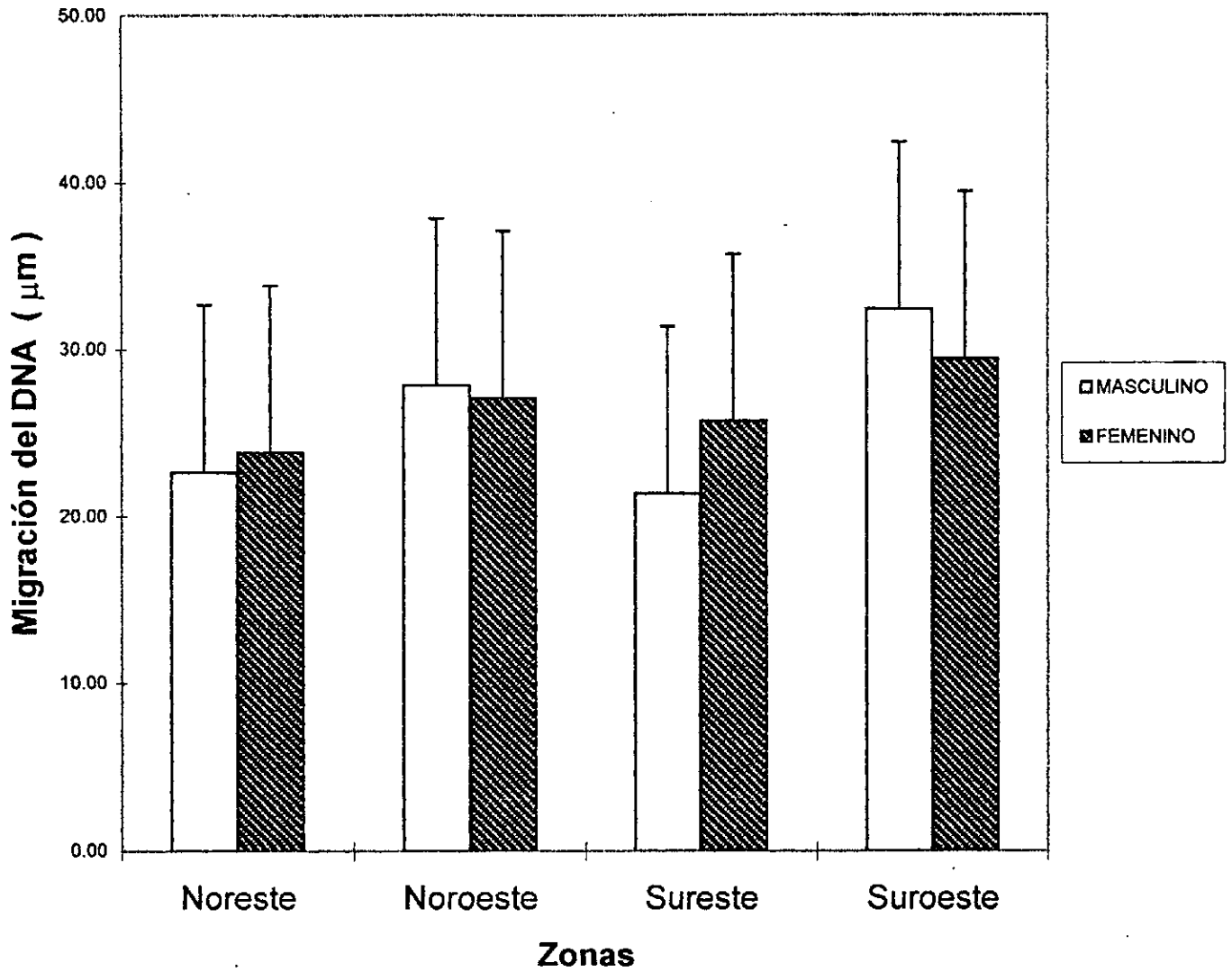
GRÁFICA 4

MIGRACIÓN DEL DNA EN μm POR ZONAS



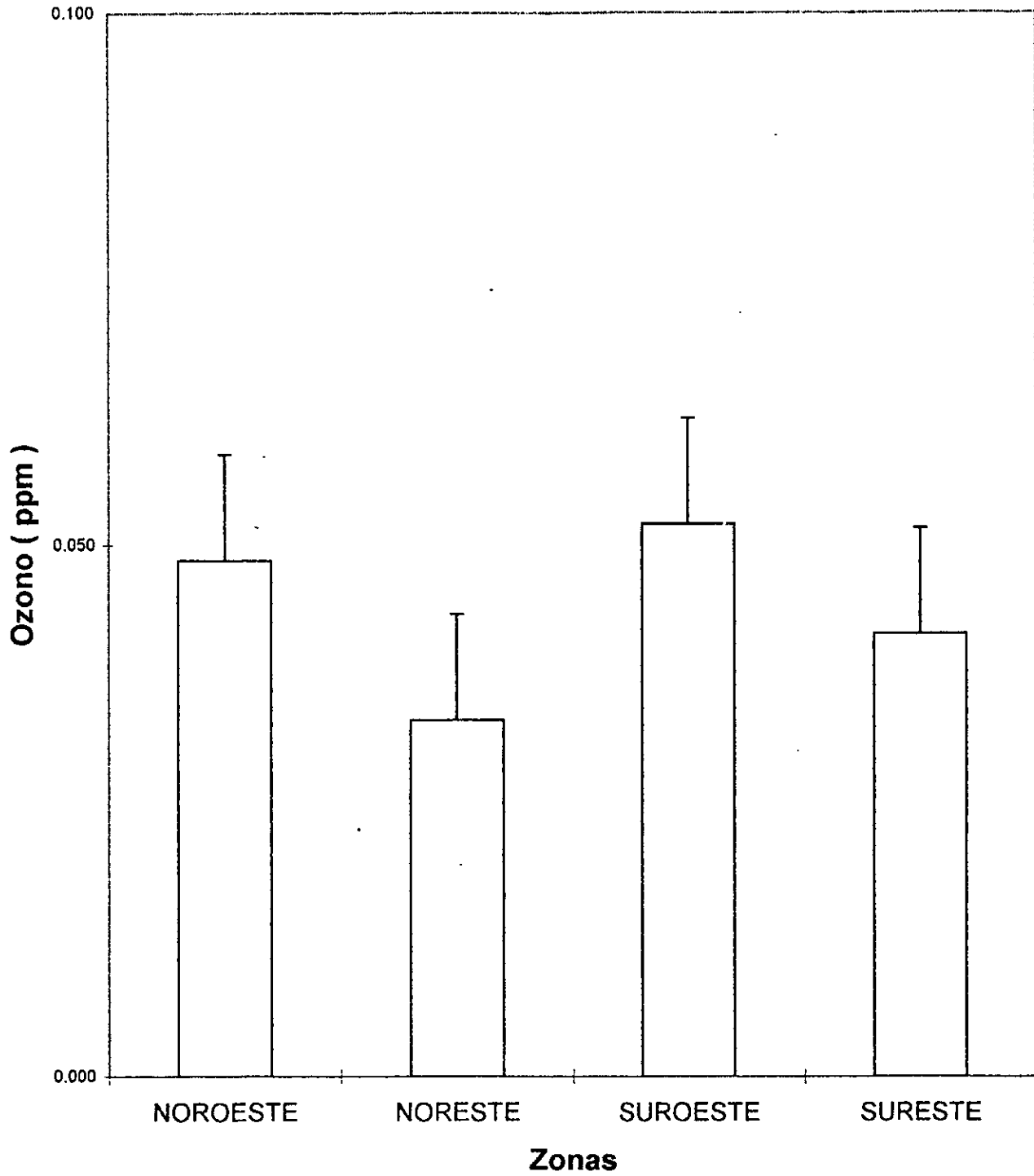
GRÁFICA 5

MIGRACIÓN DEL DNA POR ZONAS Y SEXO



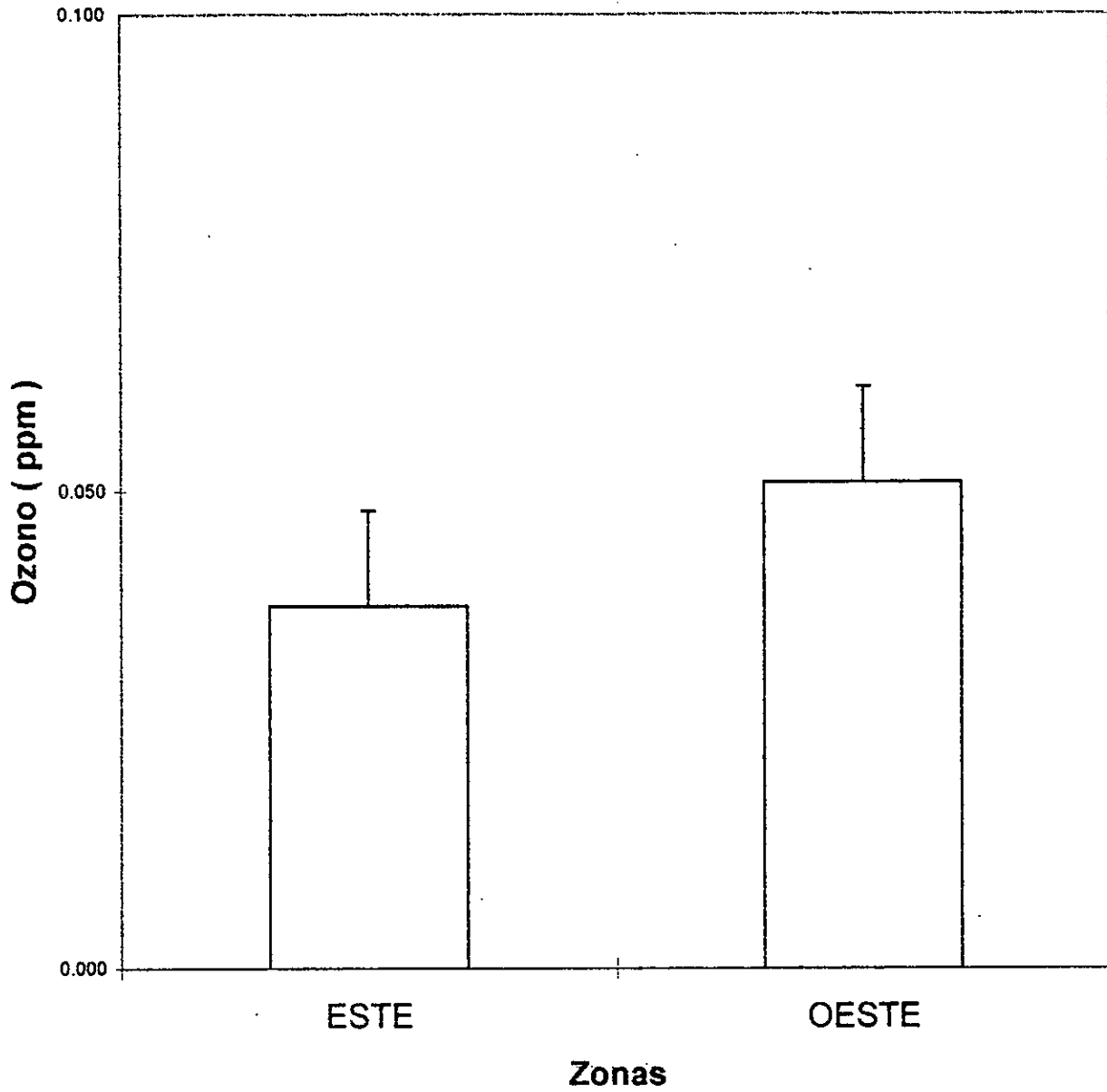
GRÁFICA 6

VALORES EN ppm DE OZONO POR ZONAS



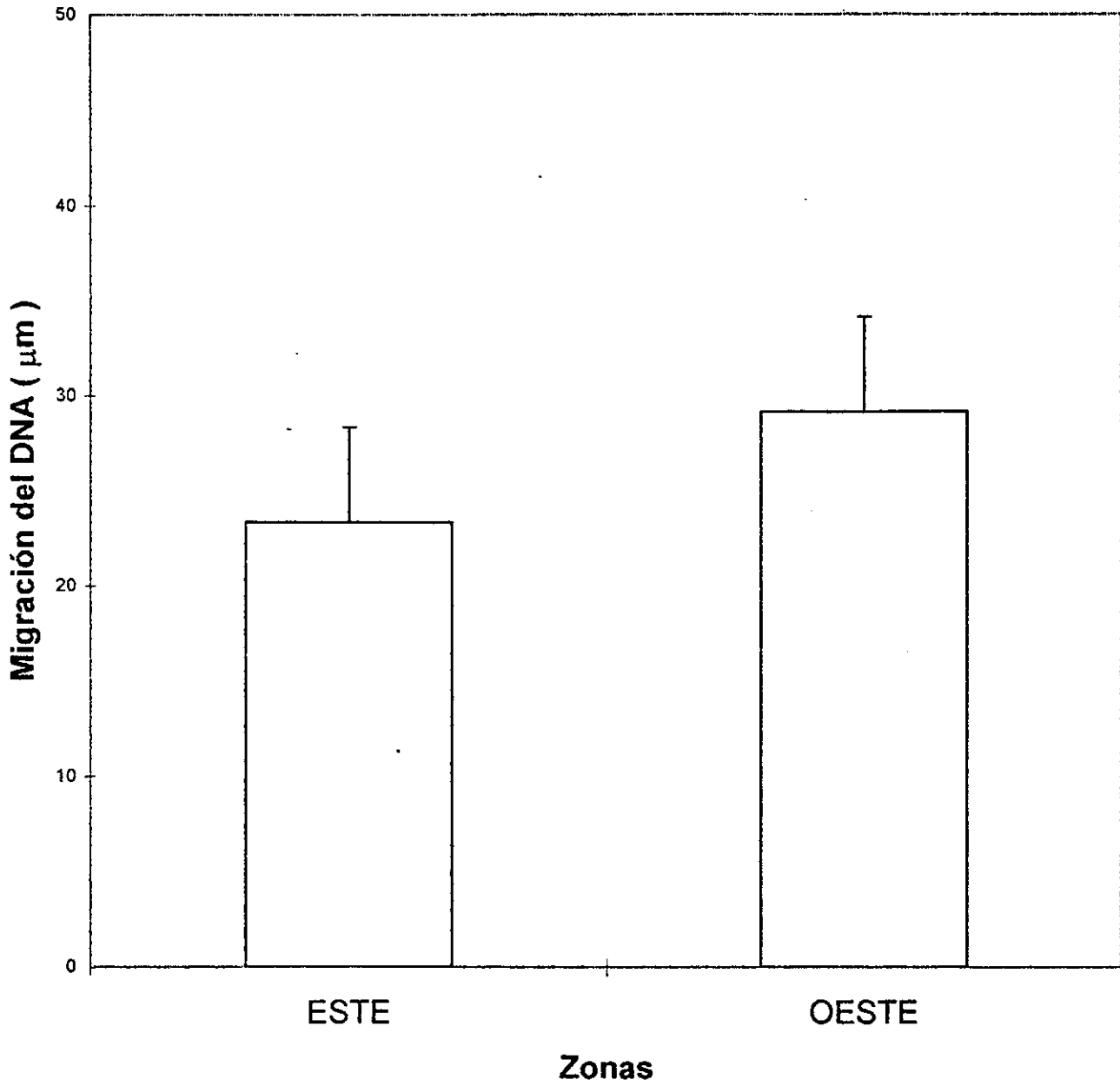
GRÁFICA 7

VALORES DE OZONO EN ppm ENTRE ESTE Y OESTE



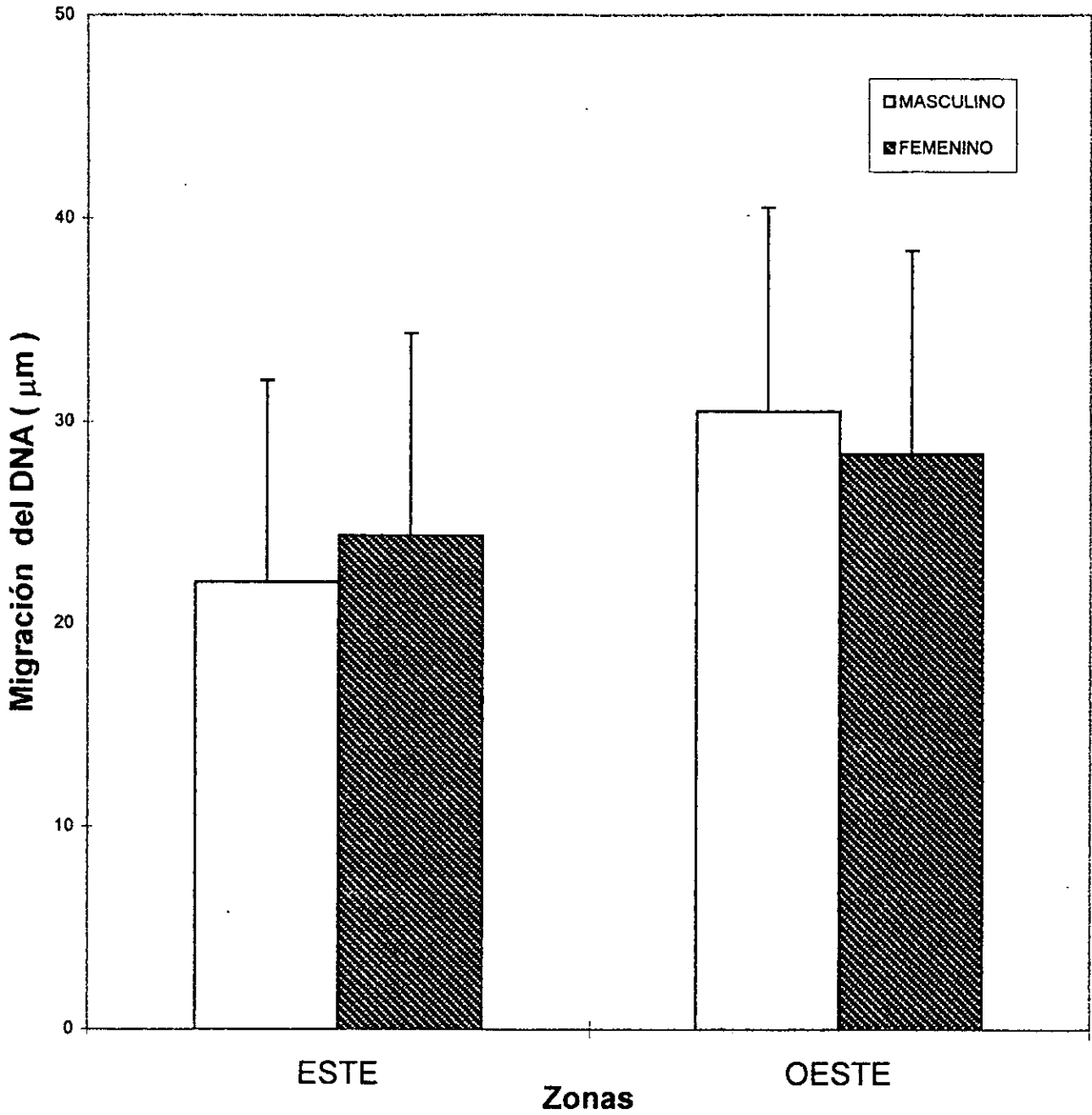
GRÁFICA 8

MIGRACIÓN DEL DNA ENTRE ZONAS ESTE Y OESTE



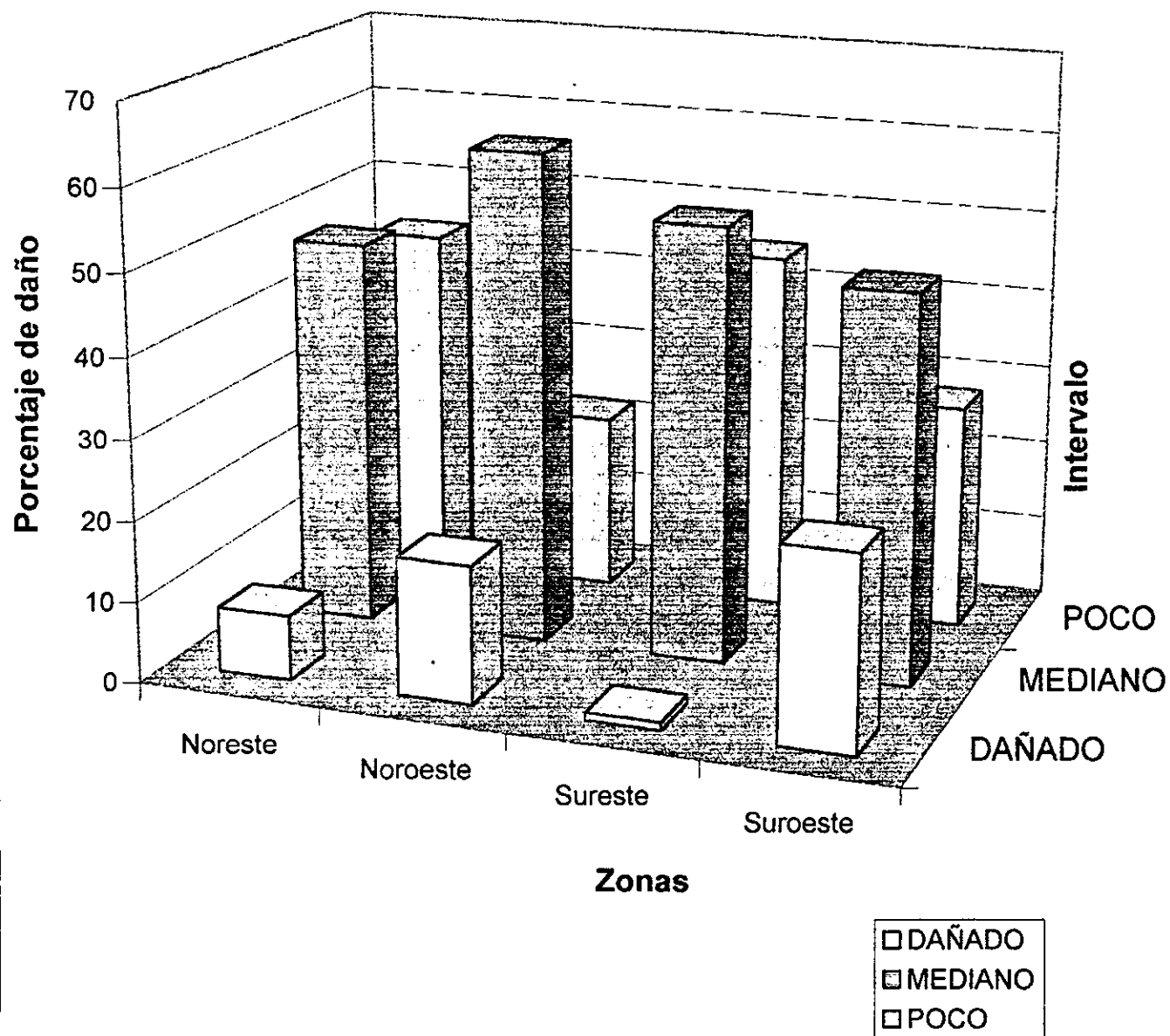
GRÁFICA 9

MIGRACIÓN DEL DNA ENTRE ZONA ESTE Y OESTE POR SEXO



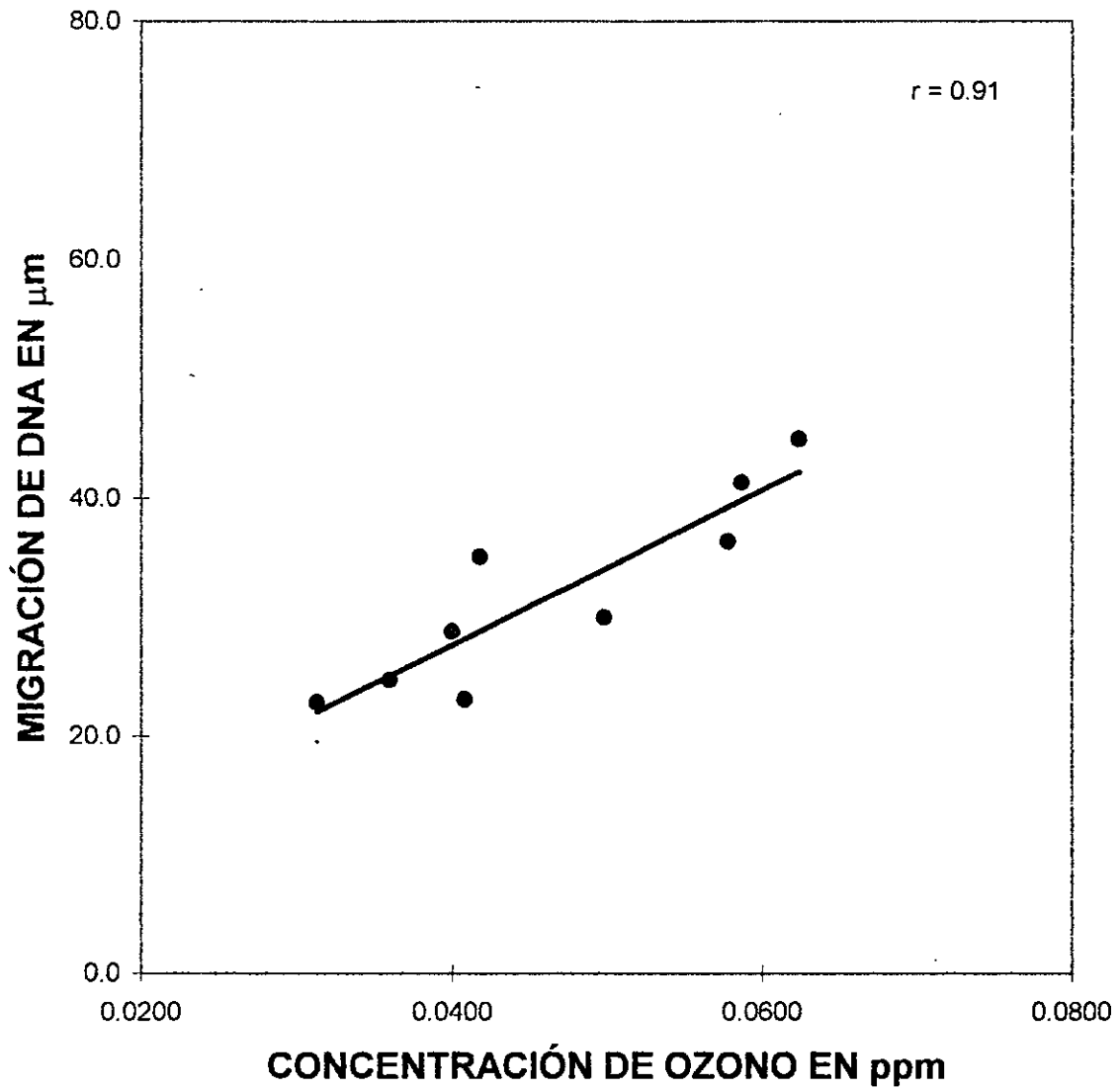
GRÁFICA 10

INTERVALOS DE MIGRACIÓN POR ZONAS



GRÁFICA 11

CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE OZONO Y LA MIGRACIÓN DEL DNA EN LEUCOCITOS



APÉNDICE A.

I. SOLUCIONES.

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

1. - Solución de lisis "stock".

Ingredientes para preparar 1 litro.

NaCl	2.5 M	146.1 g
Na ₂ 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 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 electroforesis.

Soluciones "stocks"

a)NaOH 10N (200 g / 500 ml dH₂ O)

b)Na₂ EDTA 200 mM (14.89 g / 200 ml dH₂O pH 10)

Para preparar 1 litro de amortiguador, agregar en fresco 30 ml de NaOH 10 N y 5 ml de Na₂ EDTA 200 mM.

4.- Amortiguador de neutralización.

Ingredientes para un 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" 10 X - _____ 10mg/ 50 ml dH₂ O

Guardar a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Bromuro de etidio 1X _____ 1 ml "stock" 10X / 9 ml dH₂ O

II.-PREPARACION DE LAMINILLAS.

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

Agarosa de bajo punto de fusión 125 mg/ 25 ml dH₂ O.

Disolver calentando en el horno de microondas durante 20 segundos y mantenerla en baño María a 37° C.

2.- Preparación de agarosa regular al 0.5 %.

Agarosa regular 125 mg /25 ml dH₂ O.

Disolver calentando en horno de microondas durante 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

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

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 siguientes pasos 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, orientado 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 amperes (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 de la laminilla el exceso de amortiguador de neutralización y teñirla adicionando 50 μ 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.- OBSERVACION DE LAMINILLAS.

1.- Secar 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 de cada laminilla la longitud de 25 núcleos (cometas).