



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

GENOTOXICIDAD DEL PLOMO: ALTERACIONES EN LOS
MECANISMOS DE REPARACION DEL ADN EN PERSONAS
OCUPACIONALMENTE EXPUESTAS (POE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GARCIA GARCIA JORGE DONATO



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

0350256



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reoapcional.

NOMBRE: Jorge Donato García

FECHA: 23/nov/2005

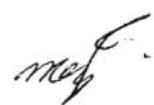
FIRMA: P.A. Lourdes Ramos F.

Jurado asignado:

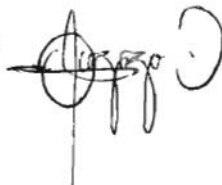
PRESIDENTE	PROF. MARISOL LOPEZ LOPEZ
VOCAL	PROF. HOMERO HERNANDEZ MONTES
SECRETARIO	PROF. MAHARA ANGELICA VALVERDE RAMIREZ
1er SUPLENTE	PROF. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ
2do SUPLENTE	PROF. MA. BENITA LEONOR FERNANDEZ SALGADO

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.


Asesora del tema: Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

Sustentante: Jorge Donato García García



Agradecimientos:

Indudablemente debo agradecer, en primera instancia *a mis padres* (Donato García y Lidia García), ya que sin su ayuda incondicional hubiera sido imposible haber obtenido los logros que hasta el día de hoy he cumplido como estudiante y, más aún, como ser humano. Los respeto y admiro.

Papá: Muchas gracias por impulsarme a vencer mis miedos y mis temores. Gracias a ti nunca más he esquivado mis problemas. Gracias a ti siempre he tenido el deseo de estudiar y de comprender lo fundamental de las cosas, nunca creer lo que los demás dicen, siempre comprobar lo que veo, lo que escucho, lo que siento. Gracias a ti siempre me exijo más a mi mismo, por que tú me has enseñado a nunca quedarme en los límites de mis logros, aunque yo sé que tú siempre estarás feliz con lo poco que logre durante mi vida. Te quiero mucho pa'.

Mamita: Tú eres la mujer más sorprendente que he conocido. No necesitas tener ningún tipo de estudios para irradiar conocimiento, desgraciadamente la vida no te puso en una situación cómoda para estudiar, si lo hubiera hecho, tú serías la más grande científica de México. Gracias a ti he formado mi carácter, el cual muchas veces me ha traído problemas, sin embargo, en su mayoría, me ha rodeado de personas que valen mucho como seres humanos. Agradezco tu apoyo en los días más difíciles de mi carrera, por preocuparte en levantarme a diario y por darme un alimento antes de salir de casa. Te quiero ma'.

A mis hermanitos:

Paxtli-naxtli (Ana Patricia): Contigo he tenido mis discusiones más aferradas, sin embargo, a la vez las más enriquecedoras. Agradezco las críticas que siempre me haces, así como tus sugerencias. Tu y yo hemos forjado nuestra vida empíricamente, muchas alegrías, muchas tristezas, sin embargo creo que nos queda la satisfacción de que hemos triunfado, siendo sinceros, creo que tu haz conseguido logros mucho más importantes que yo, te quiero mucho y te admiro. Muchas gracias por tu ejemplo.

Huahuantlazotla (Laura Elena): Tú eres como mi segunda mamá, ya que lejos de enojarte conmigo diariamente, sé que me quieres y que quieres cuidarme. Admiro tu fuerza de voluntad y decisión, eres un ejemplo digno de seguir. Agradezco tu paciencia y los cuidados que haz tenido conmigo, además, te doy las gracias por confiar en mí, por acercarte cuando quieres un consejo o cuando tienes un problema, tu bien sabes que aunque seamos muy diferentes, yo siempre te apoyaré para que salgas adelante, te quiero.

Caperuzo (César Emilio): Hermanito muchas gracias por existir. Tú has sido mi paño de lágrimas, tú más que nadie sabe por todo lo que he pasado, disculpa si en ocasiones te he dado responsabilidades que no te tocaban. Muchas gracias por estar incondicionalmente a mi lado, muchas gracias por escucharme. Eres una persona muy madura, mucho más madura que yo, siéntete con la confianza de contar conmigo. Por favor, sé feliz y lucha por tus sueños, de mi parte haré todo lo posible por apoyarte, te quiero.

A mi familia:

Agradezco a mi gran familia ya que siempre me ha escuchado y me ha dado un lugar distinguido. Sin mencionar nombres, doy las gracias a mis primos, primas, tíos, tías que siempre me dieron muestras de apoyo para terminar mis estudios. Muchas gracias por entender mi forma de pensar. Saben que cuentan conmigo así como yo cuento con ustedes.

A mis abuelitos:

Emilio y Catalina: Muchas gracias por apoyarme con sus consejos y por enseñarme a respetar a mis papás, a mi familia y a mis semejantes. Muchas gracias por enseñarme a apreciar el campo, el cielo, los animales, el río y toda nuestra naturaleza. Son personas con mucho conocimiento. Los quiero mucho.

Miguel Ángel () y Evelia: Abuelita, muchas gracias por sus consejos en los días en que me he portado mal, agradezco que me entienda y que opine sobre mis formas de ver la vida. A mi difunto abuelito agradezco su cuidado y comprensión, ya que espiritualmente siempre ha estado a mi lado. Abuelito, me haz ayudado a levantarme en mis derrotas, nunca te olvidaré. En donde quiera que estés, muchas gracias. Los quiero a los dos.

A Pau:

Chiquita Violenta, eres una parte muy importante de mi vida, representas mucho más que mi novia. Gracias por tu apoyo incondicional, pero sobre todo muchísimas gracias por creer en mí y en mis ideas. Gracias por haceme ver mis defectos y ayudar a corregirlos. Me haz demostrado tu amor y tu confianza, espero no defraudarte. Te quiero mucho.

A mis amigos:

Julio César: Hermano, muchas gracias por seguir a mi lado después de tantos años. Gracias por entenderme y permitirme ser tu amigo. Hemos compartido muchas experiencias difíciles que nos han ensañado que la vida no es fácil, no es bonita; sin embargo estamos convencidos que tenemos la energía y la inteligencia para transformar nuestras vidas. Nunca dejes de luchar.

Enedina: Tú fuiste mi primera amiga de la facultad, tú fuiste muy importante en mi vida para tomar fuerzas y empezar la carrera. Agradezco tu apoyo, consejos y sobre todo la confianza de integrarme a tu familia. De verdad me siento agradecido con todos ellos, y en el corazón guardo cada uno de los consejos que me dio tu mami (). Te quiero mucho Ene.

Miris: Me faltarían palabras para expresar lo mucho que te aprecio y que te admiro. La vida nos ha pintado cosas muy buenas para nosotros. Espero el futuro premie los sacrificios y esfuerzos que estás haciendo. De mi parte recibe buenos deseos y ante todo infinitos agradecimientos por todas las enseñanzas que me haz dado, eres todo un ejemplo a seguir. Me siento orgulloso de contarme entre tus amigos. Gracias por creer en mí. Cuentas conmigo.

Carmen: Sabes que te aprecio mucho. Agradezco los consejos que siempre me haz dado, pero más que nada, te voy a vivir agradecido por ayudarme a ubicar mis pensamientos y por inculcarme una vida sana y sin malicia. Gracias a toda tu familia por recibirme en tu casa y por las atenciones que de ellos he recibido. Te quiero mucho Carmensita.

Ángeles: Muchas gracias por tu amistad. Agradezco los comentarios y sugerencias que siempre tuviste con mis trabajos, eres una persona muy crítica he inteligente, tus consejos me han sido de gran utilidad en mi últimos días universitarios. Sabes que cuentas conmigo.

A todos mis amigos del Basket Ball:

Hermanos de religión, agradezco la oportunidad que me han dado de compartir una cancha con ustedes. En especial a Mercurio, Alfredo, Alejandro, Fanny. A todas las personas que me han invitado a formar parte de sus equipos. Gracias a éste maravilloso deporte mi estrés diario fue controlado y más aún, me formo una actitud luchadora que pude extrapolar a todos los ámbitos de mi vida.

A mis profesores:

Agradezco a todos y cada una de los profesores que me guiaron desde mis inicios hasta la culminación de mi licenciatura. Todos ellos pusieron su mejor esfuerzo por transmitirme los conocimientos necesarios para concluir la carrera que elegí. De diversas formas, estoy seguro que el fin último que siempre buscaron fue mi beneficio. Muchas gracias profesores, no les fallaré.

A mi querida Facultad de Química:

Muchas gracias por darme la oportunidad de formarme como profesionista. Gracias por cobijarme durante mi carrera, muchas gracias por consolarme en mis momentos de llanto y frustración ante la grandeza de tus conocimientos. Llevaré tu nombre en alto y buscaré siempre el progreso de la química, ya que quiero adquirir la responsabilidad de ser un egresado digno de representarte.

A la UNAM:

Agradezco la formación que me haz brindado así como la oportunidad de aprender de cada uno de tus muros, mucho más que letras y números. Tú fuiste mi segunda casa. Gracias a ti me forme como ser humano. Espero recompensarte ejerciendo mi carrera en beneficio de México y de cada uno de sus habitantes, para que de esa forma sigas siendo la *Máxima casa de estudios*.

El primer paso para ser libres,
es pensar...

(EZLN)

Índice

I.- Introducción	1
Ia.- Antecedentes históricos	1
Ib.- Características del plomo	2
Ic.- Aplicaciones y fuentes de exposición ocupacional a plomo	2
Id.- Aspectos toxicocinéticos y toxicodinámicos del plomo	3
Ie.- Biomarcadores de exposición a plomo	6
Ie1.- <i>Inducción de estrés oxidativo desencadenado por la exposición a plomo</i>	7
Ie2.- <i>Disminución de los niveles de glutatión</i>	9
Ie3.- <i>Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo</i>	10
If.- Biomarcadores de efecto del plomo	11
If1.- <i>Genotoxicidad del plomo</i>	11
If2.- <i>Efectos del Plomo sobre la Reparación del ADN</i>	13
II.- Justificación	15
III.- Hipótesis	15
IV.- Objetivo general	16
V.- Objetivos particulares	16
VI.- Estrategia experimental	17
VII.- Metodología	18
VIIa.- Obtención de Muestras de sangre	18

VIIb.- Método dual por fluorocromos para la cuantificación de la viabilidad	18
VIIc.- Electroforesis unicelular alcalina a pH > 13	19
VIIId.- Ensayo Reto (Modificación del Ensayo Cometa)	20
VIIe.- Determinación de glutatión	20
VIIIf.- Pruebas estadísticas utilizadas	21
 VIII.- Resultados	 22
VIIla.- Citotoxicidad	22
VIIlb.- Genotoxicidad	23
VIIlc.- Capacidad de reparación del ADN	24
VIIId.- Biomarcadores de exposición a plomo	28
VIIId1.- <u>Determinación de Glutatión (GSH)</u>	28
VIIId2.- <u>Determinación de Pb sangre, ALAD, SOD, Catalasa y MDA</u>	30
VIIle.- Correlación entre biomarcadores de exposición y efecto a plomo	31
 IX.- Discusión	 36
X.- Conclusiones	41
XI.- Bibliografía	42

I.- Introducción

Ia.- Antecedentes históricos

El plomo (Pb) es un elemento que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre, de donde ha sido extraído por el hombre desde épocas muy remotas con el fin de aprovechar sus propiedades físicas y químicas en la industria.

Se tienen registros que indican que el Pb era utilizado por los egipcios, los hebreos y los fenicios alrededor del 2,000 a.C. En Egipto se encontraron pergaminos en donde se documentaron las primeras observaciones de la toxicidad del Pb. De acuerdo con estos pergaminos, los compuestos del Pb se ocupaban con fines homicidas. Hipócrates, en el 370 a.C., fue muy probablemente, el primero en describir un cólico ocasionados por Pb, sin embargo no pudo reconocer la etiología. En el primer siglo a.C., Dioscorides se dio cuenta de la relación entre la exposición a Pb y las manifestaciones clínicas descritas hasta esos tiempos. Los romanos producían un promedio de 4,000 toneladas de Pb al año y lo utilizaban en la cerámica de vidrio y en forma metálica para utensilios de cocina. También lo utilizaban para hacer recipientes en donde hervían y condensaban el jugo de uva, con el fin de preservar y endulzar el vino. En esta civilización, la intoxicación por Pb provocó mortinatos, efectos teratogénicos y casos de daño cerebral en recién nacido. Así mismo, en las familias de los patriarcas, quienes hacían uso de varios utensilios con Pb y contaban con tuberías de Pb las exposiciones al metal ocasionaron problemas de fertilidad, lo cual entre otros factores, contribuyó a la decadencia del Imperio Romano (Hernberg, 2000).

En el siglo 16 d.C., Paracelso retomó el tema de la toxicidad del Pb mediante un estudio que lleva por nombre "Las enfermedades de los minerales"; después, a principios del siglo 18 d.C., Ramazzini describió lo que había observado en artesanos que se dedicaban a la cerámica con Pb, él relacionaba la parálisis, letargia y pérdida de dientes con la toxicidad del Pb. La primera descripción clínica moderna de la toxicidad del Pb fue hecha por Tanquerel des Planches titulada "*Traité des maladies de plomb ou saturnines*", la cual fue publicada en 1839 y se basó en el estudio de 1,200 casos, describiéndose aspectos clínicos sobre efectos abdominales, neurológicos y artríticos relacionados con la exposición a Pb (Hernberg, 2000).

Ib.- Características del plomo

El plomo (Pb) es un elemento metálico, clasificado en la tabla periódica según la IUPAC en la familia 4A; su masa atómica es de 207.19. Los elementos del grupo 4A tienen valencia +2 y +4. Por lo que, en el caso del Plomo, el estado de oxidación +2 es el más estable (Chang, 1999). Los compuestos con Pb (+2) son generalmente iónicos ($\text{Pb}^{2+}\text{SO}_4^{2-}$), por otro lado, los compuestos con Pb (+4) tienen enlaces covalentes (tetraetilo de plomo, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) (Stanley, 2003).

Ic.- Aplicaciones y fuentes de exposición ocupacional a plomo

El Pb se utiliza en una gran variedad de industrias, pero cada uno de los compuestos del metal tiene aplicaciones específicas. Por ejemplo, el acetato de Pb se utiliza en tinciones y estampado de algodón, en barnices, en la manufactura de pesticidas, pinturas, tintes para cabello y como astringente; el nitrato de Pb es usado en la producción de fósforos y explosivos, como mordente en las tinciones, en procesos de grabado, sensibilizador fotográfico, raticida y para recuperar metales preciosos en soluciones de cianuro; en cuanto al óxido de Pb, éste se emplea para producir emplastos y ungüentos, en la manufactura de cristales incoloros, en acumuladores, pinturas protectoras para hierro o acero, barnices, colorante de gomas, fósforos, pigmentos, tintes de imprenta y pinturas (Johnson, 1998).

El Pb orgánico fue usado ampliamente como aditivo en la gasolina, donde se encontraba tetraetilado y tetrametilado, esta situación a cambiado drásticamente en varios países. En México la reducción de Pb en la gasolina se inició a partir de 1980 y alcanzó en el año de 1992 una reducción del 88%, en la gasolina denominada NOVA (www.ine.gob.mx/dgicurg/sqre/diagplomo.html). Recientemente, Schnaas y colaboradores (20004), reportan que en México gracias a la eliminación del Pb en las gasolinas, los niveles del metal en el aire disminuyeron de $2.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1988 a $0.07 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el 2002.

Debido a la diversidad de productos que contienen Pb, son varias las fuentes de exposición al metal, éstas pueden ser por el contacto con productos como cerámica tradicional, pinturas y pigmentos (Carreón *et al.*, 1995) o de forma indirecta a través de la contaminación ambiental, puesto que las emisiones de Pb de la industria contaminan tanto aire, agua y suelo, de alguna manera, esto también repercute en la contaminación

de alimentos (Fortoul *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 1999). Además el grado de exposición a Pb generado por la industria, ha mostrado tener mayor impacto en las personas que habitan zonas aledañas a estos focos de exposición (Calderón-Salinas *et al.*, 1996; Leroyer *et al.*, 2000).

Id.- Aspectos toxicocinéticos y toxicodinámicos del plomo

Al ser una sustancia extraña al cuerpo humano, el plomo (Pb) cae dentro de la definición de xenobiótico, por lo que, su entrada y manifestación de efectos en el organismo va a depender de la exposición (riesgo, frecuencia y dosis), toxicocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y toxicodinamia (interacción del Pb con órganos y moléculas blanco) (ver figura 1) (Klaassen y Watkins III, 1999).

Las vías principales de absorción del Pb son el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio. La absorción del Pb depende de factores propios del organismo, tales como la edad, el estado fisiológico y la integridad de los tejidos. En personas adultas, la absorción gastrointestinal es de 10 – 15% del plomo ingerido, mientras que en los niños, la absorción por ésta vía es de hasta 50%. En el tracto respiratorio se ha observado que las partículas de Pb logran atravesar la membrana basal de los alvéolos. Se ha estimado que una concentración de 1 – 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de Pb en el aire inhalado determina una concentración de 1-2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en el torrente sanguíneo (Hernández, 2003)

Después de que el Pb ha sido absorbido por alguna de estas dos vías, es distribuido mediante el torrente sanguíneo a los tejidos blandos, como el hígado y los riñones. La vida media del metal en la sangre es de 1 a 2 meses. Luego el Pb es redistribuido y finalmente en su mayoría se deposita en los huesos (huesos blandos preferentemente), dientes, uñas y cabellos, con el tiempo, en el hueso se encuentra el 95% de la carga corporal del metal (Klaassen y Watkins III, 1999).

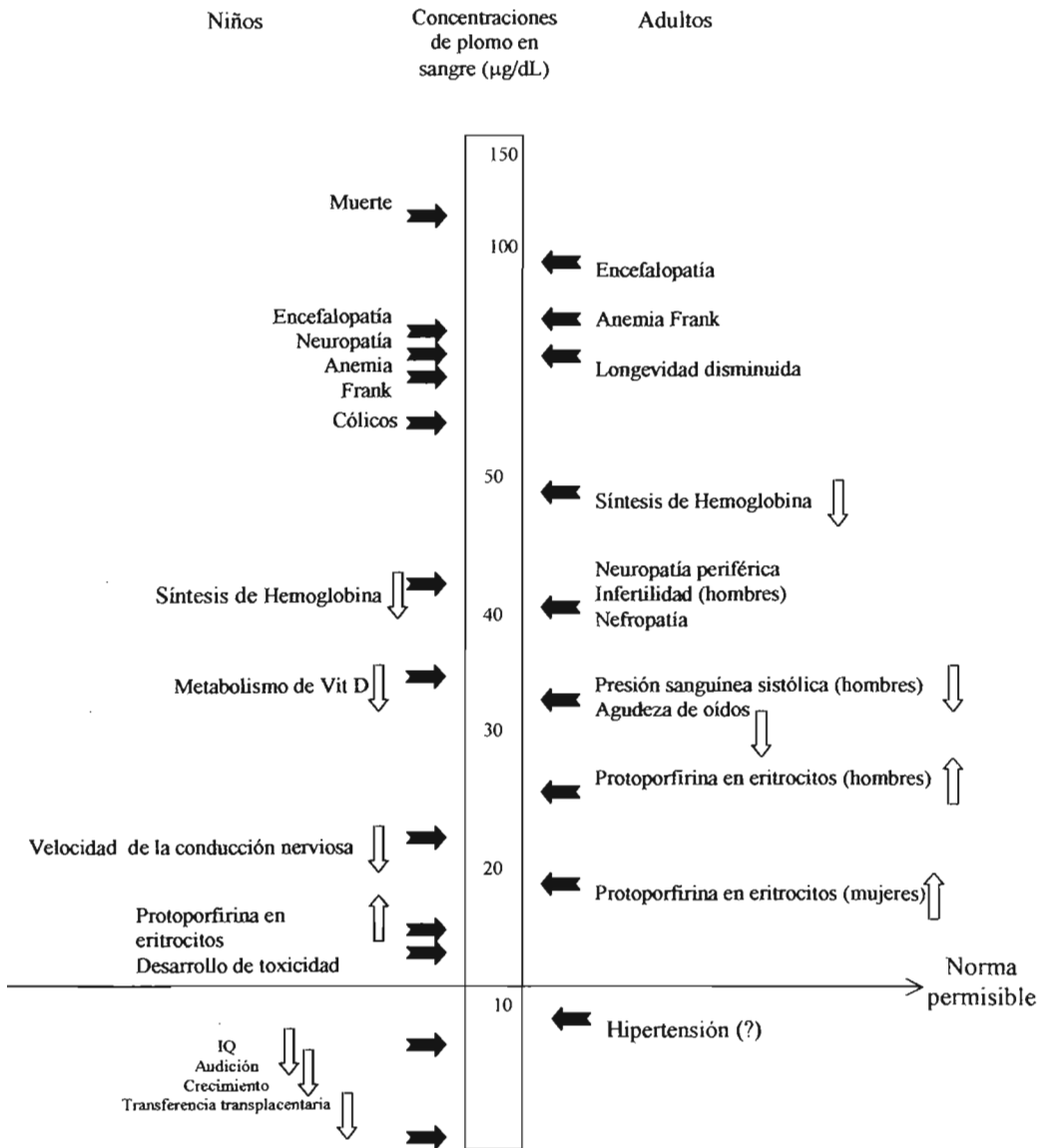


Figura 1. Efectos sistémicos ocasionados en niños y adultos por la exposición a diferentes concentraciones de plomo. La línea horizontal representa la norma permisible de Pb en sangre ($10\mu\text{g/dL}$). ↑ = Aumento; ↓ = Disminución (Tomado de Gurer y Ercal, 2000).

En el ser humano el plomo se elimina por vía renal y la concentración en orina es directamente proporcional a la concentración plasmática. Este metal también se excreta por la leche materna y sudor (Hernández, 2003; Klaassen y Watkins III, 1999).

Con lo que respecta a los aspectos toxicodinámicos, estos están favorecidos principalmente por:

- 1) Competencia con metales esenciales, especialmente con el Ca^{2+} y Zn^{2+} .
- 2) Alta afinidad a grupos sulfhidrilos de las proteínas.
- 3) Alteraciones en el transporte de iones esenciales.

Los efectos tóxicos del Pb se pueden presentar por una exposición aguda o crónica. La primera es poco frecuente, y cuando se da es producida accidentalmente. Los signos y síntomas de una intoxicación por Pb reciben el nombre de saturnismo. Esta sintomatología se manifiesta en seis niveles, a nivel gastrointestinal, neuromuscular, sistema nervioso central, hematológico, renal y cardiovascular (Hernández, 2003). Los síntomas de una exposición aguda son: 1) cólicos, localizados o generalizados en el abdomen, 2) dolor de cabeza, 3) parestesia en extremidades, 4) mialgia en extremidades (Fernández-Cabezudo *et al.*, 2003), 4) depresión y coma, 5) muerte (Johnson, 1998).

Con base en las alteraciones ocasionadas a nivel de sistema nervioso en niños, tales como la disminución del coeficiente intelectual, es que se establece la norma permisible en sangre para humanos como 10 $\mu\text{g/dL}$ (www.cie.iarc.fr). Los efectos del Pb descritos a nivel orgánico en diferentes sistemas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Efectos sistémicos ocasionados por la exposición crónica a Pb.

Sistema afectado	Efecto	Referencia
Nervioso	Epilepsia, retraso mental, neuropatía óptica, ceguera, decremento en los niveles del IQ.	Klaassen y Watkins III, 1999.
Hematológico	Anemia, incremento de reticulocitos, basofilia difusa, deficiencia de Fe.	Klaassen y Watkins III, 1999.
Renal	Los efectos sobre el riñón pueden clasificarse como agudos (reversibles) o crónicos (irreversibles), principalmente a nivel del túbulo proximal.	Klaassen y Watkins III, 1999.
Cardiovascular	Elevación de la presión sanguínea.	Nordberg et al., 2000.
Inmunológico	Disminución en anticuerpos IgA, IgG, IgM y C3 del complemento. Disminución en el porcentaje de células TCD4 e incremento de TCD8.	Fernández-Cabezudo et al., 2003. Basaran y Ünderger, 2000.
Reproductor	Decremento de la cuenta espermática, volumen de esperma, alteraciones en la motilidad y estructura de los espermatozoides.	Apostoli et al., 2000. Quintanilla-Vega et al., 2000.

1e.- Biomarcadores de exposición a plomo

Con base en algunos de los mecanismos de acción mostrados por el Pb, han sido establecidos algunos biomarcadores de exposición al metal. Los estudios realizados en poblaciones humanas en los cuales se han determinado estos biomarcadores han servido para regular y establecer los límites de exposición a Pb en el ambiente. Tal es el caso de la norma mexicana de exposición a Pb en el aire establecida como $1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (www.cie.iarc.fr).

Entre los mecanismos de acción del Pb que se han tomado en cuenta para el establecimiento de biomarcadores, se encuentran los ya descritos en la toxicodinamia del plomo. La capacidad del Pb por reemplazar iones endógenos y la gran afinidad a grupos sulfhidrido que se encuentren formando parte de algunas macromoléculas, puede ocasionar cambios en la estructura de las mismas, por ejemplo, en el caso de las enzimas, la unión puede darse en el sitio activo, lo que altera su función y por ende el proceso biológico en el que tenga participación la enzima (Ariza *et al.*, 1999). Además, el Pb al igual que muchos metales (As, Cd, Co, Fe, Cu, Hg, Ni y Zn), es capaz de generar radicales libres, lo que altera el equilibrio antioxidantes/oxidantes. Es por ello que estos efectos se consideran indicadores de exposición a metales (Ariza *et al.*, 1999). En la figura 2, se muestran algunos de los efectos ocasionados por la exposición a plomo que reflejan mecanismos de acción del metal que son considerados como biomarcadores de exposición.

le1.- Inducción de estrés oxidativo desencadenado por la exposición a plomo

Cada vez son más comunes los reportes que confirman que los metales, contaminantes del medio ambiente son capaces de producir radicales libres, en particular especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales producen daño principalmente en el ADN, ARN, lípidos y proteínas (Ariza *et al.*, 1999; Gurer y Ercal, 2000; Slobozhanina *et al.*, 2005). Skoczynska, 1997 resalta que el primer reporte que contemplaba al Pb como inductor de estrés oxidativo lo publicó Wills en 1965, y posteriormente se demostró que el metal generaba peroxidación de lípidos de membrana, y por ende incrementos en los niveles de malondialdehído (MDA) (Gurer *et al.*, 1999). Actualmente se tienen documentados los efectos del Pb sobre la estructura y función de la membrana, principalmente en la membrana de los eritrocitos, debido a la alta afinidad del Pb por las células rojas, lo que las hace ser más vulnerables al daño oxidativo que otros tipos celulares (ver figura 2).

Dentro de los biomarcadores de exposición a Pb, la disminución de los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) y la inhibición de la biosíntesis del hemo son de nuestra particular importancia, es por ello que a continuación se detallan.

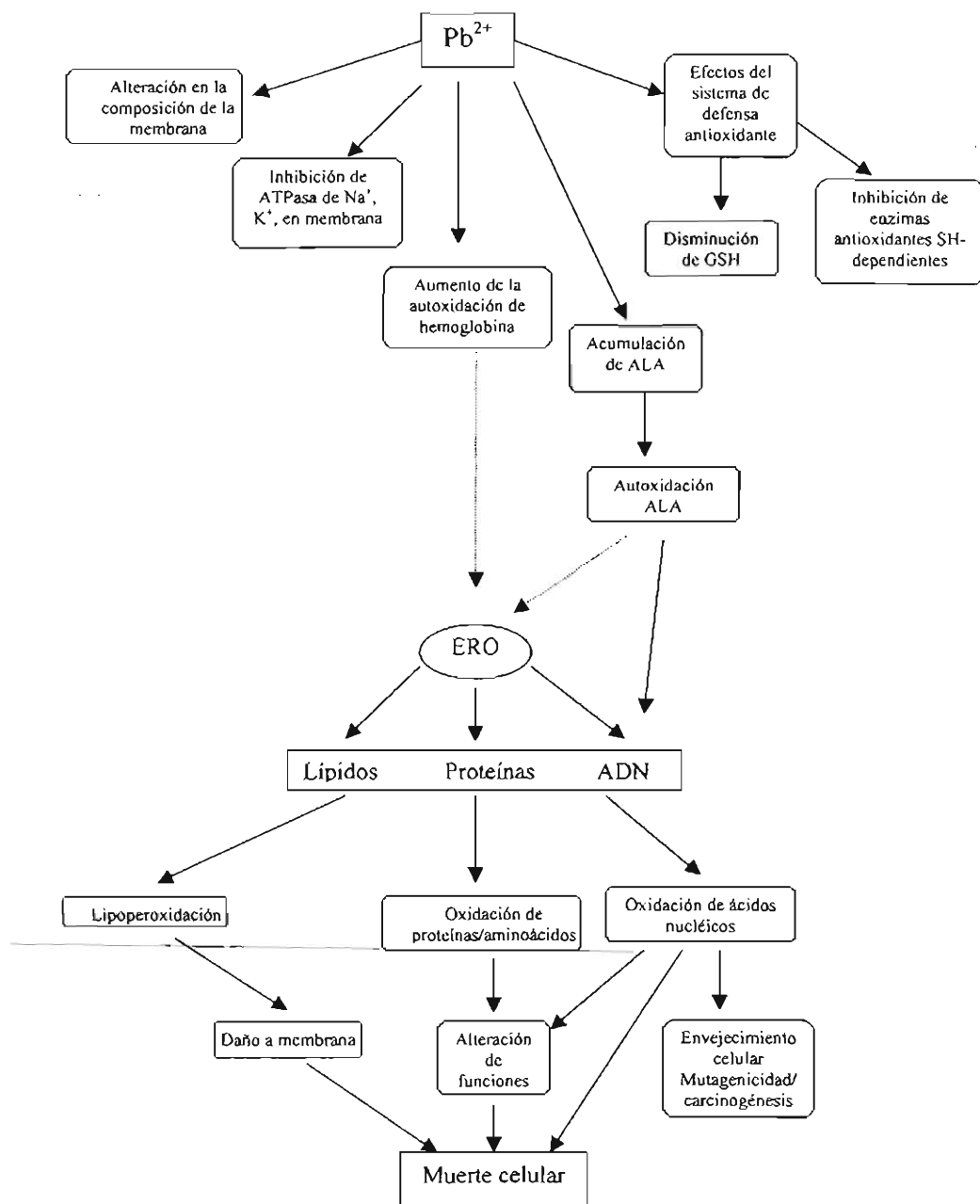


Figura 2. Efectos inducidos por la exposición a plomo. (Modificado de Gurur y Ercal, 2000).

le2.- Disminución de los niveles de Glutación

El glutatión (γ -glutamil cisteínglicina; (GSH)) es un tripéptido que juega un papel muy importante en la protección contra el daño ocasionado por estrés oxidativo. La protección que puede ofrecer se da de dos formas: directamente actuando como atrapador de especies reactivas de oxígeno (ERO) e indirectamente siendo sustrato en la biosíntesis de las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión-S-transferasa (GST). Es un protector frente a ERO generados a partir de contaminantes presentes en el medio ambiente o producidos fisiológicamente durante procesos metabólicos celulares. El glutatión representa una fuente importante de equivalentes reductores que son necesarios para minimizar el daño que provocan las ERO (Kasperczyk *et al.*, 2004). *In vivo*, el glutatión se encuentra en forma de *tiol* cuando está reducido (GSH) y de forma de *disulfuro* cuando se encuentra oxidado (GSSG). En el organismo podemos considerar un estado de protección mediado por glutatión cuando las concentraciones de GSH son altas y las de GSSG son bajas. Para mantener el estado de protección, el organismo debe de mantener niveles altos de GSH, para lo cual existe la enzima glutatión reductasa, que a su vez debe contar con la presencia de NADPH, esta molécula es la encargada de proveer equivalentes reductores (Gurer-Orhan *et al.*, 2004). Además, la presencia de glutatión es esencial para que la enzima glutatión peroxidasa actúe eficientemente ante la presencia del peróxido de hidrógeno (Voet y Voet; 1992).

Los efectos en la disminución del GSH intracelular como biomarcador de exposición a Pb han sido evidenciados tanto en modelos animales, como en estudios realizados en poblaciones humanas expuestas al metal (Gurer *et al.*, 1999; Gurer y Ercal, 2000; Gurer-Orhan *et al.*, 2004; Saxena y Flora, 2004) (ver figura 2). En este sentido, Sugawara *et al.*, 1991, determinó tanto la lipoperoxidación como la concentración de glutatión en trabajadores expuestos a plomo, reportando que los niveles de glutatión en eritrocitos de estos individuos se encontraron reducidos en un 69% con respecto a personas controles. Unos años más tarde, Ercal *et al.*, 1996, reportó un decremento en la concentración de glutatión reducido (GSH), un incremento en las concentraciones de glutatión oxidado (GSSG) y malondialdehído en ratones tratados con acetato de plomo. En este estudio, Ercal *et al.*, 1996, mostró que los efectos observados en los animales fueron disminuidos cuando se les trató con N-acetilcisteína (precursor del glutatión), lo cual ha sido considerado como una terapia alternativa de desintoxicación para personas expuestas a plomo (Costa *et al.*, 1997). Gurer *et al.*, 1998, reporta que el plomo induce reacciones de

lipoperoxidación *in vivo*, teniendo como resultado la formación de productos aldehídicos, los cuales provocan un decremento en la concentración de glutatión reducido (Villeda-Hernández, *et al.*, 2001).

le3.- Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo

En 1960, Haeger-Aronsen publicó en su tesis la excreción de Ácido δ -aminolevulínico (ALA), en la orina de trabajadores expuestos a Pb. Algunos años más tarde, Bonsignore y colaboradores (1965) demostraron que éste metal inhibe la enzima Ácido δ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD), lo que explicaba el incremento de la excreción de ALA en orina de trabajadores expuestos a plomo y la generación de anemia. Estos hallazgos evidenciaron el papel tóxico del Pb en la biosíntesis del grupo hemo, en el primer paso de ésta biosíntesis, la enzima ALA sintetasa (ALAS) cataliza la formación de ALA a partir de la glicina y succinil coenzima A, dicha reacción se lleva a cabo en la matriz mitocondrial. Se ha demostrado en experimentos realizados en animales, que el Pb no tiene gran influencia sobre la ALAS (ver figura 3). En el segundo paso de la biosíntesis del grupo hemo, la enzima ALAD cataliza la formación de porfobilinógeno a partir de dos moléculas de ALA, en este paso la ALAD si es sensible a la presencia de Pb. El metal se une a los grupos SH de la enzima, los cuales normalmente se unen al zinc, evitando la unión de ALA. Debido a esta alta afinidad del Pb por la ALAD, es que los niveles de esta enzima se utilizan como marcadores de intoxicación debida al Pb. Por ejemplo, una concentración de plomo en sangre de 15 $\mu\text{g/dl}$ tiene como efecto la inhibición de 50% de la actividad de ALAD (Onalaja y Claudio, 2000).

Al estar inhibida la actividad de ALAD, se presenta una acumulación de ALA en sangre y en orina, la ALA presente en orina también se ha considerado como biomarcador de exposición a Pb. Se ha demostrado que la acumulación de ALA trae como consecuencia la formación del radical superóxido, H_2O_2 , y el radical ALA ($\text{ALA}^\cdot$) (Monteiro *et al.*, 1989), lo cual sugiere que la acumulación de ALA contribuye al daño oxidativo inducido por el Pb (Gurer *et al.*, 2004) (ver figura 2).

En el último paso de la biosíntesis del grupo hemo, la enzima ferroquelatasa introduce una molécula de hierro en la molécula de protoporfirina. Sin embargo el Pb inhibe la actividad de la ferroquelatasa por lo que impide la incorporación de hierro en la molécula de protoporfirina IX. Este efecto del Pb tiene como consecuencia secundaria la formación

de enlaces entre la protoporfirina y el zinc, produciendo la zinc protoporfirina (ZPP), esto es facilitado porque la protoporfirina actúa como un quelante, de tal forma que la presencia de ZPP ha sido considerado como un indicador de exposición temprana a plomo (Onalaja y Claudio, 2000).

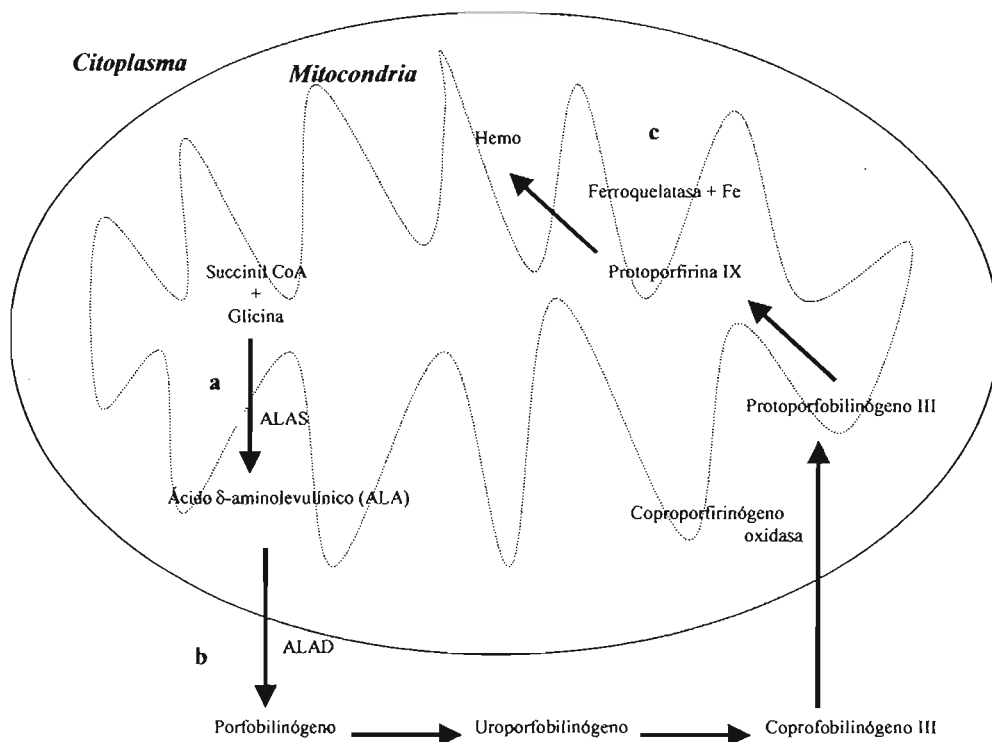


Figura 3. Biosíntesis del grupo Hemo. a) Primer paso de la biosíntesis, b) segundo paso de la biosíntesis, c) último paso de la biosíntesis. ALAS: Ácido δ-aminolevulínico sintetasa, ALAD: Ácido δ-aminolevulínico deshidrogenasa. (Tomado de Onalaja y Claudio, 2000).

If.- Biomarcadores de efecto del Plomo.

If1.- Genotoxicidad del plomo

Considerando como efectos genotóxicos del Pb, aquellas interacciones entre el metal y la molécula del ADN que causen efectos sobre su estructura y función, son muchos los trabajos realizados al respecto, sin embargo, hay contradicción entre ellos, es

por tanto que el metal es considerado como un agente genotóxico débil (Roy y Rossman, 1992; Johnson, 1998).

Eichhorn y Shin, 1968, realizaron los primeros estudios para demostrar los efectos directos del Pb sobre el ADN, ellos propusieron que los iones de Pb son capaces de desestabilizar la estructura de la doble hélice del ADN, debido a uniones del metal con nucleótidos. Posteriormente se hicieron estudios de dicroísmo circular y polarografía que demostraron un efecto estabilizante de los iones de Pb hacia la estructura helical, en donde las uniones del Pb se evidenciaron tanto con los grupos fosfato, como con nucleótidos, nucleosidos y particularmente con ATP (Foulkes, 1990). En contraste, Tajmir-Riahi y colaboradores (1998), encontraron que el Pb interactúa muy poco con nucleótidos, pero demostrando que el metal se unía a las bases nitrogenadas del ADN, específicamente a la posición N7 de la guanina y a los sitios A-T. Por otro lado, mediante las técnicas de elusión alcalina y sedimentación de nucleótidos, no se ha detectado la inducción de rompimientos de cadena sencilla en el ADN o entrecruzamientos ADN-proteína. Con el fin de evidenciar los rompimientos en la cadena de ADN de células tratadas con Pb, se ha utilizado la técnica *nick traslation*, de la cual se han obtenido resultados sugerentes de que altas concentraciones de Pb pueden inducir cortes dentro del ADN cromosómico (Roy y Rossman, 1992).

Para estudiar la influencia del Pb sobre la replicación y la transcripción *in vivo*, se han utilizado sistemas con enzimas purificadas. Foulkes, 1990 reporta que en 1976, Sirover examinó el efecto de los compuestos de Pb y otros metales sobre la fidelidad de la replicación del ADN llevada a cabo por una ADN polimerasa viral, y encontró que a una concentración de Pb 4 mM la fidelidad se ve disminuida.

Con respecto a la capacidad del Pb por desencadenar aberraciones cromosómicas, existen resultados contradictorios. En un principio cuando se comenzaron a estudiar poblaciones expuestas, no se encontraron inducciones significativas, sin embargo, Forni y colaboradores (1976), encontraron un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en personas con exposiciones recientes a Pb, no así en trabajadores que tenían mas de 18 meses de haber estado expuestos a Pb. En líneas celulares tratadas *in vitro* con Pb, los resultados no han sido concluyentes con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas (Foulkes, 1990; Minozzo *et al.*, 2004).

Si bien los resultados que describen la capacidad genotóxica del plomo son controversiales, trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que el Pb a concentraciones no citotóxicas (0.01, 0.1 y 1 μM) equivalentes a las circulantes en sangre de trabajadores expuestos laboralmente, induce rompimientos de cadena sencilla en ADN de diferentes órganos de ratón, sin embargo fue posible sugerir un papel de agente entrecruzador para el Pb, debido a que al eliminar las proteínas asociadas al ADN mediante tratamientos con proteinasa K y exponiendo el ADN libre de histonas a las mismas concentraciones no citotóxicas de Pb fue incapaz de inducir rompimientos en el ADN, además de demostrarse que la exposición a bajas concentraciones de Pb *in vivo* generaba la presencia de ERO (Valverde *et al.*, 2001). Por otro lado, la exposición vía inhalatoria a Pb en bajas concentraciones (0.0068 $\mu\text{g}/\text{c}^3$) indujo rompimientos de cadena sencilla en el ADN de diferentes órganos de ratón (Valverde *et al.*, 2002). Estos hallazgos en conjunto con trabajos realizados en poblaciones expuestas laboralmente, plantean la inducción de genotoxicidad a través de la generación de ERO o algún otro mecanismo de acción indirecto (Gurer *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999; Groot de Restrepo *et al.*, 2000; Devi *et al.*, 2000; Palus, *et al.*, 2003; Wozniak and Blasiak, 2003).

1f2.- Efectos del Plomo sobre la Reparación del ADN

Las alteraciones sobre los mecanismos de reparación del ADN es otro proceso mediante el cual puede inducir genotoxicidad, planteándose que el Pb tiene la capacidad de inhibir a las DNA polimerasas que participan en el proceso de reparación del ADN (Hartwig *et al.*, 1994; Hartwig, *et al.* 1997; Hartwig, 1998). El acetato de plomo inhibe la enzima humana O⁶-metilguanina ADN metiltransferasa, la cual es responsable de remover un aducto promutagénico en el ADN llamado O⁶-alquilguanina. Esta inhibición se revierte en presencia de EDTA, sin embargo se sugiere que el Pb reacciona covalentemente con grupos nucleofílicos de la O⁶-metilguanina ADN metiltransferasa, proceso que es dependiente de la cantidad de cisteínas en el sitio activo de la enzima (Scicchitano y Pegg, 1987; Hartwig *et al.*, 1995; Hartwig *et al.*, 1997).

Tradicionalmente, los efectos de los metales sobre la reparación han sido determinados indirectamente (Danizeau y Marion, 1989; Hengstler *et al.*, 2003). Estudios realizados en extractos celulares, han demostrado que el As, Cd, Co, Fe, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn son capaces de inhibir diferentes pasos de la vía de la reparación por escisión de nucleótidos (REN), uno de los mecanismos de reparación más comunes en células eucariontes

(Hartwig *et al.*, 1996; Calsou *et al.*, 1996; Kasten *et al.*, 1997; Lynn *et al.*, 1997; Dally y Hartwig, 1997, Hartman y Hartwig, 1998). Estos trabajos apoyan el concepto de que los metales inhiben el proceso de reparación del ADN. La inhibición de la REN por metales puede explicar porqué estos agentes actúan como comutágenos, puesto que los metales potencian la mutagenicidad de agentes que causan alteraciones en la estructura de la doble hélice de ADN. En experimentos *in vitro*, se ha observado que el Pb incrementa la genotoxicidad en células expuestas a radiación UV (Hartwig, 1994), peróxido de hidrógeno (Yang, 1999), radiación X (Snyder *et al.*, 1989; Fischer y Skreb, 2001) o a mutágenos (Columbano, 1983; Columbano, 1990; Roy y Rossman, 1992). Lo cual sugiere una relación entre la presencia del Pb y la sensibilidad frente a agentes genotóxicos (Groot de Restrepo *et al.*, 2000). Se ha planteado la posibilidad de que estos efectos sean debidos a la capacidad del Pb para inhibir los mecanismos de reparación del ADN o de incrementar los errores durante el proceso de reparación, en dicha situación, los blancos de ataque involucrados serían la ADN polimerasa y la síntesis de ARN (Hartwig y Schwerdtle, 2002). Zelikoff *et al.*, 1988, a reportado que en células V79 de hamster sirio tratadas con Pb se ve disminuida la fidelidad en la síntesis de ADN. Hartwig *et al.*, 1990, en un trabajo *in vitro*, observó que el acetato de plomo interfiere con la reparación de el daño inducido por radiación UV, dicho trabajo también se realizó en células V79 (Silbergeld *et al.*, 2000; Silbergeld, 2003).

Justificación

Con base en los antecedentes antes mencionados, el interés del presente trabajo de tesis es evidenciar los efectos inhibitorios del plomo sobre la capacidad de reparación del ADN como mecanismo de genotoxicidad y correlacionarlo con marcadores bioquímicos de toxicidad en personas ocupacionalmente expuestas al metal, quienes laboran en una fábrica dedicada a la producción y reciclamiento de acumuladores en la ciudad de León, Guanajuato; con el fin de contribuir al estudio de los efectos biológicos tempranos en poblaciones humanas expuestas a xenobióticos.

Hipótesis

Los individuos expuestos laboralmente cuyos niveles de plomo en sangre sean superiores a 10µg/dL serán incapaces de remover el daño en el ADN ocasionado por un reto genotóxico (radiación γ).

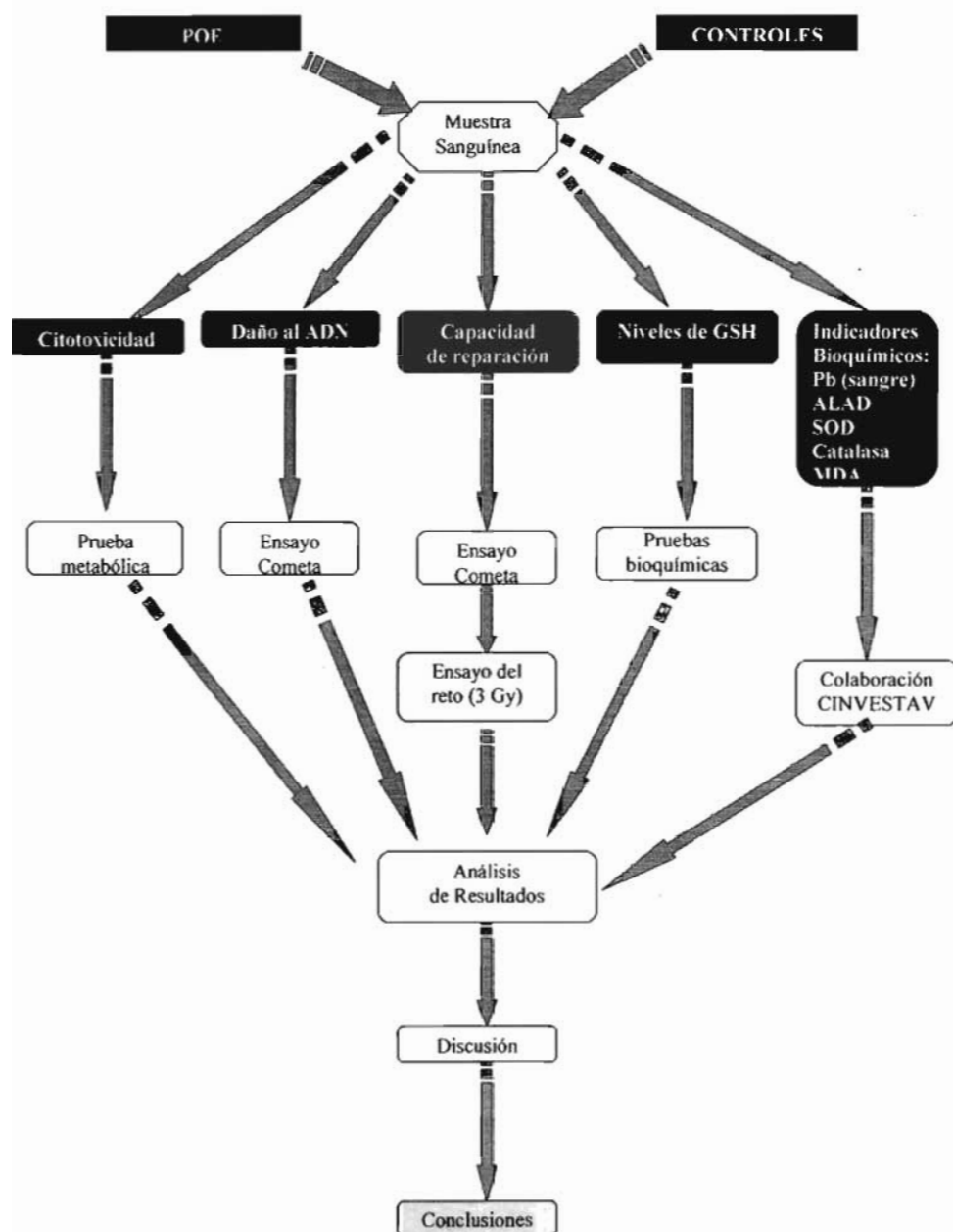
Objetivo general

Evaluar la capacidad de reparación del ADN en personas ocupacionalmente expuestas a plomo (POE a Pb) y su correlación con biomarcadores de exposición a plomo.

Objetivos particulares

- Determinar la citotoxicidad asociada a la exposición a plomo en muestras de sangre periférica.
- Determinar la genotoxicidad mediante el ensayo cometa o electroforesis unicelular presente en POE a plomo.
- Evaluar la capacidad de reparación del ADN en muestras de sangre periférica de POE a plomo.
- Determinar los niveles de glutatión intracelular de POE a plomo.
- Correlacionar la genotoxicidad con los niveles intracelulares de glutatión en POE a Pb.
- Correlacionar la genotoxicidad y la capacidad de reparación del ADN con diferentes biomarcadores de exposición a plomo (Pb en sangre, niveles de la Acido δ amino-levulínico deshidrogenasa (ALAD), lipoperoxidación, actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa), en individuos laboralmente expuestos.

Estrategia experimental



Metodología

El estudio fue realizado en muestras de 20 personas controles (empleados de oficina) y 16 personas ocupacionalmente expuestas a plomo, quienes laboran en una fábrica dedicada a la producción y reciclamiento de acumuladores en la ciudad de León, Guanajuato. A todos los individuos se les tomó muestras sanguíneas para llevar a cabo el presente estudio. Antes de la toma de muestra sanguínea, las personas que colaboraron en este estudio firmaron una carta de consentimiento informado.

VIIa.- Obtención de muestras de sangre

Mediante el procedimiento de punción venosa se colectaron aproximadamente 5 mL de sangre en tubos Vacutainer^{MR} con heparina las cuales fueron debidamente etiquetados. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

VIIb.- Método dual por fluorocromos para la cuantificación de la viabilidad celular

La técnica evalúa la actividad metabólica de los lisosomas, como también la integridad de la membrana nuclear (Strauss, 1991). Para esta metodología se utilizaron dos fluorocromos; el bromuro de etidio (Br-Et) 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, el cual es un indicador de la integridad de la envoltura nuclear y el 5,6 carboxiacetato de fluoresceína (FDA) 5.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que evalúa la actividad metabólica de los lisosomas. Esta técnica se empleó como lo han descrito Hartman y Speit (1995) para determinar la viabilidad celular.

Se tomaron 3 μL de la sangre entera y se les adicionaron 3 μL de la mezcla de FDA y Br-Et; inmediatamente después éstos fueron observados en un microscopio de fluorescencia Olimpos BX-60, empleando un filtro de excitación de 494 a 510 nm y un filtro de barrera de 590 nm, usando un objetivo de 20X.

Se evaluaron 100 células por condición y los resultados se expresan en porcentajes. Las células fueron evaluadas al arribar al laboratorio e inmediatamente después de cada uno de los puntos de la cinética de reparación.

VIIc.- Electroforesis unicelular alcalina a pH > 13

Esta técnica se realizó conforme a la versión propuesta por Singh *et. al.* (1988) y descrita por Rojas *et. al.* (1999). En un portaobjetos lavado, se le adicionan 150 μ L de agarosa regular al 0.5%; estas laminillas son colocadas en un horno hasta que dicha agarosa forma una capa uniforme solidificada.

Se tomaron alícuotas de 5 μ L de sangre entera a las cuales se le adicionaron 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, se mezcló gentilmente y dicha mezcla se distribuyó sobre la laminilla previamente preparada con agarosa regular. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y así las laminillas se refrigeraron a 4°C por un minuto para su solidificación. Se removió el cubreobjetos y se le adicionó otra capa de agarosa de bajo punto de fusión 0.5%, colocándose de nuevo en refrigeración. Posteriormente las laminillas se introdujeron en un vaso kôplin inmersos en solución de lisis pH 10 preparada recientemente, la cual contiene NaCl 2.5 M, EDTA, Tris-base, 10% de DMSO y 1% de Tritón X-100 por al menos una hora.

Transcurrido el periodo de lisis, las laminillas fueron colocadas en una cámara de electroforesis sobre hielo inmersas en un amortiguador alcalino compuesto de NaOH y EDTA a un pH > 13. Estas laminillas estuvieron inmersas durante 20 min, en este amortiguador con el fin de permitir que las hebras del DNA se pudieran desenrollar, y al cabo de este tiempo se realizó una electroforesis durante 20 min a 0.8V/cm (Todo este procedimientos se realizó bajo condiciones de luz amarilla, para no permitir que los fotones dañen al DNA), después de la electroforesis, las laminillas fueron lavadas con una solución amortiguadora de neutralización (Tris al 0.4 M pH 7.5) por 15 min y fueron fijadas con etanol absoluto para después ser secadas al aire.

Para observar las laminillas al microscopio se les adicionó 20 μ L de una solución de 2.0 μ g/mL de bromuro de etidio (Br-Et); fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 con un filtro de excitación de 515 a 560 nm y un filtro de

barrera de 590 nm, usando un objetivo de 20X y adaptada a un digitalizador de imágenes Kínetic Image se evaluaron 50 células por laminillas (2 laminillas por condición experimental) utilizando el programa Komet 3.0 (Kínetic Imaging) de donde se obtuvieron los datos de Longitud de la Cola del Cometa (LCC) en unidades dadas en micrómetros.

VIIId.- Ensayo Reto (Modificación del Ensayo Cometa)

A partir de una alícuota de 10 μL se prepararon 2 laminillas de ensayo cometa para determinar el daño basal. Del resto de la muestra, se utilizaron 100 μL a las cuales se les agregó 900 μL de medio RPMI-1640. Fueron expuestas a radiación γ (3 Gy) para después de un lavado con RPMI-1640, darles 30 y 60 minutos de incubación a temperatura ambiente (tiempo de reparación). Mediante el Ensayo Cometa, se determinó el daño al ADN de las muestras inmediatamente después de la radiación (Daño inducido por la radiación), a los 30 minutos (Daño remanente 30 minutos después de la radiación) y 60 minutos (Daño remanente 60 minutos después de la radiación) de incubación. Se trabajó con los datos de Longitud de la Cola del Cometa (LCC) y los datos fueron tratados bajo el razonamiento mostrado en el capítulo de resultados.

VIIe.- Determinación de glutatión

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2 500x 10 min. Se eliminó el sobrenadante (plasma) y el paquete eritrocitario se resuspendió en 4 volúmenes de AMF. Se centrifugó a 3 000x 10 min. Del sobrenadante se tomaron 100 μL y se llevaron a 900 μL con la solución amortiguadora. Se adicionaron 50 μL del agente cromóforo y 50 μL de NaHO 30% mezclando cada adición. La mezcla se incubó a 25°C durante 10 min en la oscuridad, para después evaluarlas espectrofotométricamente a 400 nm. A la par se realizó una curva estándar de glutatión reducido utilizando ácido metafosfórico (AMF) como medio de disolución para interpolar los resultados obtenidos de las muestras experimentales.

VIII.- Pruebas estadísticas utilizadas

- Se utilizó la prueba *U de Mann Withney* para determinar la diferencia estadística entre la genotoxicidad de personas controles y personas ocupacionalmente expuestas a Pb.
- Mediante la prueba de *t de Student* se determinó la diferencia entre los valores de los biomarcadores de exposición a plomo presentes entre personas controles y POE a Pb.
- Para determinar la significancia estadística de las correlaciones simples entre biomarcadores de exposición y efecto del plomo se aplicó la *Prueba de Pearson*.

Resultados

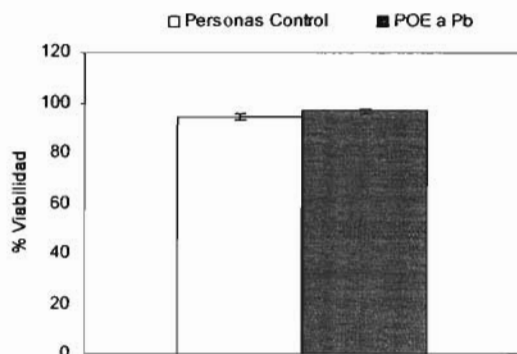
VIIA.-Citotoxicidad

La citotoxicidad se determinó mediante el uso de la tinción dual por fluorocromos (FDA/Bromuro de Etidio) para evaluar la actividad metabólica de las células mononucleares tanto de personas control como de POE a Pb. La viabilidad y la citotoxicidad se expresan en porcentajes $\pm$ el error estándar (EE) en la Tabla 2, mientras que la representación gráfica de los resultados de viabilidad se muestra en la gráfica 1. Para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos se aplicó una "t" de Student de dos colas con $p < 0.05$.

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad y citotoxicidad en muestras de sangre periférica de personas controles y ocupacionalmente expuestas.

Controles	Personas Control Promedio $\pm$ EE	Personas Ocupacionalmente expuestas Promedio $\pm$ EE
%Viabilidad	94,55 $\pm$ 1,22	96,44 $\pm$ 0,65
%Citotoxicidad	5,45 $\pm$ 1,22	3,56 $\pm$ 0,65
N	20	16
"t" Student	Ns	ns

ns: no diferencias significativas



Gráfica 1. Promedio del porcentaje de viabilidad $\pm$ EE determinado en sangre periférica de los grupos estudiados.

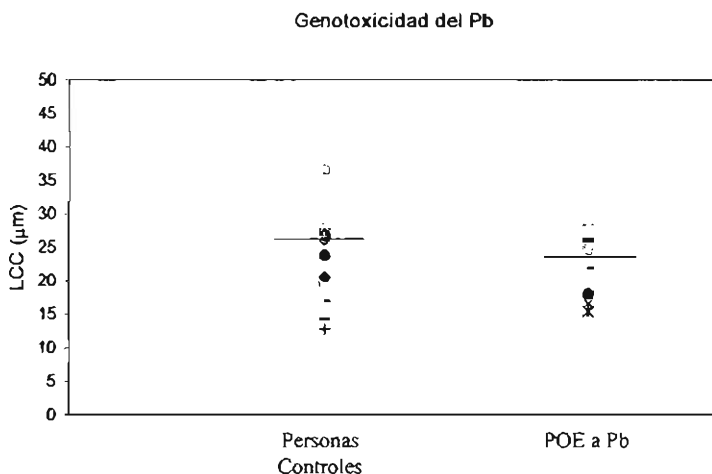
VIIIb.-*Genotoxicidad*

El daño al ADN, manifestado como rompimientos de cadena sencilla, se determinó mediante el "Ensayo Cometa" y los valores individuales se muestran en la tabla 3. Los resultados se expresan como la Longitud de la Cola de los Cometas (LCC), valor que refleja la migración de los fragmentos de ADN rotos en $\mu\text{m} \pm \text{EE}$ de 100 núcleos evaluados por individuo.

Tabla 3. Daño genotóxico en células de sangre periférica de personas control y personas ocupacionalmente expuestas a plomo (POE a Pb).

Personas Control	LCC (μm) $\pm$ EE	Personas Ocupacionalmente Expuestas	LCC (μm) $\pm$ EE
C1	20,55 $\pm$ 3,21	POE1	25,53 $\pm$ 3,98
C2	26,92 $\pm$ 3,65	POE2	25,56 $\pm$ 5,30
C3	30,31 $\pm$ 4,19	POE3	21,07 $\pm$ 3,37
C4	19,46 $\pm$ 3,57	POE4	16,64 $\pm$ 2,45
C5	26,04 $\pm$ 4,62	POE5	15,39 $\pm$ 2,50
C6	23,73 $\pm$ 4,51	POE6	18,01 $\pm$ 4,64
C7	12,78 $\pm$ 2,34	POE7	28,38 $\pm$ 4,30
C8	16,84 $\pm$ 2,60	POE8	21,85 $\pm$ 4,27
C9	14,22 $\pm$ 2,19	POE9	25,12 $\pm$ 5,00
C10	31,63 $\pm$ 5,89	POE10	28,87 $\pm$ 4,27
C11	33,56 $\pm$ 4,84	POE11	24,78 $\pm$ 4,92
C12	31,97 $\pm$ 4,47	POE12	23,99 $\pm$ 5,41
C13	28,14 $\pm$ 3,44	POE13	32,01 $\pm$ 4,16
C14	41,00 $\pm$ 4,71	POE14	29,92 $\pm$ 5,16
C15	36,53 $\pm$ 5,68	POE15	24,66 $\pm$ 4,74
C16	26,44 $\pm$ 3,84	POE16	27,72 $\pm$ 4,83
C17	26,45 $\pm$ 3,72		
C18	23,68 $\pm$ 3,26		
C19	26,02 $\pm$ 3,06		
C20	18,94 $\pm$ 5,34		
Promedio	25,76 $\pm$ 1,63	Promedio	24,34 $\pm$ 1,88

Para determinar si la diferencia en la genotoxicidad entre los grupos de individuos monitorizados era significativa estadísticamente, se aplicó una prueba estadística no paramétrica (U de MannWithney, $p < 0.05$), puesto que los datos de migración de la cola de los cometas no describen una distribución normal o Gausiana, el resultado de este análisis nos indica que la genotoxicidad es estadísticamente igual en ambas poblaciones, tal como se refleja en el valor de "p" obtenido, $p = 0.51$ al igual que se muestra en la gráfica 2, donde cada punto representa a cada uno de los individuos de las poblaciones estudiadas, este análisis permite visualizar la distribución intra e intergrupos.



Gráfica 2. Distribución de la genotoxicidad individual determinada mediante el "Ensayo Cometa" en células de sangre periférica de personas control y personas ocupacionalmente expuestas a Pb (POE a Pb).

VIIIc.- Capacidad de reparación del ADN

A la par de la cinética de reparación de ADN, se evaluó la viabilidad después del reto genotóxico inducido por la radiación, estos datos se resumen en la tabla 4, presentándose el promedio del comportamiento de las dos poblaciones estudiadas.

Tabla 4. Porcentajes de Viabilidad y Citotoxicidad $\pm$ EE en muestras de sangre periférica de las poblaciones estudiadas, inducidas por la radiación γ (3 Gy) y después de 60 minutos de recuperación.

Variable	Personas Controles		Personas Ocupacionalmente Expuestas a plomo	
	Después de radiación γ (3Gy)	Después de 60 minutos de recuperación	Después de radiación γ (3Gy)	Después de 60 minutos de recuperación
%Viabilidad	86,55 $\pm$ 2,83	62,45 $\pm$ 3,33	80,06 $\pm$ 2,29	76,68 $\pm$ 3,04
%Citotoxicidad	13,45 $\pm$ 2,83	37,55 $\pm$ 3,33	19,93 $\pm$ 2,29	23,31 $\pm$ 3,04
N	20	20	16	16

La inhibición de la capacidad de reparación del ADN como mecanismo indirecto de genotoxicidad se determinó a través de una modificación del Ensayo Cometa, el cual se denomina como "Ensayo del Reto", el cual se explicó en la metodología. Ésta consiste en retar a las células sanguíneas con un nuevo agente genotóxico, el cual fue en este caso particular, la exposición a radiación γ (3 Gy), posteriormente las células son lavadas e incubadas en medio de cultivo por diferentes periodos de recuperación (30 y 60 minutos), al término de los cuales se realizan preparaciones celulares en las cuales se determina el daño remanente en el ADN, mediante la metodología convencional del "Ensayo Cometa".

Para expresar la capacidad de reparación del ADN de las muestras de sangre periférica a manera de porcentajes, fue necesario hacer algunos cálculos a partir de los valores de migración de la LCC obtenidos en cada uno de los puntos de la cinética muestreados (daño basal, daño inducido por la radiación, daño a 30 minutos y daño a 60 minutos), siguiendo el siguiente razonamiento:

DB = Daño al ADN presente al momento de tomar la muestra (generado por la exposición laboral de las POE a Pb o el daño basal de las personas controles).

DI = Daño inducido por la radiación γ (3 Gy). Daño al tiempo 0 minutos

D_{30} = Daño remanente determinado 30 minutos después de la radiación γ (3 Gy).

D_{60} = Daño remanente determinado 60 minutos después de la radiación γ (3 Gy).

Datos de longitud de la cola del cometa (LCC) medidos en micras (μm)

$$DI - DB = \text{Daño Inducido neto} = D_{in}$$

$$D_{30} - DB = \text{Daño neto a 30 minutos} = D_{n_{30}}$$

$$D_{60} - DB = \text{Daño neto a 60 minutos} = D_{n_{60}}$$

Asumiendo que el daño inducido al término de la radiación es el máximo, se le asocia el valor de 100% de daño remanente al tiempo 0, mientras que el porcentaje de daño a 30 minutos y 60 minutos representan el daño remanente a 30 y 60 minutos de incubación (tiempo de recuperación, para que se lleve a cabo la reparación del ADN).

$$\% \text{ Daño 30 minutos} = \frac{Dn_{30} * 100 \%}{DIn}$$

$$\% \text{ Daño 60 minutos} = \frac{Dn_{60} * 100 \%}{DIn}$$

$$\% \text{ Reparación 30 minutos} = 100\% - \% \text{ Daño 30 minutos}$$

$$\% \text{ Reparación 60 minutos} = 100\% - \% \text{ Daño 60 minutos}$$

Los resultados de la "Cinética de Reparación" de las personas controles se muestran en la Tabla 5 y los de las POE a Pb se muestran la Tabla 6. Cabe señalar que las concentraciones de plomo en sangre fueron de $3.84 \pm 0.38 \mu\text{g/dL}$ y $69.3 \pm 5.9 \mu\text{g/dL}$ respectivamente. La comparación de la "Cinética de Reparación" entre ambas poblaciones se presenta en la Gráfica 3.

Tabla 5. Porcentaje de daño remanente y porcentaje de reparación de ADN en la población control determinados en los diferentes puntos de la "Cinética de Reparación".

Tiempo (min)	% Daño Remanente $\pm$ EE	% Reparación de ADN $\pm$ EE
0	100 ± 2.70	0 ± 2.70
30	24.74 ± 14.77	75.25 ± 14.77
60	4.40 ± 11.78	95.59 ± 11.78
N	20	20

Tabla 6. Porcentaje de daño remanente y porcentaje de reparación de ADN en la población ocupacionalmente expuesta a plomo en los diferentes puntos de la "Cinética de Reparación".

Tiempo (min)	% Daño Remanente $\pm$ EE	% Reparación de ADN $\pm$ EE
0	100 ± 1.08	0 ± 1.08
30	140.16 ± 16.30	-40.15 ± 16.30
60	71.20 ± 14.27	28.80 ± 14.27
N	16	16

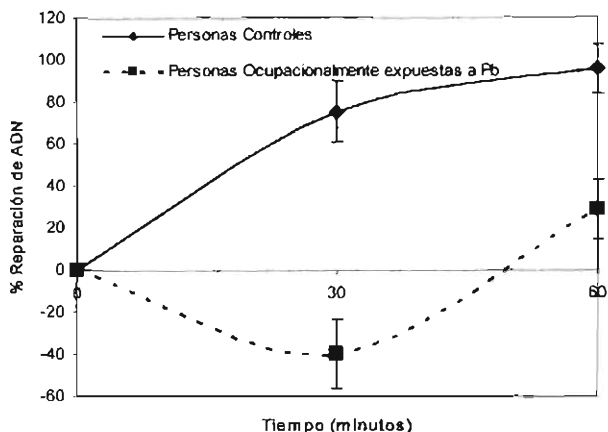


Gráfico 3. "Cinética de Reparación" en las poblaciones muestreadas. Cada punto representa el promedio del porcentaje de reparación de cada población $\pm$ EE.

Los valores individuales del porcentaje de reparación de la población control y la ocupacionalmente expuesta a Pb se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de reparación del ADN de cada individuo que participó en el estudio después de 60 minutos de recuperación.

Personas Controles	%Reparación 60 min	[Pb] ($\mu\text{g/dL}$)	POE a Pb	%Reparación 60 min	[Pb] ($\mu\text{g/dL}$)
C1	61,788	1,5	POE1	9,974	98,5
C2	71,598	6,5	POE2	56,832	99,1
C3	74,469	2,3	POE3	-3,173	94,7
C4	44,342	1,6	POE4	38,919	64,6
C5	99,518	2,7	POE5	-58,663	68,8
C6	91,968	3,8	POE6	-79,599	43,7
C7	57,980	2,9	POE7	2,081	67,3
C8	14,874	1,4	POE8	117,332	44,1
C9	41,886	5,9	POE9	1,797	79,6
C10	64,552	3,1	POE10	17,851	56,5
C11	47,126	2,9	POE11	48,975	118,9
C12	139,262	6,1	POE12	69,480	43,6
C13	146,748	4,3	POE13	136,807	76,6
C14	206,170	2,5	POE14	10,764	59,8
C15	96,270	4,1	POE15	5,873	43,7
C16	90,895	3,7	POE16	85,612	49,3
C17	94,785	7,2			
C18	205,056	5,1			
C19	166,184	5,1			
C20	96,496	4,1			
Promedio	95,598 $\pm$ 11,77	3.84 $\pm$ 0.38	Promedio	28,804 $\pm$ 14,2	69,3 $\pm$ 5.88

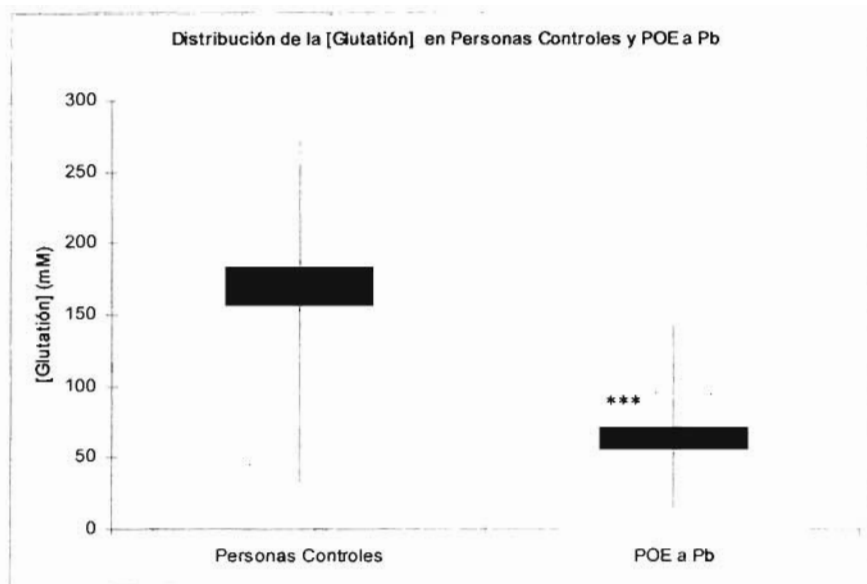
VIIIId.- Biomarcadores de exposición a plomo

Debido a la capacidad del plomo por generar ERO en el organismo, se han utilizado moléculas asociadas al estrés oxidativo como biomarcadores de exposición a plomo. De la defensa antioxidante, se han asociado al glutatión, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Gurer et al., 1999). Con respecto a las especies prooxidantes, el malondialdehído (MDA) se considera un indicador de toxicidad, debido a que el plomo puede desencadenar reacciones de lipoperoxidación (Skoczynska, 1997). Además, la inhibición de la enzima Ácido δ aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD) en la biosíntesis del grupo hemo, ha sido considerada como un biomarcador de exposición a plomo. En el presente estudio se determinaron los anteriores indicadores bioquímicos, además de determinarse los niveles de plomo en sangre periférica a todos los individuos participantes.

VIIIId1.- Determinación de Glutatión (GSH)

La determinación del glutatión reducido (GSH) es un indicativo de la protección antioxidante frente a ERO, por lo que los niveles de ésta molécula antioxidante reflejan el estado de estrés oxidativo en el que se encuentran las células.

Los niveles en sangre periférica de glutatión determinados mediante espectrofotometría para cada individuo de la población control y la ocupacionalmente expuesta se muestran en la tabla 8. Los resultados promedio de este biomarcador para la población control son mayores (169.71 ± 14.12 mM) que los presentados por las personas expuestas a Pb (62.98 ± 8.15), estas diferencias son significativas ($p > 0.05$) (Ver Gráfica 4).



Gráfica 4. Distribución de las concentraciones de glutación en sangre de personas control y personas ocupacionalmente expuestas a Pb. Los retablos negros representan el valor promedio $\pm$ EE de las concentraciones de glutación, mientras que las líneas verticales representan el valor máximo y mínimo de cada grupo. ***p = 1,63E-7 ("t" student) (Personas control vs POE a Pb)

Tabla 8. Concentraciones (mM) de glutación en la sangre de personas control y personas ocupacionalmente expuestas a Pb.

Individuo	[Glutación] (mM)	Individuo	[Glutación] (mM)
C1	225,879	POE1	17,948
C2	215,017	POE2	38,121
C3	275,017	POE3	85,707
C4	182,431	POE4	91,914
C5	224,845	POE5	66,569
C6	140,534	POE6	69,672
C7	208,810	POE7	52,603
C8	146,741	POE8	142,603
C9	133,810	POE9	57,776
C10	186,052	POE10	81,569
C11	64,500	POE11	69,155
C12	230,017	POE12	84,155
C13	174,155	POE13	71,224
C14	217,086	POE14	43,293
C15	212,431	POE15	15,362
C16	147,776	POE16	20,017
C17	164,328		
C18	159,155		
C19	32,431		
C20	53,121		

VIII d2.- Determinación de Pb sangre, ALAD, SOD, Catalasa y MDA

El presente trabajo formó parte de un proyecto en colaboración con el grupo del Dr. Calderón en el CINVESTAV, IPN, es por ello que a continuación se incluyen los datos determinados por el mencionado grupo. Los biomarcadores que se reportan son concentración de Pb en sangre, actividad de ALAD, concentración de SOD, Catalasa y MDA, cuyos valores promedio de la población control y la expuesta ocupacionalmente se muestran en la Tabla 9 y en las Gráficas 5 a 9.

Tabla 9. Bioindicadores de exposición a Pb (Promedio y EE).

Biomarcador	Población Control	Personas ocupacionalmente expuestas a Pb
Pb (µg/dL)	3.84 ± 0.38	69.3 ± 5.88 ***
ALAD (µmol/hr/mL)	864.95 ± 58.25	99.94 ± 8.32 ***
SOD (U/g Hb)	229.80 ± 18.84	464.56 ± 18.69 ***
Catalasa (U/106cel)	6.12 ± 0.51	34.28 ± 2.62 ***
MDA (nmol/mL)	1.05 ± 0.07	1.13 ± 0.04
N	20	16

* Student, *** p<0.0001 (Personas control vs POE a Pb)

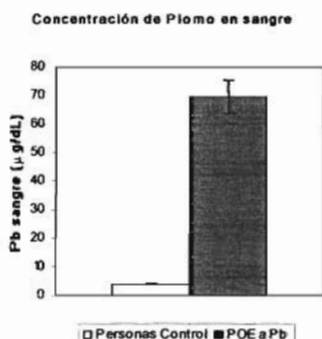


Gráfico 5. Concentración de plomo en sangre. Promedio ± EE

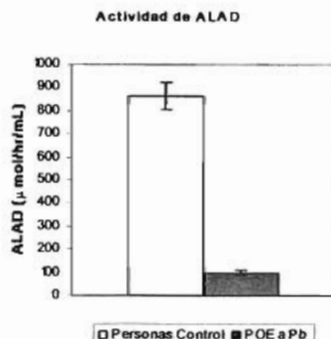


Gráfico 6. Actividad de ALAD. Promedio ± EE

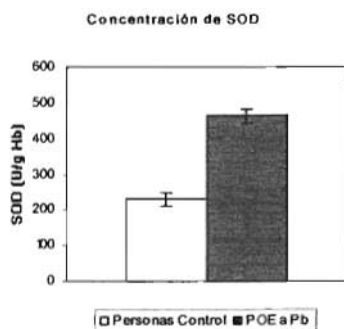


Gráfico 7. Niveles de SOD. Promedio $\pm$ EE

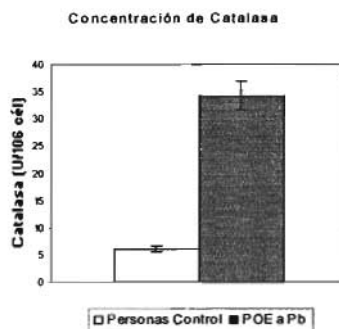


Gráfico 8. Niveles de Catalasa. Promedio $\pm$ EE

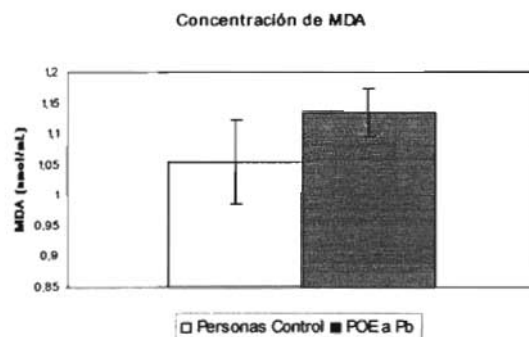


Gráfico 9. Niveles de MDA. Promedio $\pm$ EE

VIII.- Correlación entre biomarcadores de efecto y exposición a Pb

Con la finalidad de determinar la correlación entre los indicadores de toxicidad a Plomo, genotoxicidad determinada mediante el "Ensayo Cometa" y la capacidad de reparación determinado por el "Ensayo Reto" en personas control y POE a Pb, se realizaron análisis de correlaciones simples de Pearson y se determinaron los coeficientes de correlación (r). Los resultados se resumen en la tabla 10 para la población control, al igual que en los gráficos 10 al 13.

Tabla 10. Resultados del análisis de correlación simple de Pearson entre los biomarcadores de exposición a Pb y la Genotoxicidad presentes en personas control.

	LCC (μ m)	[Glutathión] (mM)	% Reparación	[Pb] (μ g/dL)	ALAD (nmol/hr/mL)	SOD (U/g Hb)	Catalasa (U/106 cel)	MDA (nmol/mL)
LCC (μ m)								
[Glutathión] (mM)	$r=0.32663$ $p=0.15984$							
%Reparación	$r=0.55067$ $p=0.11864$	$r=0.021393$ $p=0.92866$						
[Pb] (μ g/dL)	$r=0.10308$ $p=0.6654$	$r=0.18369$ $p=0.4382$	$r=0.32035$ $p=0.1685$					
ALAD (nmol/hr/mL)	$r=0.2043$ $p=0.3875$	$r=0.41087$ $p=0.07192$	$r=0.22105$ $p=0.34897$	$r=0.21388$ $p=0.3652$				
SOD (U/g Hb)	$r=0.23863$ $p=0.31094$	$r=0.14339$ $p=0.54642$	$r=0.00294$ $p=0.99017$	$r=0.00458$ $p=0.984$	$r=0.05937$ $p=0.80364$			
Catalasa (U/106 cel)	$r=0.29629$ $p=0.20464$	$r=0.20507$ $p=0.38574$	$r=0.07695$ $p=0.74712$	$r=0.03014$ $p=0.8996$	$r=0.0779$ $p=0.7434$	$r=1.3033$ $p=0.58389$		
MDA (nmol/mL)	$r=0.44669$ $p=0.048$	$r=0.19175$ $p=0.41801$	$r=0.52064$ $p=0.01859$	$r=0.42027$ $p=0.06$	$r=0.21699$ $p=0.3582$	$r=0.01824$ $p=0.93914$	$r=0.2553$ $p=0.27715$	

LCC: longitud de la cola del cometa. Los recuadros punteados representan los valores de correlación marginal, mientras que los recuadros completos muestran los valores de correlación significativos estadísticamente.

De las variables evaluadas, se eligieron las correlaciones significativas estadísticamente para las personas controles y se presentan en las gráficas 10 y 11, lo anterior tiene como propósito facilitar la interpretación de los mismos.

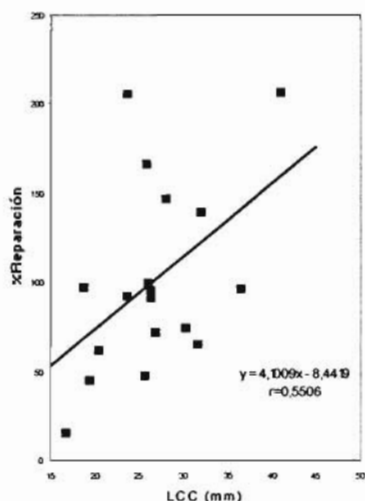


Gráfico 10. Correlación entre la genotoxicidad y el % de Reparación en Personas Control

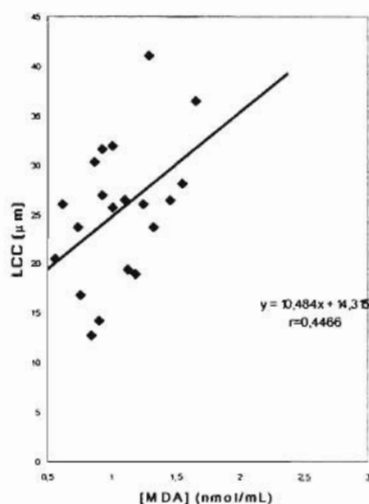


Gráfico 11. Correlación entre los niveles de MDA y la genotoxicidad en Personas Control

Las variables que mostraron correlaciones marginalmente significativos se muestran en las gráficas 12 y 13

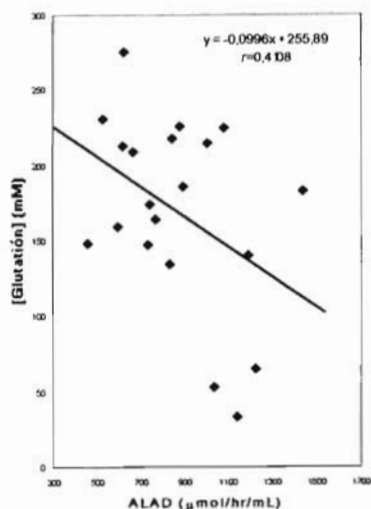


Gráfico 12. Correlación entre la actividad de ALAD y los niveles de Glutación en Personas Control

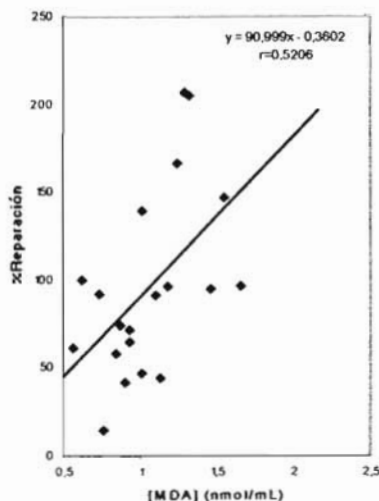


Gráfico 13. Correlación entre los niveles de MDA y el % de Reparación en Personas Control

En la tabla 11 se muestran los resultados de los resultados del análisis de correlaciones simples de las POE a Pb y la representación gráfica de los resultados significativos en los gráficos 14 - 19

Tabla 11. Resultados del análisis de correlación simple de Pearson entre los biomarcadores de exposición a Pb y la Genotoxicidad presentes en POE a Pb.

	LCC (μ m)	[Glutación] (mM)	% Reparación	[Pb] (μ g/dL)	ALAD (mmol/hr/mL)	SOD (U/g Hb)	Catalasa (U/106 cel)	MDA (nmol/mL)
LCC (μ m)								
[Glutación] (mM)	$r=0.35623$ $p=0.17565$							
%Reparación	$r=0.49551$ $p=0.0509$	$r=0.24453$ $p=0.36137$						
[Pb] (μ g/dL)	$r=0.09161$ $p=0.7357$	$r=0.17202$ $p=0.52408$	$r=0.01464$ $p=0.957$					
ALAD (mmol/hr/mL)	$r=0.21341$ $p=0.4274$	$r=0.11776$ $p=0.66404$	$r=0.47394$ $p=0.0636$	$r=0.0685$ $p=0.80096$				
SOD (U/g Hb)	$r=0.01794$ $p=0.9474$	$r=0.15756$ $p=0.56004$	$r=0.09897$ $p=0.71536$	$r=0.45662$ $p=0.07541$	$r=0.11901$ $p=0.66067$			
Catalasa (U/106 cel)	$r=0.25617$ $p=0.33822$	$r=0.79408$ $p=0.00023$	$r=0.03267$ $p=0.90438$	$r=0.17454$ $p=0.5179$	$r=0.05974$ $p=0.82604$	$r=0.17028$ $p=0.52837$		
MDA (nmol/mL)	$r=0.15059$ $p=0.5777$	$r=0.33062$ $p=0.21102$	$r=0.50391$ $p=0.04657$	$r=0.12535$ $p=0.64366$	$r=0.58574$ $p=0.01711$	$r=0.39896$ $p=0.12582$	$r=0.40997$ $p=0.11476$	

LCC: longitud de la cola del cometa. Los recuadros punteados representan los valores de correlación marginal, mientras que los recuadros completos muestran los valores de correlación significativos estadísticamente.

Las correlaciones significativas estadísticamente para las personas ocupacionalmente expuestas se presentan a continuación en forma gráfica, lo cual tiene como propósito facilitar la interpretación de las mismas.

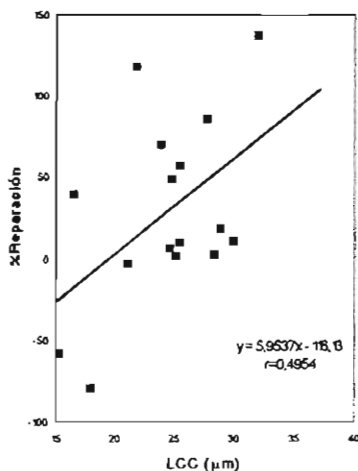


Gráfico 14. Correlación entre la genotoxicidad y el % de Reparación en POE a Pb

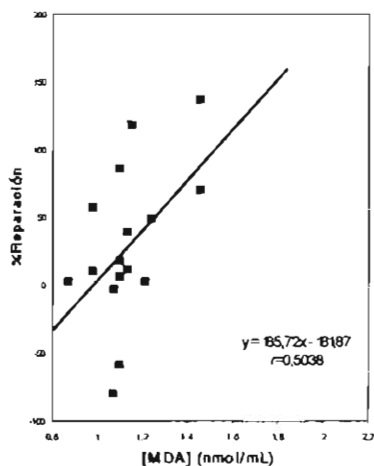


Gráfico 15. Correlación entre los niveles de MDA y el % de Reparación en POE a Pb

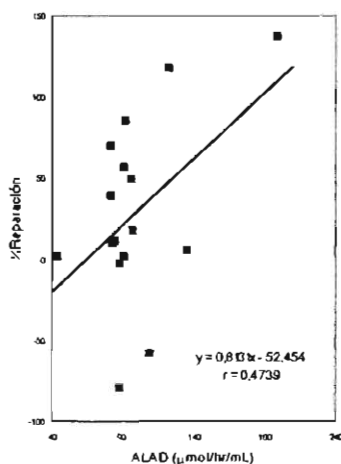


Gráfico 16. Correlación entre la actividad de ALAD y el % de Reparación en POE a Pb

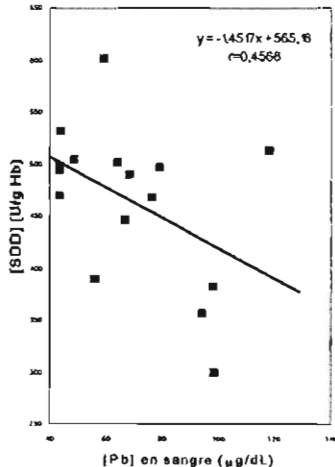


Gráfico 17. Correlación entre la [Pb] en sangre y los niveles de SOD en POE a Pb

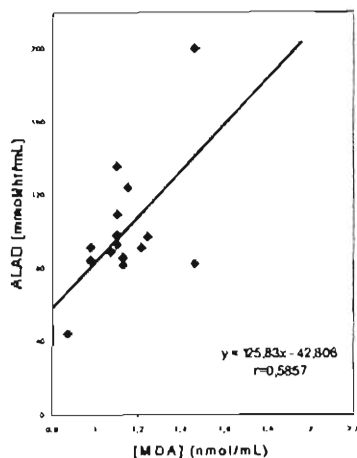


Gráfico 18. Correlación entre los niveles de MDA y la actividad de ALAD en POE a Pb

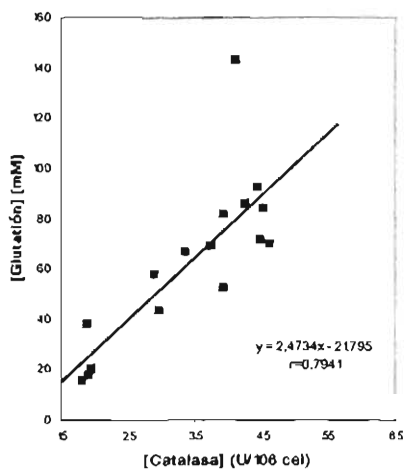


Gráfico 19. Correlación entre los niveles de Catalasa y Glutathión en POE a Pb

Discusión

El presente trabajo se dio a la tarea de monitorizar un grupo de trabajadores expuestos laboralmente a plomo con la finalidad de evaluar daño al ADN y evidenciar alteraciones sobre el funcionamiento de los mecanismos de reparación del ADN. El grupo de POE a Pb se encuentra crónicamente en contacto con el metal, a pesar de ello los efectos citotóxicos son nulos, tal como se muestra en la tabla 2, el mismo resultado lo mostraron los individuos control al determinarse la actividad metabólica del lisosoma. Estos resultados también son indicativos de la buena preservación de las muestras hasta su análisis en el laboratorio y, por ende, la confiabilidad en las determinaciones de genotoxicidad realizadas.

En cuanto al efecto genotóxico determinado por la exposición laboral a Pb, cabe señalar que éste fue inesperado puesto que en trabajos previos realizados en el laboratorio habíamos determinado la inducción de rompimientos en el ADN por la exposición *in vitro* al metal (Valverde *et al.*, 2000 y Valverde *et al.*, 2001), sin embargo, en el presente proyecto no se detectó la inducción de rompimientos de cadena sencilla del ADN en individuos expuestos laboralmente a Pb. Este resultado además de no coincidir con los hallazgos previos llama la atención puesto que los individuos expuestos presentan niveles de Pb en sangre que rebasan los límites permisibles en mas de 12 veces, tal como se muestra en la tabla 9. Nuestros resultados indican que la exposición laboral a plomo no genera clastogenicidad en células mononucleares, esto puede deberse a la capacidad del metal para generar entrecruzamientos DNA-proteína (Valverde *et al.*, 2001; Silbergeld, 2003; Wozniak y Błasiak, 2003) el cual es un evento molecular que en el ensayo de electroforesis unicelular se evidencia como una reducción de la migración de las colas de los cometas (Tice *et al.*, 2000); esta tendencia se muestra en la tabla 3 y la gráfica 2.

Si bien no se determinaron efectos sobre la integridad del ADN de las POE a Pb si fue posible evidenciar alteraciones genotóxicas en la funcionalidad de los mecanismos de reparación del ADN, encargados de mantener la integridad del mismo. Antecedentes previos (Hartwig, 1994; 1995; 1998; Hartwig y Schwertle 2002), proponen como mecanismo de acción indirecto del Pb, inducir alteraciones en los mecanismos de

reparación del ADN, al igual que Ariza *et al.*, 1999 lo propone como mecanismo indispensable para explicar la carcinogenicidad debida a la exposición a este metal.

Los resultados de la capacidad de reparación del ADN de los individuos monitorizados se muestran en la tabla 7, donde es posible apreciar que los individuos expuestos tienen una capacidad de reparación del 29%, mientras que los controles reparan en un 95 % el daño inducido, esto nos indica que el estar en contacto con el Pb, es un factor de riesgo para acumular daños en el material genético que pudieran traducirse a la formación de mutaciones y con ello desencadenar un proceso de transformación. Debido a que se empleo radiación gamma como reto genotóxico, sabemos que el mecanismo principalmente involucrado en la remoción de este daño es la reparación por escisión de bases (REB), es por ello que nosotros proponemos que un mecanismo indirecto de genotoxicidad del Pb es la alteración sobre este mecanismo de reparación de ADN. Retomando los resultados tanto de genotoxicidad como de evaluación de la capacidad reparativa del ADN, podemos proponer que la exposición crónica al metal es un factor de susceptibilidad a la acumulación de daños deletéreos sobre el material genético.

En cuanto a los marcadores de exposición, en el presente trabajo se determinaron los niveles intracelulares de GSH, encontrándose una disminución significativa de ellos en las POE a Pb (tabla 8 y gráfica 4), lo cual era de esperarse puesto se ha reportado que el Pb tiene la capacidad de inhibir proteínas con grupos SH funcionales como los presentes en el GSH (Valle *et al.*, 1972; Gurer *et al.*, 1999; Gurer y Ercal, 2000). Con base en los niveles de GSH intracelular que fueron 3 veces menores con respecto a los niveles presentes en los individuos control se puede inferir que los trabajadores se encuentran expuestos crónicamente, además de confirmar que los niveles de GSH son un buen biomarcador de exposición a Pb y se comporta tal como lo reportan otros trabajos (Costa *et al.*; 1997; Gurer *et al.*; 1999; Gurer *et al.*; 2004). Este resultado además nos indica la presencia de estrés oxidativo puesto que indirectamente se refleja una pérdida del balance GSH/GSSG (Ariza *et al.*, 1999; Gurer *et al.*, 2004).

El estado de estrés oxidativo también fue reflejado a nivel de otros antioxidantes de suma importancia para mantener la homeostasis celular los cuales fueron catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Estos resultados se muestran en la tabla 9 y las gráficas 7 y 8. A diferencia de los niveles de GSH, los niveles de catalasa incrementaron 6 veces y los de

SOD 2 veces en los individuos expuestos a Pb con respecto a las personas control. Estos resultados indican la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales inducen la actividad de estas enzimas antioxidantes, pudiendo inferir que una de ellas con certeza es el H_2O_2 , puesto que es el sustrato que induce a la catalasa, siendo esta última quien lo hidroliza. En el caso de la SOD, el incremento de sus niveles indirectamente refleja que el ión superóxido está presente en menor cantidad que el H_2O_2 , pero es suficiente para inducir la actividad de la enzima que cataliza esta reacción. En conjunto estos resultados indican que la exposición a Pb es un factor que desencadena la producción intracelular de ERO las cuales tienen como blancos moleculares tanto al ADN, como proteínas y lípidos (Gurer y Ercal, 2000), sin embargo, los efectos evaluados a nivel de lípidos de membrana no reflejan que estas ERO hubieran ejercido efectos a este nivel tal como se muestra en la tabla 9 y en la gráfica 9 donde los niveles intracelulares de MDA son iguales entre las POE a Pb y los controles. Además, estos resultados indican que muy probablemente los ERO no alcanzaron estos efectos debido a que fueron inducidos los antioxidantes catalasa y SOD.

Con el fin de responder el objetivo de correlacionar los efectos genotóxicos determinados por la exposición laboral a Pb con los biomarcadores de exposición se elaboraron correlaciones simples de Pearson las cuales se muestran en las tablas 10 y 11. Los resultados de la correlación entre la genotoxicidad (LCC) vs el % Reparación (gráficas 10 y 14) apoyan en parte la hipótesis de que una alteración en los mecanismos reparativos del ADN influyen sobre la estabilidad e integridad del material genético planteada en el presente trabajo, ya que muestra como significativa la correlación entre ambos parámetros. Además sugiere que los rompimientos de ADN pueden deberse a ciclos de reparación inconclusos.

Sin embargo los mecanismos por los cuales un xenobiótico como el Pb, logra causar daño al ADN son diversos (Gurer y Ercal, 2000, Silbergeld, 2003). La alteración de la homeostasis celular es una de ellas, y esta dada por alteraciones en diferentes procesos bioquímicos intracelulares. Uno de los factores involucrados en la pérdida de este equilibrio se refleja en reacciones de lipoperoxidación, en donde se generan productos altamente tóxicos, siendo el más abundante el malondialdehído (MDA), este es capaz de generar genotoxicidad por sí mismo, lo cual se refleja únicamente en los individuos control (gráfica 11). Sin embargo, otro efecto que muestra la capacidad de interacción entre el

MDA y el DNA de manera indirecta se deduce de la correlación entre los niveles de este aldehído y los efectos sobre la capacidad reparativa del DNA. Dicha correlación muestra que a mayores niveles de MDA hay incremento en la capacidad de reparación (gráficas 13 y 15), lo cual puede interpretarse como que al generarse daño oxidativo por parte del aldehído tóxico se activan los mecanismos de reparación que contrarrestan este efecto que indirectamente se produce por la presencia del Pb.

Otro evento que altera la homeostasis es la acumulación de ácido δ aminolevulínico (ALA) tal y como lo describe Monteiro *et al.*, 1989 y Oteiza *et al.*, 1995. La inhibición de la ácido δ aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD) por el Pb provoca que el ALA se acumule, lo cual, seguido de una autooxidación, generación al radical ALA $\cdot$. La presencia del radical ALA $\cdot$ puede causar daños por sí mismo o desencadenar la formación de especies prooxidantes, en ambos casos, el ADN es un blanco de dichos radicales libres, por lo que se favorecen eventos genotóxicos. En nuestros resultados dichos eventos a causa de la inhibición de ALAD (gráfica 6) fueron contrarrestados por la eficiente actividad antioxidante (gráfica 4, 7 y 8) por lo que la correlación entre los niveles de MDA con la actividad de ALAD describe una pendiente positiva tal como se muestra en el gráfico 18. Este mismo argumento podría explicar lo descrito en la gráfica 16, ya que se esperaba una pendiente negativa entre la actividad de ALAD vs % Reparación, sin embargo, lo que sí podemos afirmar es que la presencia del radical ALA $\cdot$ no logra tener influencia directa sobre la capacidad reparativa. Por otro lado, la importancia de la protección antioxidante mediada por el glutatión para que la ALAD cumpla sus funciones dentro de la síntesis del grupo hemo se demuestra en la gráfica 12.

Finalmente, nuestros resultados indican que altas concentraciones de Pb en sangre generan mediante algún mecanismo de acción indirecto la presencia del ión superóxido y por ende se induce a la SOD (gráfica 5), sin embargo al describirse una pendiente negativa en la gráfica 17, se deduce que esta enzima disminuye su participación conforme incrementa los niveles de Pb en sangre, lo cual sugiere que esta por alcanzarse su nivel de saturación en términos de cinética enzimática. Más aún es de resaltar que en POE a Pb la mayor defensa antioxidante está dada por la catalasa y el triptéptido glutatión (gráfica 6 y 7) y es por ello que al determinarse altos niveles intracelulares de ambos en las POE a Pb se esperaba encontrar una correlación positiva entre estos antioxidantes tal cual se describe en la gráfica 19, en donde indirectamente los resultados evidencian que

el H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno que se genera considerablemente y esta involucrado como mecanismo indirecto de la toxicidad del Pb. Además considerando los antecedentes publicados sobre la inhibición de la enzima ferroquelatasa por Pb (Onalaja *et al.*, 2000), se puede pensar que el ión Fe^{2+} libre en el torrente sanguíneo y el H_2O_2 presente, generen radicales $\text{OH}^\cdot$ mediante la reacción de Fenton, pudiendo ser extremadamente dañinos para blancos moleculares como el ADN.

En conjunto de este trabajo puede concluirse que la exposición laboral a Pb, rebasando los niveles permisibles propuestos (www.cie.iarc.fr) desencadena una serie de mecanismos indirectos de genotoxicidad como lo son alteraciones en el balance antioxidante, y alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA, reflejando que la cronicidad en la exposición puede abatir los mecanismos que mantienen la integridad del material genético pudiendo a largo plazo desencadenar un proceso de transformación celular.

Conclusiones

- Los niveles de exposición a Pb en individuos que laboran en una planta de reciclamiento de acumuladores rebasa 12 veces los niveles permisibles del metal en sangre.
- El efecto genotóxico del plomo evaluado como rompimientos de cadena sencilla en el ADN es poco descriptivo del daño causado por el metal.
- En personas ocupacionalmente expuestas a plomo, la inhibición de la capacidad reparativa del ADN fue de alrededor de un 70%.
- La defensa antioxidante (SOD, catalasa y glutatión) se encuentra incrementada en personas ocupacionalmente expuestas a plomo.
- La catalasa, el glutatión y la superóxido dismutasa son moléculas antioxidantes que pueden considerarse indicadores bioquímicos de exposición laboral a plomo.
- La correlación entre genotoxicidad e indicadores bioquímicos de exposición fue positiva entre porcentaje de reparación y niveles de MDA, así como también con la actividad de ALAD en POE a Pb.
- Hubo correlación entre algunos bioindicadores de exposición como [Pb] vs niveles de SOD; [MDA] vs actividad de ALAD y entre los niveles de catalasa vs glutatión en POE a Pb.
- Los efectos genotóxicos producidos por la exposición a plomo son generados por mecanismos de acción indirectos.

Bibliografía

- ⊗ Apostoli, P; Bellini, A; Porru, S; Bisanti, L; The effect of lead on male fertility: a time to pregnancy (TTP) study; *Am J In Med*, 38: 310-315; 2000
- ⊗ Ariza, ME; Bijur, GN; Williams, MV; Enviromental Metal Pollutants, Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity, *Molecular Approaches to Determine Mechanisms of toxicity*; Kluwer Academic Publishers; USA; pp 189; 1999
- ⊗ Basaran, N; Ünderger, Ü; Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers; *Am J Ind Med*, 38: 394-354; 2000
- ⊗ Bonsignore, D; Calissano, P; Cartasegna C; Un semplice metodo per determinazione della δ -amino-levulinico deidratase nel sangue. Comportamento dell'enzima nell'intossicazione saturnina. (A simple method for the determination of δ -aminolevulinic acid dehydratase in the blood. Tolerance of enzyme in lead poisoning); *Med Lavoro*, 56:199-205; 1965
- ⊗ Calderón-Salinas, JV; Valdéz-Anaya, B; Mazúñiga-Charles; Albores-Medina, A; Lead exposure in a population Mexican children; *Human Exp Toxicol*, 15: 305-311; 1996
- ⊗ Calsou, P; Frit, P; Bozzato, C; Salles, B; Negative interference of metal (II) ions with nucleotide excision repair in human cell-free extracts; *Carcinogenesis*, Dec; 17(12): 2779-82; 1996
- ⊗ Carreón, T; López, L; Romineu, I; Manual de procedimiento en la toma de muestras de biológicas y ambientales para determinar niveles de plomo; Editado por CPEHS, DSA, OPS, OMS, INSP y DDF; México, 1995
- ⊗ Chang, R; Química, Relaciones periódicas entre los elementos; Sexta Edición; Ed Mc Graw-Hill; México; pp 312; 1999

- © Columbano, A; Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate; *Am J Pathol*; 110:83-88; 1983

- © Columbano, A; Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: Different effect of hepatic regeneration and mitogen induced hyperplasia on the development of enzyme-altered foci; *Carcinogenesis*; 11:771-776; 1990

- © Costa, CA; Trivelato, GC; Pinto, AMP; Bechara, EJH; Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers; *Clin Chem*; 43:1196-1202; 1997

- © Dally, H; Hartwig, A; Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells; *Carcinogenesis*; 18: 1021-6; 1997

- © Danizeau, F; Marion, M; Genotoxic effects of heavy metals in rat hepatocytes; *Cell Biol Toxicol*; 5:15-25; 1989

- © Devi, KD; Banu, BS; Grover, P; Jamil, K; Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay); *Toxicology*; 145:195-201; 2000

- © Eichhor, GL; Shin, YA; Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds, XII; The relative effect of various metal ions on DNA helicity; *J Am Chem Soc*; 90: 7323; 1968

- © Ercal, N; Treratphan, P; Hammond, TC; Mathews, RH; Grannemann, NH; Spitz, DR; In vivo indices of oxidative stress in lead exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine; *Free Radical Biol Med*; 21:157-61; 1996

- © Fernández-Cabezudo, MJ; Hasan, MY; Mustaf, N; El-Sharkawy; Fahim, MA; AL-Ramadi, BK; Alpha tocopherol protects against immunosuppressive and immunotoxic effects of lead; *Free Radical Research*; 37: 437-445; 2003

- ⊗ Fischer, A.B.; Skreb, Y; In vitro toxicology of heavy metals using mammalian cells: an overview of collaborative research data; *Arh Hig Rada Toksikol* 52: 333-354; 2001
- ⊗ Fomi, A; Cambiaghi, G; Secchi, GC; Initial occupational exposure to lead; chromosome and biochemical findings; *Arch Environ Health*, 31:73 ; 1976
- ⊗ Fortoul, TI; Salgado, RC; Moncada, SG, Sánchez, IG; López, IE; Espejel, G; Calderón, NL; Saldivar, L; Ultrastructural findings in the murine nonciliated bronchiolar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate; *Acta Vet. BRNO*, 68: 51-55; 1999
- ⊗ Foulkes, EC; Biological Effects of Heavy Metals, Volume II, Metal Carcinogenesis; CRC Press; USA; pp 44-75; 1990
- ⊗ Groot de Restrepo, H; Sicard, D, Torres, MM; DNA damage and repair in cells of lead exposed people; *Am J Ind Med*; 38: 330-334; 2000
- ⊗ Gurer, H; Ozgunes, H; Neal, R; Spitz, DR; Ercal, N; Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed. *Toxicology*, 128:181-189; 1998
- ⊗ Gurer, H; Ozgunes, H; Oztuzcan, S; Ercal, N; Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity; *Free Radical Biol Med*, 27: 75-81; 1999
- ⊗ Gurer, H; Ercal, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?; *Free Radical Biol Med*, 29(10): 927-945; 2000
- ⊗ Gurer-Orhan, H; Sabir, HU; Özgünes H; Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers; *Toxicology*, 195: 147-154; 2004
- ⊗ Haeger-Aronsen, B; Studies on urinary excretion of 5-aminolevulinic acid and other haem precursors in lead workers and lead-intoxicated rabbits; *Scand J Clin Lab Invest*, 12(suppl 47):1-128; 1960

- © Hartmann, M; Hartwig, A; Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel (II) and Cadmium (II) in mammalian cells; *Carcinogenesis*, 19:617-21; 1998

- © Hartman, A. G.; Speit; Genotoxic effects of the chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE); *Mutat Res* 346:49-56; 1995

- © Hartwig, A; Schlepegrell, R; Beyersmann, D; Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells; *Mutat Res.*; 241(1):75-82; 1990

- © Hartwig, A; Role of DNA repair inhibition in lead-and cadmium-induced genotoxicity: a review; *Environ Health Perspect*, 102(suppl3):45-50; 1994

- © Hartwig, A; Current aspects in metal genotoxicity; *Bio Metals*, 8:3-11; 1995

- © Hartwig, A; Schlepegrell, R; Beyersmann, D; Analysis of metal-induced oxidative DNA damage in cultured mammalian cells; *Anal Bioanal Chem*, 354:676-8; 1996

- © Hartwig, A; Groblichhoff, UD; Beyersmann, D; Natarajan, AT; Filon, R; Mullenders, LH; Interaction of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts; *Carcinogenesis*, 18:399-405; 1997

- © Hartwig, A; Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition; *Toxicol Lett*, 28;102-103:235-9; 1998

- © Hartwig, A; Schwerdtle, T; Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications; *Toxicol Lett*, 127: 47-54; 2002

- © Hengstler, JG; Bolm-Audorff, U; Faldum, A; Janssen, K; Reifenrath, M; Gotte, W; Jung, D; Mayer-Popken, O; Fuchs, J; Genhard, S; Bienfait, HG; Schlink, K; Dietrich, C; Faust, D; Epe, B; Oesch, F; Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherton expected; *Carcinogenesis*, 24: 1853-4; 2003

- © Hernberg, S; Lead poisoning in historical perspective; *Am J Ind Med*. 38: 244-254; 2000
- © Hernández, F; Curso de Toxicología; Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, 2003
- © Johanson, FM; The genetic effects of environmental lead; *Mutat Res*, 410:123-40; 1998
- © Kasperczyk, S; Kasperczyk A; Ostalowska A; Dziwisz, M; Birkner E; Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes workers exposed to lead; *Biol Trace Elem Res*, 102:61-72; 2004
- © Kasten, U; Mullenders, LH; Hartwig, A; Cobalt (II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in humans fibroblasts; *Mutat Res*, 31: 383; 81-9; 1997
- © Klaassen CD; Watkins III, JB; Casarett & Doull's, Toxicology, The basic science of poisons; Fifth Edition; McGraw Hill; USA; pp 861; 1999
- © Lynn, S; Lai, HT; Kao, ST; Lai, J; Jan, KY; Cadmium inhibits DNA strand break rejoining in methyl methanesulfonate-treated CHO-K1 cells; *Toxicol Appl Pharmacol*, May; 144(1); 171-6; 1997
- © Minozzo, R; Deimling, LI; Gigante, LP; Santos-Mello, R; Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead; *Mutat Res*, 565:53-60; 2004
- © Monteiro, HP; Abdalla, DSP; Augusto, O; Behara, EJH; Free radical generation during D-aminolevulinic acid autooxidation: induction by haemoglobin and connections with porphyriopathies; *Arch Biochem Biophys*, 271:206-216; 1989
- © Nordberg, M; Winblad, B; Fratiglioni, L; Basun, H; Lead concentrations in elderly urban people related to blood pressure and mental performance: results from a population-based study; *Am J Ind Med*, 38:290-294; 2000

- © Oteiza, PL; Kleinman, CG; Demasi, M; Bechara, EJH; 5-aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys*; 316:607-611; 1995
- © Onalaja, A; Claudio, L; Genetic susceptibility to lead poisoning; *Environ. Health Perspect*, 108 suppl; 1:123-8; 2000
- © Palus, J; Rydzynski, K; Dziubaltowska, E; Wyszynska, K; Natarajan, AT; Nilsson, R; Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium; *Mutat Res*, 540: 19-28; 2003
- © Quintanilla-Vega, B; Hoover, D; Bal, W; Silbergeld, EK; Waalkes, MP; Anderson, LD; Lead effects on protamine-DNA binding; *Am J Ind Med*. 38: 324-329; 2000
- © Rojas, E; Herrera, LA; Poirier, LA; Ostrsky Wegman, P; Are metals dietary carcinogens?; *Mutat Res*; 443:157-181; 1999
- © Rojas, E.; López, M.C.; Valverde, M.; Single cell electrophoresis assay: methodology and applications; *J. Chromatogr. B*; 727:225-254; 1999
- © Roy, NK; Rossman, TG; Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds; *Mutat Res*; 298:97-103; 1992
- © Saxena, G; Flora, SJS; Lead-induced oxidative stress and haematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats; *J Biochem Mol Toxicol*, 18(4): 221-233; 2004
- © Scicchitano, DA; and Pegg, AE; Inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals; *Mutat Res*. 192:27; 1987
- © Schnaas, L; Rothenberg, SJ; Flores, MF; Martinez, S; Hernandez, C; Osorio, E; Perroni, E; Blood lead secular trend in a cohort of children in Mexico City (1987-2002); *Environ Health Perspect*, 112:1110-5; 2004
- © Silbergeld, EK; Waalkes, M; Rice, JM; Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action; *Am J Ind Med*; 38:316-323; 2000

- © Silbergeld; E.K.; Facilitative mechanism of lead as a carcinogen; *Mutat Res*, 533:121-133; 2003
- © Sing, N.P.; Mc Coy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider; E.L.; A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells; *Exp Cell Res*, 175:184-191; 1998
- © Skoczynska A; Lipid peroxidation as a toxic mode of action for lead and cadmium; *Med Pr*; 48:197-203; 1997
- © Snyder, R.D.; Davis, G.F., Lachmann, P.J.; Inhibition by metals of X-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells; *Biol Trace Elem Res*, 21:389-398; 1989
- © Stanley, E; Toxicological chemistry and biochemistry; third edition; *Lewis Publishers*; USA; pp 425; 2003
- © Strauss, G.H.S.; Non random cell killing in cryopreservation; implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), Toxic and immunotoxic effects; *Mut Res*; 252:1-15; 1991
- © Sugawara, E; Nakamura, K; Miyake,T; Fukumura, A; Seki, Y; Lipid peroxidation of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead; *Br J Ind Med*; 48: 239-42; 1991
- © Tajmir-Riahi, HA; Langlais, M; Savsje, R; A laser Raman spectroscopic study of the interaction of calf-thymus DNA with Cu (II) and Pb (II) ions: metal ion binding and DNA conformational changes, *Nucl Acids Res*, 16:751; 1988
- © Tice; R; Aguller, E; Anderson, D; Burlinson, B; Hartman A; Kobayashi, H; Miyamae, Y; Rojas,E; Ryu, JC; Sasaki, Y; Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing; *Environ Mol Mutagen*, 35:206.21; 2000
- © Valle, B; Ulmer, D; Biochemical, effects of mercury, cadmium and lead; *Annu Rev Biochem*, 41:91-128; 1972

- © Valverde, M; Trejo, C; Rojas, E; Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?; *Mutagenesis*, 16(3): 265-270; 2001
- © Valverde, M; Fortoul, T; Díaz-Barriga, F; Mejía J; Rojas E; Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis* 17 (1):55-61; 2002
- © Voet, D; Voet, JG; Bioquímica; Ed. Omega; pp 1315; 1992
- © Villeda-Hernández, J; Barroso-Moguel, R; Mendez-Armenta,M; Nava-Ruiz, C; Huerta-Romero,R; Rios, C; Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull*, 55: 247-251; 2001
- © www.ine.gob.mx/dgicurg/sqre/diagplomo.html (Marzo 2005)
- © www.cie.iarc.fr (Mayo2005)
- © Wozniak, K; Blasiac, J; In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links; *Mutat Res*; 535:127-39; 2003
- © Yang, J.L.; Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hidroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate; *Environ Mol Mutagen*, 33:194-201; 1999
- © Ye, X-b; Fu, H; Zhu, J-l; A study on oxidative stress in lead-exposed workers; *J Toxicol Environm Health*, 56:161-172; 1999
- © Zelikoff, J.T.; Genetic toxicology of lead compounds; *Carcinogenesis*, 9:1727-1732; 1988