



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Actividad genotóxica de afloramientos externos del
confinamiento de residuos de cromo de “Cromatos
de México” en Lechería, Edo. de México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

PABLO ANTONIO LEDEZMA VACA

Directora de Tesis: Dra. Patricia Ramos Morales

MÉXICO, D. F.

PAPIME

2006



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.

1. Datos del alumno
Ledezma
Vaca
Pablo Antonio
56-35-38-18
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
2. Datos del sinodal 1
Dra.
Patricia
Ramos
Morales
3. Datos del sinodal 2
Dr.
Jesús Javier
Espinosa
Aguirre
4. Datos del sinodal 3
Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte
5. Datos del suplente 1
M. en C.
Adriana
Muñoz
Hernández
6. Datos del suplente 2
Biólogo
Rodolfo Omar
Arellano
Aguilar

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto PAPIME: EN206803, DGAPA, UNAM. El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Indice

Introducción	3
El cromo	3
El cromo como elemento	3
Usos	3
El cromo en el ambiente	4
Distribución	4
Exposición	4
Dispersión	5
Aspectos de la toxicidad del cromo	8
El cromo hexavalente	9
Cr[VI], metal de interés para la salud	15
Toxicidad	15
Teratogenicidad	16
Carcinogenicidad	16
Cromatos de México, S.A. de C.V	18
Biomonitores y biomarcadores	23
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico	26
Características y ventajas del modelo	27
Determinación del sexo en <i>D. melanogaster</i>	27
Aspectos cromosómicos de la determinación del sexo	27
Genes de determinación del sexo en <i>D. melanogaster</i>	28
Origen de las cargas cromosómicas anormales	30
Mosaicos sexuales en <i>D. melanogaster</i>	31
La prueba de pérdida y no disyunción de cromosomas sexuales	32
(“Sex chromosome loss test”)	
Justificación	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares	33
Hipótesis	34
Métodos	34

Obtención de la muestra ambiental	34
Cruza y marcadores	35
Descripción de marcadores morfológicos	35
Líneas de moscas	36
Procedimiento experimental	37
Concentraciones	37
Desarrollo de la prueba SCLT	38
Obtención de los resultados de la prueba SCLT	38
Análisis estadístico	41
Resultados	43
1. Muestra ambiental	43
Análisis espectrofotométrico de las muestras ambientales	43
2. Cruzas Masivas	45
Sobrevivencia de los organismos tratados para cruzas masivas	45
Resultados de las cruzas masivas	47
Pruebas multinominales para cruzas masivas	49
3. Cruzas individuales	49
Sobrevivencia de los organismos tratados para cruzas individuales	49
Resultados de las cruzas individuales	52
Pruebas multinominales para cruzas individuales	53
Análisis de fecundidad	54
Discusión	58
La muestra ambiental	58
Los organismos tratados	60
La prueba de clastogenia SCLT	61
Cruzas masivas	61
Cruzas individuales	63
Análisis de fecundidad de los machos tratados	65
La situación actual de Cromatos: una zona de alto riesgo para la población	66
Conclusiones	71
Bibliografía	72

Introducción

El cromo

El cromo como elemento

24
Cr
Cromo
51.9961

Número atómico: 24
Peso atómico: 51.9961
Punto de fusión: 2180 K (1907°C)
Punto de evaporación: 2944 K (2671°C)
Densidad: 7.15 g.cm⁻³
Fase a temperatura ambiente: Sólida
Clasificación: Metal

Historia

El cromo fue descubierto por Louis Nicholas Vauquelin en 1797, siendo este aislado del mineral conocido como Crocoíta (PbCrO₄). Al mezclar el mineral con ácido clorhídrico, obtuvo trióxido de Cromo (CrO₃), y aunque Vauquelin creyó que no existía todavía un método adecuado para aislar el cromo, él mismo se sorprendió en 1798 al descubrir que podía obtener cromo metálico simplemente con calentar el óxido de cromo en un horno de carbón. Hoy en día el Cromo metálico se obtiene calentando la Cromita (FeCr₂O₄) en presencia de Aluminio o Silicón (Depault *et al.*, 2004).

Abundancia terrestre estimada: 1.02×10² mg.kg⁻¹

Número de Isótopos estables: 3

Configuración electrónica: 1s²
2s² 2p⁶
3s² 3p⁶ 3d⁵
4s¹

Abundancia oceánica estimada: 3×10⁻⁴ mg.L⁻¹

Estados oxidativos: Cr[0] ; Cr[III] ; Cr[VI]

Usos

El cromo es utilizado en pinturas, blanqueadores, esmaltes, preservadores para madera, soluciones para el curtido de pieles, antioxidante de metales, entre otros. Sin embargo, el uso predominante del cromo es para la producción de Acero inoxidable y el chapado con cromo (Depault *et al.*, 2004).

El cromo en el ambiente

- **Distribución**

El cromo se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente. En la corteza terrestre, se estima que se encuentra en promedio a una concentración de $1.02 \times 10^2 \text{ mg.kg}^{-1}$. De la misma manera se encuentran pequeñas cantidades en el suelo, el agua, los organismos y en la atmósfera. Así pues, aunque el cromo (Cr) es liberado al ambiente de manera natural a partir de yacimientos, la gran mayoría del cromo disponible deriva de la actividad antropogénica (Depault *et al.*, 2004). El Cr[0] se encuentra generalmente en su forma metálica o formando aleaciones con metales como Níquel, Hierro y Cobalto. De hecho, es el acero inoxidable el material que contiene la mayor proporción de cromo metálico. Si bien el Cr[0] es relativamente estable a la oxidación, los cambios de temperatura y el contacto con agentes corrosivos puede llevar a la formación de estados de mayor oxidación como Cr[III] ó Cr[VI] (Zhitkovich, 1996; 1998; 2000; 2002; 2004) (Fig. 1).

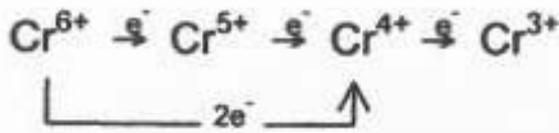


Fig. 1. Cambios termodinámicos a partir del Cr[VI]. Estos cambios suelen darse de manera natural dado el E^0 (potencial estándar de electrodo) del Cr[VI], pero en los organismos el proceso se acelera por reducción (a partir de O'Brien *et al.*, 2003).

- **Exposición**

A nivel mundial, se estima que varios millones de trabajadores están potencialmente expuestos al cromo y a diversos compuestos cromados (IARC, 1990; ATSDR, 1993; EPA, 2000) que pertenecen aproximadamente a unos 70 diferentes tipos de industrias.

Las exposiciones más altas a Cr[VI] ocurren en la industria cromadora (chapado con cromo), en la producción de cromatos y en la fundición de acero inoxidable (Medeiros *et al.*, 2003). La población que vive en las inmediaciones de tiraderos de cromo, plantas que manufacturan o realizan procesos relacionados con éste, tienen una mayor probabilidad de una exposición a niveles elevados. Comúnmente, las exposiciones son a una mezcla formada por Cr[VI] y Cr[III] (EPA, 2000). Con respecto a la interacción con los organismos, existen aspectos interesantes que considerar:

- El Cromo [III] es esencial en el desarrollo normal del metabolismo de glucosa, proteínas y grasas, consecuentemente se trata de un elemento indispensable en la dieta (EPA, 2000). Existen incluso complementos alimenticios para aquellas personas que no llevan una dieta balanceada en cromo.
- Por otra parte, a pesar de que el Cr sirve como nutriente, no existe evidencia de que el cromo en cualquiera de sus estados se acumule a través de la cadena alimenticia (EPA, 2000).

- **Dispersión del cromo**

Los factores que regulan la dispersión del cromo están directamente relacionados con la manera en la que los organismos pueden exponerse al elemento en sus diferentes estados de oxidación. Consecuentemente se debe considerar que:

- Las emisiones aéreas de cromo son predominantemente en la forma de pequeñas partículas o aerosoles, con una abundancia casi total de Cr[III] (ATSDR, 1998).
- Las mayores fuentes de cromo para la atmósfera son industriales, particularmente aquellas relacionadas con la producción ferrocromica. La refinación y extracción de menas, procesos químicos, fábricas cementeras, elaboración de instrumentos de frenado para vehículos, curtidoras de cuero y fabricación de pigmentos a base de cromo, son elementos que también contribuyen a la presencia atmosférica del cromo (EPA, 1998).
- De manera general, las poblaciones se encuentran expuestas al cromo (generalmente Cr[III]) a través de la ingestión de alimentos, de agua o por la inhalación de aire que contenga el elemento. El consumo diario promedio por aire, agua y comida se estima en una cantidad menor de 0.2 a 0.4 microgramos (μg), 2.0 μg , y 60 μg , respectivamente (ATSDR, 1998). Las exposiciones dérmicas al cromo pueden ocurrir cuando se tiene contacto con productos, como madera tratada con dicromato de cobre o pieles curtidas con sulfato crómico (ATSDR, 1998).
- Así pues, el mecanismo de ingreso para el Cr puede ser por ingestión, respiración o contacto. Desafortunadamente esto no implica que las exposiciones al cromo sean de un solo tipo para los organismos, ya que como se ha visto, el cromo se encuentra en el aire, en el agua y en los alimentos, siendo emitido por una o varias fuentes que pueden estar

presentes de manera simultánea, por lo que las exposiciones pueden ser por vía respiratoria y oral al mismo tiempo (EPA, 2000).

Dada esta complejidad, O'Flaherty (1996) desarrolló un modelo fisiológico incorporando patrones de absorción y excreción para Cr[VI] y Cr[III] a través del cuerpo. El modelo fue calibrado basándose en reportes de estudios cinéticos para exposiciones orales, respiratorias e intratraqueales utilizando soluciones de Cr en rata, y coincide con la mayoría de los aspectos conocidos de la cinética del cromo, incluyendo la reducción de Cr[VI] a Cr[III]. El modelo sugiere los mecanismos biológicos que se presentan a partir de la entrada del compuesto al organismo. De acuerdo a lo estudiado, independientemente de su estado de oxidación, el Cr es pobremente absorbido por los pulmones o el tracto digestivo (después de la inhalación, el cromo puede ser absorbido hacia el sistema circulatorio, ser transferido al sistema gastrointestinal por acción mucociliaria o permanecer en los pulmones). El Cr[VI] es reducido a Cr[III] en todos los tejidos, incluyendo pulmones y tracto digestivo (Medeiros *et al.*, 2003).

Tanto el Cr[III] como el Cr[VI] viajan en el torrente sanguíneo unido a aminoácidos, otros ácidos orgánicos y proteínas plasmáticas como las globulinas. Se ha mencionado que el Cr[VI] es el único estado de valencia que puede penetrar a la célula, sin embargo el estado trivalente también puede penetrar a través de la membrana pero a una eficiencia muy baja, de hecho los complejos de Cr[III] que se unen a ligandos de bajo peso molecular son aquellos que tienen esa pequeña probabilidad de entrar a la célula (Mertz, 1969). El modelo plantea que la reducción del Cr[VI] no puede darse en el plasma, sino que el cromo hexavalente entra a la célula por medio del mecanismo de intercambio de aniones fosfato-

sulfato y al interior se da su reducción por agentes como el glutatión, el ácido ascórbico, la cisteína y la histidina (DeFlora *et al*, 1989).

Una vez en la célula, el Cr[VI] es reducido a Cr[III], el cual puede subsecuentemente interactuar con macromoléculas celulares incluyendo el DNA (Wiegand *et al*, 1985), o puede ser lentamente eliminado por su unión con los ligandos que provocan su reducción y liberado hacia el torrente sanguíneo, para su posterior excreción vía renal-urinaria (Bishop y Surgenor, 1964).

El modelo considera, además de los órganos blanco descritos anteriormente, a otros sitios que se convierten en centros de acumulación, revelando nuevamente la complejidad que implica el estudio toxicológico del cromo. Una cantidad significativa del cromo absorbido se aloja en los huesos (Witmer y Harris, 1991; Weber, 1993), y también se concentra en tejidos como el hígado, los riñones y el bazo. Finalmente, O'Flaherty (1996) ha propuesto que la biodisponibilidad del cromo a los diferentes procesos de absorción es el factor más importante para determinar la toxicidad de una fuente específica de contaminación por cromo.

Aspectos de la toxicidad del cromo

La genotoxicidad de los compuestos que contienen cromo hexavalente [Cr(VI)]¹ es un fenómeno bien documentado a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo*, así como en poblaciones humanas que se han visto expuestas (De Flora *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1993; EPA, 2000; Luippold *et al.*, 2003; Borska *et al.*, 2003; Gambelunghe *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004).

El Cr[VI] es capaz de entrar a los sistemas biológicos y atravesar las membranas celulares mediante el sistema de intercambio aniónico fosfato-sulfato, aunque cierta porción puede permanecer en el plasma por un período considerable (Wiegand *et al.*, 1985), mientras que el Cr[III] es prácticamente incapaz de hacerlo, una vez dentro de la célula, el Cr[VI] es reducido a Cr[III] por agentes como el glutatión, el ácido ascórbico, la cisteína y la histidina (DeFlora *et al.*, 1989).

La solubilidad en el agua influye en los efectos del cromo. Estudios epidemiológicos y otros *in vivo* en animales y en cultivos celulares (basados en la inducción de neoplasias) indican que las sales de Cr[VI], que son insolubles en agua, son potentes carcinógenos; mientras que no es clara la relación entre cromatos solubles en agua y carcinogenicidad, aunque sí son considerados genotóxicos (DeFlora *et al.*, 1990; IARC, 1990). El efecto de la solubilidad influye directamente en la forma en que los organismos pueden obtener y acumular el cromo. De hecho, se ha visto que compuestos de Cr[VI] son citotóxicos y genotóxicos para células bronquiales humanas (Fornace *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 2002), incluso se ha propuesto que dichos compuestos tienden a acumularse y a causar tumores bronquiales en los sitios de bifurcación donde las partículas tienden a acumularse (Ishikawa *et al.*, 1994).

- El cromo Hexavalente

El Cr[VI] es altamente oxidante (propiedad asociada con su alto E^0 en pH neutros o bajos, misma que permite la transferencia de electrones de una amplia gama de donadores orgánicos), lo que limita la cantidad de compuestos que forma, pues la mayoría de los ligandos con los que puede unirse se oxidan acompañados de la consecuente reducción del

metal a estados de oxidación menor. De esta manera, con frecuencia el Cr[VI] forma complejos con oxígeno y haluros. El trióxido de cromo (CrO_3), cromil-cloruro (CrO_2Cl_2) y algunos cromatos son los compuestos más relacionados con toxicidad, junto con el Cr[VI] (Zhitkovich, 2004) (Fig. 2)

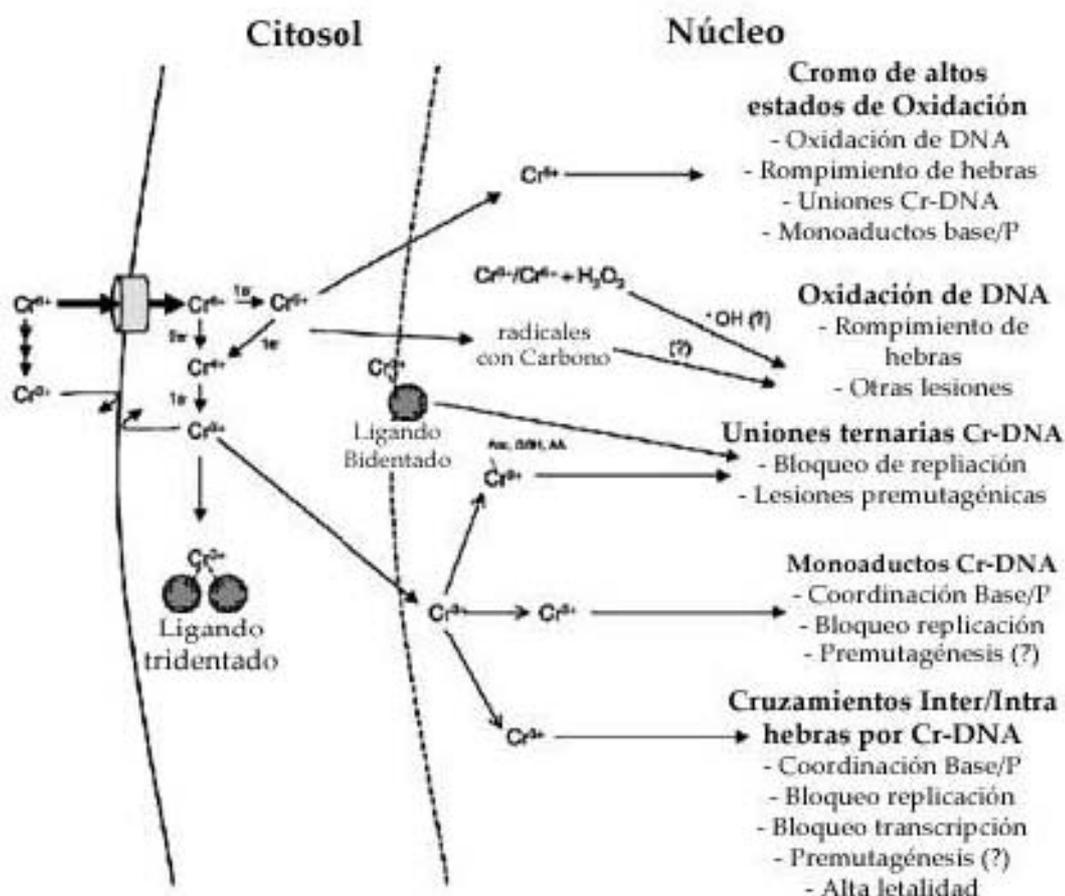
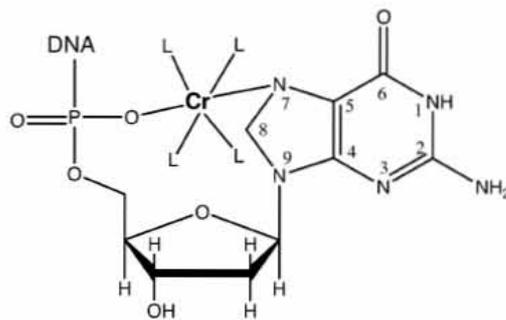


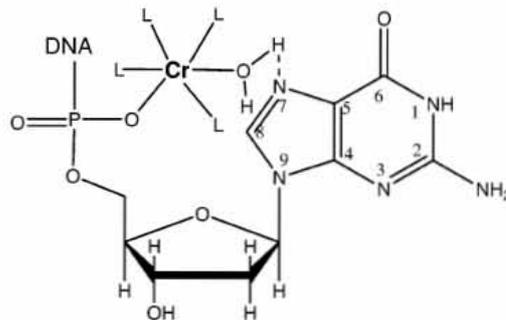
Fig. 2. Mecanismos de ingreso del Cr[VI] a la célula y su interacción con diversas moléculas que conduce a la inducción de daño al material genético. Nota: Los puntos de interrogación indican la incertidumbre que se tiene con respecto al fenómeno. Además, no se ha comprobado el bloqueo de la replicación más que en el cruzamiento Inter-hebras, aunque se estima que es posible con los demás tipos de uniones Cr-DNA (a partir de O'Brien et al., 2003). Un ligando bidentado se refiere al tipo de unión que puede formar el cromo con otros elementos celulares de acuerdo al tipo de reducción no específica que se muestra en la fig. 3A. El ligando tridentado puede darse de manera similar por el tipo de reducción descrito en la fig. 3B

El cromo III es la forma final termodinámicamente estable de este metal en las células. Esto ocurre básicamente porque las formas con un mayor estado de oxidación son altamente inestables, si bien es posible que también causen daño al interior de la célula (O'Brien *et al.*, 2003). De hecho O'Brien *et al.* (2003) han descrito dos mecanismos principales por los cuales el Cr puede dañar al material genético: la primera por una unión directa del Cr[III] al DNA, y la segunda por una unión de estados intermedios (Cr[VI], [V] y [IV] que se originan por una reducción "inconclusa" del Cr[VI] que penetra a la célula) al DNA, seguidos por la terminación de su reducción por los agentes no específicos mencionados.

A



B



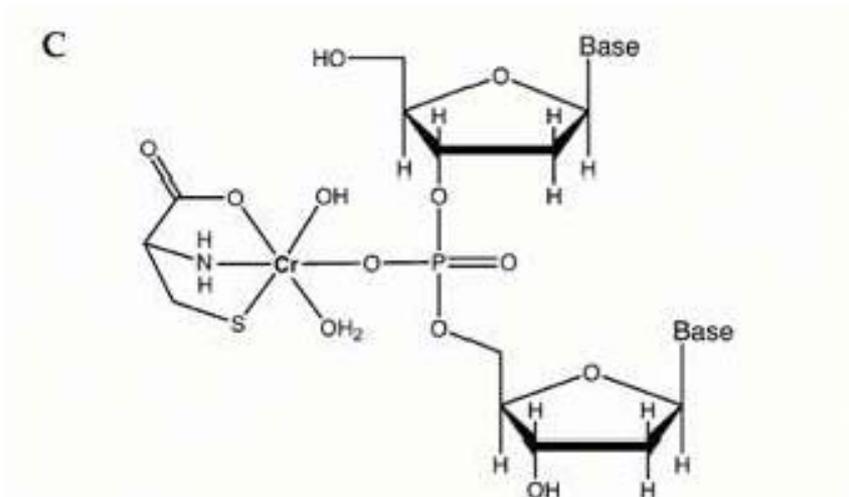
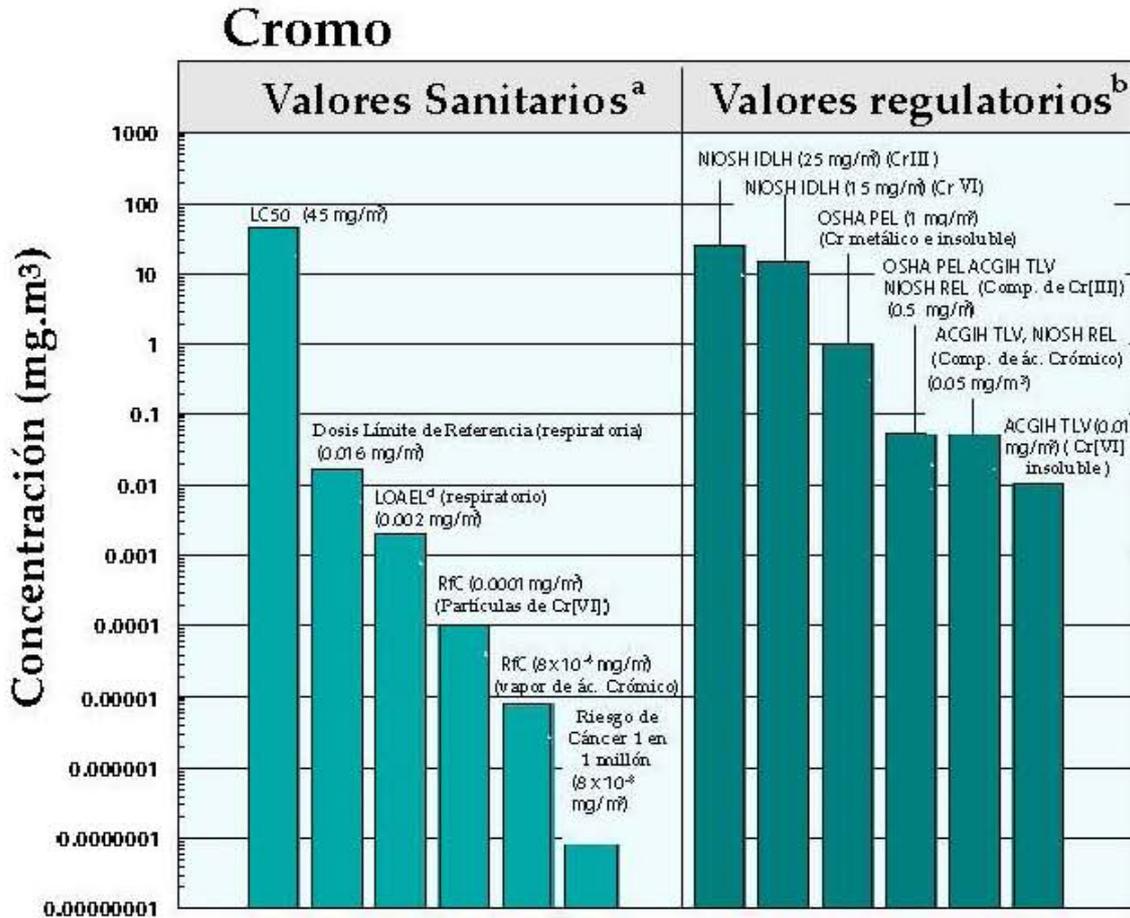


Fig 3. Uniones propuestas del Cromo trivalente al DNA. A y B: estructuras propuestas de las coordinaciones Base/P dadas por la unión de Cr[III]. C: cruzamiento Cisteína-Cr[III]-DNA, la unión más abundante en células tratadas con Cr[VI], sistema propuesto a partir de la cristalografía de complejos bis-L-cisteinato-Cr[III] (a partir de O'Brien et al., 2003).

Estas uniones naturalmente causan tensión en la doble hélice de DNA, provocando generalmente el rompimiento sencillo o doble de la cadena: esto es lo que se conoce como actividad clastogénica. Dado que el cromo es un elemento que se considera clastógeno, además de mutágeno (DeFlora *et al.*, 1998), una serie de indicadores y referencias se han establecido, sirviendo estos como modelo para evitar riesgos en la exposición al cromo. Algunos de estos indicadores y reguladores se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones de Cr[VI] referidas a distintos eventos que afectan la salud así como valores permisibles para distintas agencias (a partir de EPA, 2000).



ACGIH TLV - American Conference of Governmental and Industrial Hygienists' threshold limit value, límite recomendado al cual pueden exponerse la mayoría de los trabajadores sin efectos adversos.

LC₅₀ (Concentración Letal media) - Concentración calculada para la cual la exposición por cierta vía y tiempo causa la muerte del 50% de una población experimental de ratas.

NIOSH IDLH - National Institute of Occupational Safety and Health's immediately dangerous to life or health concentration; El Instituto Nacional de Seguridad y Salud

Laboral recomienda este valor como exposición límite que puede recibir un trabajador con relación a las exposiciones que pueden causar la muerte o efectos adversos a corto, mediano o largo plazo.

NIOSH REL - NIOSH's recommended exposure limit; Límite de exposición recomendado por el NIOSH para un tiempo de labores de 8 a 10 horas diarias de exposición continua.

OSHA PEL - Occupational Safety and Health Administration's permissible exposure limit, expresado como un promedio tiempo-masa, es la concentración de una sustancia a la cual pueden estar expuestos la mayoría de los trabajadores sin efectos adversos basado en una jornada de trabajo de 8 horas al día o 40 horas a la semana.

Los datos anteriores fueron compilados en diciembre de 1999. a) Los “Health numbers” son valores toxicológicos obtenidos en pruebas con animales o trabajos de evaluación de riesgo desarrollados por la EPA (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos). b) Valores regulatorios que han sido incorporados en regulaciones gubernamentales, mientras que los “advisory numbers” son niveles no-regulatorios proporcionados por el gobierno u otras instituciones como referencia de aviso. Los valores de OSHA son regulatorios mientras que los valores de NIOSH y ACGIH son referencias. c) La dosis límite de referencia o “benchmark” proviene de un estudio de letalidad utilizado como la base para la referencia de la EPA sobre el Cr[VI]. d) El valor LOAEL proviene de un estudio similar pero orientado a los vapores de ácidos crómicos y aerosoles disueltos que contienen Cr[VI] (EPA, 2000).

En el caso específico de México, solo existe una firma regulatoria a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 que lleva por título “Salud ambiental, agua para

uso y consumo humano – Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”. Con respecto al cromo, la norma indica 0.5 g.mL^{-1} de cromo total para el agua, aunque no se especifica si se trata de agua para riego o para consumo humano.

Cr[VI], metal de interés para la salud

Los compuestos que son dañinos para la salud de los organismos pueden causar distintos efectos, dependiendo del tipo y la duración de la exposición. El cromo hexavalente es un elemento que puede causar efectos muy diversos, desde una ligera irritación en una mucosa hasta cáncer pulmonar (Depault *et al.*, 2004). A continuación se presentan algunos de estos efectos, que muestran porqué el Cr[VI] es de interés para la salud y la investigación toxicológica.

Toxicidad

- Tratamientos agudos con animales (ratas, cobayos, conejos, entre otros) han demostrado letalidad por inhalación o exposición oral a altas concentraciones de cromo. Otros efectos reportados por inhalación incluyen alteraciones a nivel neurológico y gastrointestinal, así como la perforación del septo nasal por exposiciones crónicas; la ingestión de altas cantidades de Cr[VI] causa irritación gastrointestinal y hemorragias internas a nivel renal y hepático; mientras que la exposición dérmica en humanos causa quemaduras serias (ATSDR, 1998; EPA, 1998; WHO, 1988; DHHS-RTECS, 1993).

Teratogenicidad

- Estudios en animales no han reportado efectos sobre la reproducción o el desarrollo de los organismos por una exposición respiratoria al Cr[VI]. Sin embargo los estudios de exposición oral han reportado severos efectos en el desarrollo de ratones, como anormalidades durante la gestación y efectos reproductivos incluyendo la disminución del volumen fetal, reducción de la cantidad de espermatozoides producidos y degeneración de la capa celular exterior de los túbulos seminíferos. En humanos existe poca información, sin embargo todo parece indicar que la exposición al cromo por inhalación puede provocar complicaciones durante el embarazo y el parto (ATSDR, 1998; EPA, 1998).

Carcinogenicidad

- Históricamente no se ha considerado al Cr[III] como un agente carcinogénico (De Flora *et al*, 1989). En años recientes se ha propuesto que el agente carcinogénico final es el Cr[III], alguno de sus intermediarios en su reducción (compuestos de vida corta) o una combinación de ellos (Xie *et al*, 2004). Estudios epidemiológicos en trabajadores de cromadoras demuestran claramente que el cromo inhalado es un carcinógeno humano, incrementándose entonces el riesgo de un cáncer pulmonar en estas personas. Si bien estos obreros se encuentran expuestos tanto a Cr[III] como a Cr[VI], solo el cromo hexavalente ha mostrado actividad carcinogénica y es por eso que la EPA ha clasificado al cromo hexavalente como un elemento tipo A, carcinógeno probado para humanos por vía respiratoria (WHO, 1988; ATSDR, 1998; EPA, 1999).

Cromatos de México, S.A. de C.V.

De acuerdo con los antecedentes de la actual administración del municipio de Tultitlán de Mariano Escobedo, la empresa conocida como Cromatos de México (Fig. 4) operó durante un periodo de 20 años, de 1958 a 1978. La Cromita (FeCR_2O_4), materia prima utilizada para la elaboración de los productos cromados era importada de Sudáfrica. Como residuos industriales de la fábrica, diariamente se producían 12 toneladas de Cromato de Sodio, una tonelada de Cromato de Potasio, 8 toneladas de Sulfato de Sodio y 6 de Hidróxido de Aluminio (Comisiones unidas de medio ambiente y recursos naturales y de desarrollo metropolitano, Congreso de la Unión, 2004).

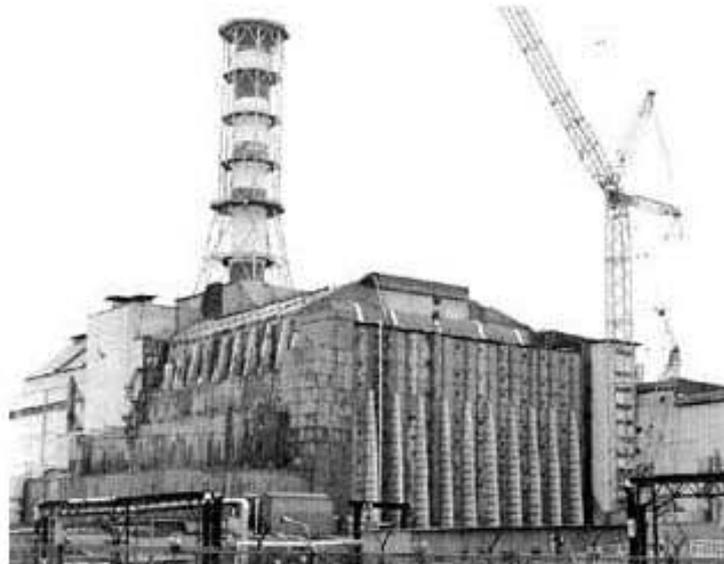


Fig. 4. Empresa “Cromatos de México” en los años 60 (Archivo, Diario Amanecer).

La producción se realizaba a cielo abierto, sin algún tipo de control sobre las emisiones de contaminantes a la atmósfera, a las aguas residuales ni para la disposición de los residuos finales. De hecho, estos últimos generalmente eran donados para el relleno y aplanado de

las calles que en la época no contaban con pavimentación ni drenaje, mientras que el resto de los residuos era acumulado al aire libre dentro del predio.

En 1975, se manifestaron las primeras evidencias de daño para la salud humana, en zonas adyacentes, especialmente en la Escuela Primaria “La Reforma”, aledaña a las instalaciones de la planta. Entre las patologías que presentaron tanto trabajadores de la empresa como habitantes de la localidad se encuentran perforación del tabique nasal, lesiones renales, problemas cutáneos como ulceración y dermatitis, irritación de las mucosas y numerosos casos de cáncer no especificados (Congreso de la Unión, 2004).

En 1977, por falta de cumplimiento en las condiciones de operación y de manejo de sustancias la empresa fue cerrada temporalmente y en 1978, a consecuencia de una serie de irregularidades, de los continuos problemas de salud y denuncias de los vecinos, la empresa fue clausurada definitivamente, instrumentándose algunas medidas de emergencia. En 1979, el inmueble en donde se ubicaba Cromatos de México fue embargado y posteriormente adjudicado en subasta pública (Gutiérrez *et al.*, 1985).

Tras el cierre de esta empresa el lugar se convirtió en un cementerio de residuos industriales, quedando entre 75 mil y 120 mil toneladas de material residual, en su mayoría cromita (más estable químicamente y menos peligrosa que el cromo), y sólo alrededor de un 3% de cromo hexavalente (Gutiérrez *et al.*, 1985). En 1983, se llevó a cabo la construcción en el predio de un confinamiento con un área de 16 mil quinientos metros cuadrados, el cual resultó inadecuado, dado que no contó con impermeabilización en la base, así como otras especificaciones técnicas necesarias para contener este tipo de material. En poco menos de 2 meses se detectaron rupturas y deslizamiento de las paredes del confinamiento, dejando al descubierto el material (Gutiérrez *et al.*, 1985). En 1999,

después de 15 años en los que se dejó de lado esta problemática; se pensó en la posibilidad de trasladar los residuos a un lugar de confinamiento especial, por lo que la empresa Residuos Industriales Multiquim, S.A de C.V. (RIMSA), presentó una propuesta para los residuos de cromo y sugirió que se llevara a cabo un estudio sobre la contaminación en mantos freáticos y de suelo; sin embargo estos servicios fueron rechazados (PROFEPA, 2003).

En el año 2000, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, en el marco del Programa Nacional de Sitios Contaminados con Residuos Peligrosos, realizó un estudio del cual se desprendió la decisión de declararlo como *zona de contingencia ambiental*. En el año 2002, la Secretaría de Ecología del Estado, propuso conformar tres grupos de trabajo interinstitucionales, que abarcaran el campo jurídico, el técnico y el financiero, integrándose autoridades estatales, municipales y federales. Durante el año 2003, se denunciaron por parte de vecinos del lugar continuas hemorragias nasales, aunque también se ha reportado que no existe una actitud cooperativa por parte de los habitantes del municipio (PROFEPA, 2003).

Finalmente se integró un grupo multidisciplinario por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental y la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, de la SEMARNAT; la Secretaría de Ecología del Gobierno del Estado de México, el Ayuntamiento de Tultitlán, la Delegación de la SEMARNAT en el Estado de México, el Colegio de Ingenieros Geólogos de México, la Secretaría General de Gobierno y la de Salud del Estado de México, y la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (GTZ), quienes han ofrecido a través del gobierno de Bavaria financiar el 75 % del costo de todos los trabajos que se realicen (PROFEPA, 2003).

Por otro lado, en un intento por llevar a cabo el saneamiento del predio, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales acordó con la Mesa de Coordinación para la solución de la problemática ambiental del predio de Cromatos de México en 2003, las siguientes cuatro fases:

1. Resguardo del predio.
2. Análisis de alternativas de restauración.
3. Tratamiento y disposición de los residuos.
4. Restauración ambiental del predio (SEMARNAT, 2003).

De acuerdo a la Procuraduría Federal para la protección del ambiente (PROFEPA, 2005), dentro del marco de la cooperación bilateral con Alemania, se encuentran relacionados con Cromatos de México los siguientes elementos:

- ❖ La ejecución del proyecto de la PROFEPA denominado "Seminario sobre las Tecnologías de Identificación, Caracterización y Limpieza de Sitios Contaminados con Residuos Peligrosos", dentro del Proyecto "Promoción Institucional en el Campo de Manejo de Sitios Contaminados", presentado por el INE, en colaboración con la Agencia Alemana de cooperación técnica Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ).
- ❖ La realización del Curso-proyecto "Remediación de Sitios Contaminados con Residuos Peligrosos", en el marco del convenio "Apoyo a la Gestión de Residuos Peligrosos de la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (SEGEM-GTZ)" firmado en 1999.

Recientemente (Junio 2005), la Secretaria de Ecología del Gobierno del Estado de México Arlette López Trujillo ha anunciado que los estudios realizados por científicos de la

Agencia de cooperación técnica Alemana (GTZ), como etapas previas al saneamiento del predio, están por concluir. Sin embargo, los estudios contemplan únicamente los contenidos químicos de contaminantes de muestras de suelo (núcleos que fueron extraídos en distintas zonas aledañas y del predio) y en ningún momento se ha planteado estimar los efectos que esta mezcla compleja puede tener en los organismos (Dr. Günter Wehenpohl, c.p.). De hecho, se discutió con los investigadores de la GTZ presentes en el predio de Septiembre a Noviembre de 2004 (que posteriormente partieran a Alemania para llevar al cabo el análisis de las muestras) sobre un posible intercambio de información, ya que los lineamientos de la cooperación no contemplan algún tipo de investigación con modelos biológicos. Incluso, de la manera que lo ha planteado la GTZ, el estudio de Cromatos de México se encuentra en el marco de un proyecto que pretende aprovechar las bases de datos, los criterios y los procedimientos Alemanes en la restauración de sitios contaminados como plan piloto (GTZ, 2005), por lo que de ninguna manera se pretende traer la solución para este problema ambiental, como lo han manejado las autoridades locales.

Dado el estado actual del contenedor, los residuos han salido al exterior por permeabilidad a través del suelo y las paredes, por lo que el contacto con los seres vivos se ha incrementado de manera directa. El riesgo para la población local es inminente, dado que estudios epidemiológicos en otras regiones del mundo han mostrado que las antiguas cromadoras representan zonas de alto impacto para el ambiente (Fig. 5).



Fig. 5. Ejemplo de la filtración de residuos del contenedor hacia los exteriores de los antiguos terrenos de Cromatos de México (9/2005). Nótese la reja que delimita el predio.

Biomonitores y biomarcadores

El monitoreo ambiental es una tarea multidisciplinaria con un continuo desarrollo en los últimos años. Con respecto a los sistemas biológicos involucrados, varios métodos de prueba han sido desarrollados de acuerdo al objetivo de la evaluación. Así pues, existen estrategias que evalúan la biodiversidad en un ecosistema contaminado como indicador de perturbación y otras que emplean a organismos individuales como indicadores de perturbación utilizando diferentes marcadores (comportamiento, viabilidad, entre otros), aunque finalmente, siempre se adaptan las estrategias de acuerdo al caso de contaminación que se ha de evaluar (Fossi y Leonzo, 1994; Gullan y Cranston, 1994; Butterworth *et al.*, 1995).

Dada la gran cantidad de contaminantes que han sido liberados al ambiente en los últimos años, agencias interesadas en la calidad del ambiente como la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) han establecido los denominados “límites permisibles” (ver Cuadro 1). Se trata de estándares numéricos de concentraciones máximas permisibles cuya finalidad es limitar la exposición a los contaminantes y reducir el riesgo que esto implica para las poblaciones. Sin embargo, el esfuerzo que se realiza en países en vías de desarrollo para monitorear estos límites no es suficiente, además de que en países como México, las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) tienen límites permisibles superiores a los recomendados por la WHO (NOM, 1984; EPA, 2000).

De los más de 200 compuestos evaluados por la EPA, se ha obtenido información importante sobre su actividad tóxica y genotóxica, incluso en algunos casos se han podido establecer relaciones de sinergismo y potenciación entre contaminantes. No obstante, en lo que se refiere a la interacción de los compuestos con el ambiente y los seres vivos, estos estudios siguen siendo limitados (Vinebrooke, 1998).

Dado esto, muchos de los métodos de detección química de contaminantes son incapaces de detectar niveles de contaminación por debajo de los límites permisibles y mucho menos de prevenir los efectos de la interacción con otros contaminantes que se presentan en el ambiente y en los organismos. Una manera de poder identificar estos fenómenos es a través de los denominados biomonitores: organismos utilizados para detectar cambios en el ambiente y que posibilitan la detección de contaminantes o mezclas complejas, con la ventaja de que además detectan el efecto de la acumulación de diversos agentes tóxicos y

discriminan la ocurrencia de sinergismo, inhibición y potenciación entre contaminantes con diversas formas de actividad que coinciden en tiempo y espacio en el ambiente (Jensen, 1998; Butterworth *et al*, 1995). En sí, los biomonitores son sensibles a niveles ambientales de contaminantes, los cuales no pueden ser detectados por los métodos basados en análisis químicos que además son poco informativos sobre el efecto que puedan tener las mezclas complejas en sistema *in vivo* (Jensen, 1998).

De acuerdo a Butterworth *et al*. (1995) y Jensen (1998), cualquier aspecto, producto o variable de respuesta de un biomonitor, en la que pueda ser evaluado el impacto de los contaminantes ambientales a través de un cambio detectable, es un Biomarcador. Este último debe permitir la determinación de los efectos biológicos de los contaminantes que ingresen al organismo (Butterworth *et al*, 2002). De acuerdo a la EPA (2002) un biomarcador es un cambio en la química sanguínea al modificarse la temperatura, la calidad del aire o bien la producción de ciertas enzimas de desintoxicación como el glutatión, citocromos P450 y metalotioneínas, entre otras. De forma integral, el biomarcador debe poseer las siguientes características:

- ❖ Sensible: primera respuesta producida por el contaminante.
- ❖ Específico: cambio directo resultado de la exposición a un contaminante.
- ❖ Práctico: facilidad para determinar la sensibilidad y la especificidad (Dorantes, 2000).

Un biomarcador combinado con un biomonitor puede crear un sofisticado sistema para detectar en un organismo de prueba el efecto de un posible peligro ambiental.

Las ventajas de la utilización de estos sistemas sobre otros fueron estipuladas en 1991 por el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (NRC). Primero, los organismos establecidos como biomonitores comparten el ambiente con el hombre, así como los alimentos y el agua. Además, las patologías resultantes de los efectos de los contaminantes se desarrollan más rápido en organismos que tienen ciclos de vida cortos y descendencia numerosa, en comparación con los humanos (Glickman, 1991). Finalmente, los biomonitores responden de manera similar a los humanos ante la exposición a tóxicos. Un ejemplo de esto es *Drosophila melanogaster* que tiene mecanismos de desintoxicación basados en paquetes enzimáticos dependientes de citocromos P450 y citocromo oxidasa, similares a los contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hällström *et al*; 1982).

***Drosophila melanogaster* como modelo biológico**

En la toxicología genética los modelos más aceptados para estudios de genotoxicidad han sido ratas y ratones, sin embargo, también ha sido cuestionado su uso en favor de la diversificación del conocimiento. En este contexto, se ha dado énfasis a la utilización de modelos alternativos. *Drosophila melanogaster* es un modelo bien establecido para el estudio de enfermedades humanas (Warrick *et al*, 1999; Auluck *et al*, 2002; Kazantsev *et al*, 2002) e investigación toxicológica (Gaivao *et al*, 1999; Chowdhuri *et al*, 1999, 2001; Nazir *et al*, 2001, 2003, 2003; Mukhopadhyay *et al*, 2002, 2003, 2003), dado que se conoce mejor que ningún otro organismo su genética y biología del desarrollo. Es por esto que el centro Europeo de validación de métodos alternativos ha recomendado el uso de *D. melanogaster* para la investigación toxicológica y la prueba de nuevos compuestos (Festing *et al*, 1998; Benford *et al*, 2000).

Características y ventajas del modelo

El estudio de los estadios de la espermatogénesis en *Drosophila* ha mostrado que existe especificidad en la respuesta a mutágenos (Chandley y Bateman, 1962; Abrahamson *et al*, 1983); y el tipo de metabolismo microsómico y de desintoxicación encontrados tanto en mamíferos como en moscas, es tan similar que a *Drosophila melanogaster* se le ha otorgado el título de “Mamífero Honorario” (Clarck, 1982; Hällström *et al*, 1982, 1984). Así pues, el modelo muestra una alta eficiencia en la detección de metabolitos de vida corta ya que no requiere de la adición de un sistema metabólico exógeno (Ziljstra y Vogel, 1988). La mosca es un eucarionte multicelular, cuya organización sistémica y cromosómica es muy similar a la de los mamíferos; su ciclo de vida en condiciones controladas de temperatura y humedad es relativamente corto (10 días) lo que permite el rápido análisis de un gran tamaño de muestra (numerosa progenie) y posibilita el empleo de dosis agudas, sub-crónicas y crónicas (Kilbey *et al*, 1981). Sin embargo, no se puede negar que existan restricciones en la extrapolación de los resultados hacia los mamíferos, sobre todo por cuestiones filogenéticas.

Determinación del sexo en *D. melanogaster*

- **Aspectos cromosómicos de la determinación del sexo**

Como consecuencia de un arduo trabajo con *D. melanogaster*, Bridges (1921, 1932, 1939) desarrolló la idea del equilibrio génico, en la que se manifiesta que la causa efectiva de la determinación del sexo en la mosca del vinagre es el equilibrio entre los genes de los cromosomas sexuales y los de los autosomas. Así pues, los determinadores del sexo femenino se encuentran en el cromosoma X y los del masculino en los autosomas. Los determinadores de hembras de un cromosoma X son menos potentes que los elementos

determinadores de machos de un número haploide de autosomas. Sin embargo, los elementos determinadores de hembras de dos cromosomas X son más fuertes (compensación de dosis) que los determinadores de machos en dos series de autosomas. Así pues, cuando la relación entre el número de cromosomas X y autosomas X/A es 1,0 la mosca es del sexo femenino, y del sexo masculino cuando X/A es 0,5 (Bridges, 1916, 1921, 1932, 1939; Crew, 1965).

Las aneuploidías implican una serie de posibles combinaciones con valores de X/A distintos (ver Cuadro 2), pero estas se presentan en frecuencias muy bajas en las poblaciones naturales y la mayoría han sido reveladas experimentalmente (Crew, 1965).

Cuadro 2. Número y clase de los distintos tipos sexuales en Drosophila melanogaster de acuerdo a la relación de cargas X/A (a partir de Crew, 1965).

# cromosomas X	# series autosómicas	Razón X/A	Fenotipo sexual
3	2	1.50	Superhembra
4	3	1.33	Superhembra
4	4	1.0	Hembra tetraploide (4n)
3	3	1.0	Hembra triploide (3n)
2	2	1.0	Hembra diploide (2n)
1	1	1.0	Hembra monploide (n)
3	4	0.75	Intersexo
2	3	0.67	Intersexo
1	2	0.50	Macho
1	4	0.50	Macho
1	3	0.33	Supermacho

Nota: El término “super” significa únicamente que la mosca es aneuploide, con una proporción X/A poco común.

- **Genes de determinación del sexo en *D. melanogaster***

Análisis recientes de los mecanismos moleculares implicados en la determinación genética del sexo muestran que los productos del gen “Sex lethal” ó *Sxl* actúan como un interruptor maestro en la cascada de señales regulatorias que determinan el seguimiento de los procesos de desarrollo masculinos o femeninos. *Sxl* fue identificado dado que una pérdida de función en este locus provoca una ausencia total de progenie femenina homocigótica, mientras que no presenta un efecto visible en machos (Müller y Zimmering, 1960). A partir de los últimos años, se sabe que el producto del gen *Sxl* se requiere para el desarrollo de la hembra, y que un elemento regulatorio en su promotor es sensible a la proporción de proteínas reguladoras producidas por los genes del cromosoma X (elementos numeradores) y en los autosomas (elementos denominadores). El gen *Sxl* regula a su vez una cascada de cambios en la expresión génica. Un aspecto interesante de este proceso de “splicing” alternativo de los mRNAs para varios de los productos génicos de la cascada regulatoria, es que son género-específicos (“splicing” diferente para cada sexo, aún cuando se trate del mismo mRNA) (Hackstein, 1991; Jiang *et al.*, 2001; Giansanti *et al.*, 2004; Wakimoto *et al.*, 2004) (Fig. 6).

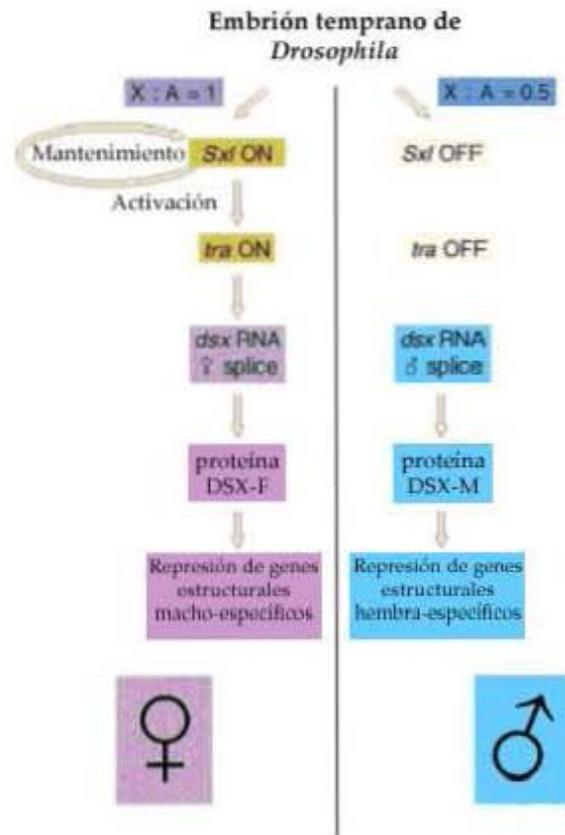


Fig. 6. Serie de señales desencadenadas posterior a la determinación del sexo por la relación X/A y la diferenciación en la expresión del gen *Sxl* (a partir de Giansanti et al, 2004).

Origen de las cargas cromosómicas anormales

Si un individuo de *Drosophila melanogaster* presenta una carga cromosómica anormal, esto puede deberse a que recibió una carga anormal de alguno de sus padres o que se ha presentado una alteración en segregación cromosómica en los primeros estadios del desarrollo. Dado que la prueba de pérdida cromosómica y no disyunción contempla la cruce de machos tratados por hembras no tratadas, se espera que las cargas anormales de la progenie sean originadas por errores producidos en los padres, como se muestra a continuación.

Cuadro 3. Fenotipos de la progenie con cargas sexuales normales y anormales dadas por errores en la segregación de cromosomas en la meiosis de los machos de *D. melanogaster* (a partir de Crew, 1965).

Meiosis en Macho	Gameto ♀		Fenotipo
		unión con X, A	
Gametos producidos por una meiosis normal	X, A	XX, AA	♀
	Y, A	XY, AA	♂
Gametos producidos por No disyunción en la 1ra división meiótica	XY, A	XXY, AA	♀
	O, A	XO, AA	♂ estéril
Gametos producidos por No disyunción en la 2da división meiótica	XX, A	XXX, AA	m♀ ↓ viabilidad
	YY, A	XYY, AA	♂
	O, A	XO, AA	♂ estéril
Gametos producidos por No disyunción en la 1ra y 2da división meiótica	XXY, A	XXXY, AA	m♀ ↓ viabilidad
	Y, A	XY, AA	♂
	XYY, A	XXYY, AA	♀ hembra
	X, A	XX, AA	♀
	XXYY, A	XXXYY, AA	m♀ ↓ viabilidad
	O, A	XO, AA	♂ estéril

Mosaicos sexuales en *D. melanogaster*

El estado de mosaicismo sexual se refiere a que los organismos en ciertas regiones o partes del cuerpo exhiben caracteres masculinos, mientras que en otras partes o regiones presentan características distintivas del sexo femenino (Laugé, 1985). De acuerdo a Crew (1965), el ginandromorfismo no es inusual en los insectos y se ha observado que aproximadamente una de cada dos mil moscas de la fruta presenta algún grado de éste. El tipo más común de mosaicismo sexual en *D. melanogaster* son los ginandromorfos bilaterales (Fig. 7), mostrando las características del macho en una de las mitades del cuerpo siguiendo la línea media anteroposterior y caracteres de la hembra en la otra mitad (Morgan y Bridges, 1919). En otros casos de mosaicismo el individuo puede presentar un cuarto del cuerpo típico de macho y las tres cuartas partes restantes de hembra. Existen también casos en que las proporciones de uno u otro sexo se presentan en proporciones menores a los cuartos (Huettner, 1922).



Fig. 7. Representación de un ginandromorfo clásico (a partir de Zimmering, 1987).

La prueba de pérdida y no disyunción de cromosomas (“Sex Chromosome Loss Test”)

Esta prueba detecta aquellos compuestos que tienen la capacidad de alterar tanto la integridad numérica (no-disyunción y pérdida total), como la estructural (pérdida parcial) de los cromosomas (Ramos-Morales, 1994). El tiempo requerido para realizar esta prueba es similar al de las demás pruebas que se realizan con *Drosophila*, aunque requiere un mayor adiestramiento técnico; la prueba se basa en la alteración de los fenotipos esperados en una cruce dada (parentales con genotipo conocido) como indicadores de los eventos anteriormente mencionados (Zimmering, 1987). La prueba no puede detectar mutaciones puntuales, ya que no está diseñada para detectar un riesgo mutagénico, sino para investigar el efecto de los genotóxicos sobre la integridad cromosómica (actividad clastogénica) y el aparato del huso (actividad aneuploidogénica) (Zimmering, 1987; IARC, 1990; Ramos-Morales, 1994).

Justificación

En el país existen muchos sitios de alto riesgo para la salud que han sido atendidos de forma inadecuada tanto por las autoridades responsables como por los pobladores locales. El caso específico de Cromatos de México es muy complejo pues en nuestros días el predio ha sido envuelto por la mancha urbana, provocando que la exposición hacia la gente sea inmediata. Ante la negativa de las autoridades sanitarias (Secretaría de Salud del Estado de México) de aceptar que la alta cantidad de casos de cáncer (entre otras patologías) en la zona esta relacionada con los residuos crónicos que se esparcen continuamente hacia el ambiente y la negativa de los pobladores a reubicarse en una zona de menor peligro, este trabajo busca proporcionar evidencias de la actividad genotóxica de los residuos que salen al exterior de “Cromatos de México”.

Objetivo general

Determinar el potencial clastogénico de los residuos filtrados hacia el exterior del predio de Cromatos de México.

Objetivos particulares

- Determinar la composición química de la muestra ambiental de estos residuos filtrados hacia el exterior del predio Cromatos de México
- Determinar si la exposición a diferentes concentraciones de la muestra ambiental afecta la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster*.

- Conocer el potencial clastogénico y aneuploidogénico de la muestra en *Drosophila melanogaster*.
- Determinar si la muestra ambiental tiene el potencial para afectar a la progenie de los machos tratados de *Drosophila*.

Hipótesis

Si la mezcla de residuos del exterior de Cromatos de México contiene metales pesados y en particular sales de cromo con actividad genotóxica, la exposición subcrónica de larvas de *Drosophila* afectará negativamente la sobrevivencia de las mismas e incrementará la frecuencia de organismos excepcionales en su progenie.

Metodología

Obtención de la muestra ambiental

La muestra se obtuvo al raspar la pared externa de la empresa “Cromatos de México” que limita al confinamiento, de la calle (ver Fig. 5). Posteriormente, se eliminaron fragmentos de concreto y roca, tras lo cual el material se pulverizó en un mortero. El polvo obtenido se utilizó para realizar la determinación de metales por espectrofotometría de absorbancia atómica (Varian SpectrAA-250 Plus) y para la preparación de disoluciones.

Cruza y marcadores

Se usó un sistema de cruza que permite detectar la no disyunción y pérdida parcial y/o total de cromosomas sexuales en *D. melanogaster*. Se utilizan marcadores morfológicos para el color del cuerpo y el color y la forma de los ojos de la mosca. Las relaciones alélicas entre los marcadores involucrados informan de la presencia de un fenotipo regular o de uno excepcional:

Descripción de marcadores morfológicos:

- *y* : X (1-0.0), el locus *yellow* controla la pigmentación melanótica de la cutícula del adulto y de ciertas piezas bucales y cinturones denticulares de la cutícula larvaria. La presencia de la mutación *y^l* implica un fenotipo adulto con cuerpo amarillo, cerdas pardas con las puntas amarillas, venas y tricomas de las alas amarillos (Lindsley & Zimm, 1992).

- y^2 : un alelo alternativo de *yellow*, provoca en el adulto un cuerpo amarillo, cerdas negras y que las venas de las alas sean grisáceas (Lindsley & Zimm, 1992).
- y^+ : fenotipo silvestre. El color del cuerpo de las moscas silvestres es gris-pardo, claramente más oscuro comparado con el alelo y^2 . La relación de dominancia entre los alelos es: $y^+ > y^2 > y$.
- w^a : X (1-1.5) alelo del locus *white* que provoca una coloración durazno (rosanaranja) en los ojos (Huestis, 1923). La expresión del gen se rige por la cantidad de cargas, sin embargo existe una compensación de éstas, por lo que los machos hemicigóticos w^a / Y presentan el mismo fenotipo que las hembras w^a / w^a (Lindsley & Zimm, 1992). La relación de dominancia de los alelos es: $w^+ > w^a$.
- B^S : X(1-57.0) locus *Bar of Stone* . El gen Bar^S es completamente dominante sobre el alelo silvestre (Bar^{S+}) y provoca la restricción del ojo a una barra vertical formada por aproximadamente 90 omatidias en los machos y 70 en las hembras (Sturtevant, 1925).). La relación de dominancia de los alelos es: $Bar^S > Bar^{S+}$.
- f : X(1-56.7) locus *forked*. Esta mutación provoca que las macroquetas, microquetas y tricomas se vean afectados en mayor o menor manera, generalmente en forma de una curvatura de la estructura (en contraste con la forma “recta” de una tricoma normal). f^{6a} presenta un efecto “extremo” en los tricomas, por lo que se trata del alelo (entre más de 35 alelos descritos por Belgovsky, 1940) más útil para ser utilizado como marcador fenotípico. La relación de dominancia es: $f^+ > f$.

Líneas de moscas

- Línea de hembras: Las hembras para la cruce experimental tienen los cromosomas libres y en varilla y son homocigóticas para los genes y^2w^a/y^2w^a , por lo que su fenotipo es: cuerpo amarillo con pelos y cerdas negras y ojos redondos de color rosa-durazno.
- Línea de machos: Los machos tienen un cromosoma Y compuesto, con dos translocaciones del X, una en el brazo largo (B^S) y otra en el brazo corto (y^+). El cromosoma X de los machos es circular y porta los alelos y y f . En forma breve su genotipo es: $X^{c2}, yf/B^SYy^+$, por lo que el color de su cuerpo es silvestre, con cerdas en horquilla y tiene los ojos en barra y de color rojo. Las hembras de esta línea tienen los cromosomas X unidos (X-attached) en forma reversa y con un sólo centrómero en el centro; son homocigóticas para los genes y y f . Estas hembras presentan además al cromosoma compuesto B^SYy^+ . En forma breve su genotipo es: $RA(I), yf/B^SYy^+$. En esta línea los machos reciben el cromosoma Y de la hembra y el X del macho. Tanto las hembras como los machos tienen el cuerpo de color silvestre, con cerdas bifurcadas y los ojos en barra y rojos. Para la cruce experimental, se utilizan los machos de esta línea.

Procedimiento experimental

Basándose en la prueba de clastogenia SCLT ("Sex chromosome loss test") para *Drosophila melanogaster*, un cultivo maduro de la línea de machos se transfirió a frascos con medio fresco enriquecido con levadura para recolectar huevos por un período de 8 h. A los tres días se extrajeron las larvas obtenidas por el método de Nöthinger (1970), que consiste en la formación de un gradiente de densidad (solución de glucosa al 20%) que permite separar a las larvas del medio de cultivo. Grupos de 50 – 100 larvas de 72 ± 4 horas (Ramos-Morales, 1994) se colocaron en tubos homeopáticos de vidrio que contenían 1g de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological supply) y 4.5 ml de disolución de la muestra ambiental o de agua destilada (testigo negativo). Las larvas permanecieron en este medio por 48 h o hasta la pupación, para una exposición subcrónica de 72x48h.

Concentraciones

A partir de una solución de 200 ppm de la muestra total se prepararon las siguientes concentraciones por diluciones sucesivas: 0.78; 1.56; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 ppm y como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada.

Desarrollo de la prueba SCLT

Al emerger los adultos o ímagos, se cuantificó el número de hembras y machos, separando a éstos para realizar las cruzas experimentales con hembras vírgenes y^2w^a / y^2w^a no tratadas en una proporción 2:1 siguiendo dos métodos:

- Cruza masiva de todos los machos recobrados de cada tubo homeopático, con el doble de

hembras vírgenes y^2w^a / y^2w^a , estos cultivos se mantuvieron en frascos lecheros de $\frac{1}{4}$ de litro de capacidad en una proporción 1:2.

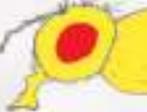
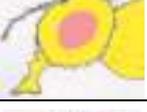
- Cruza individual (en tubos homeopáticos) de cada macho B^s / Yy^+ con dos hembras y^2w^a / y^2w^a .

Se realizaron tres repeticiones de la craza masiva (T1, T2 y T3) y dos de la craza individual (T4y T5).

Obtención de los resultados de la prueba SCLT

La progenie obtenida en las cruza masivas e individual se cuantificó registrando sexo y fenotipo (normal o excepcional), de acuerdo con el cuadro 2. También se registraron moscas que presentaban alteraciones en su morfología. Los eventos genéticos terminales que mide la prueba implican la pérdida parcial de marcadores, básicamente por efectos clastogénicos y aneuploidías provocadas por pérdida y/o no disyunción de los cromosomas sexuales (Ramos-Morales, 1994). En el cuadro 4 se muestra cada uno de los posibles resultados obtenidos por la presencia de estos eventos, mientras que en el cuadro 3 se explican con más a detalle los fenómenos relacionados la no disyunción de los cromosomas sexuales de los machos tratados.

Cuadro 4. Origen de los resultados obtenidos en la prueba de no-disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT) en *Drosophila melanogaster* (a partir de Zimmering et al., 1987; Ramos-Morales, 1994).

	Gametos ♂	cruza con Gameto ♀ y^2w^a Genotipo	Sexo	Fenotipo
Progenie regular	y 	y^2w^a / y 	♀	
	$B^S Yy^+$ 	$y^2w^a / B^S Yy^+$ 	♂	
Progenie excepcional	TL ($B^S Yy^+$) 	y^2w^a / O 	♂	
	PL (B^S) 	y^2w^a / Yy^+ 	♂	
	PL (y^+) 	$y^2w^a / B^S Y$ 	♂	
	ND 	$y^2w^a / y / B^S Yy^+$ 	♀	

TL: pérdida total. PL: pérdida parcial. ND: no disyunción.

Cuadro 5. Origen de los resultados de la prueba SCLT para *Drosophila melanogaster* relacionados con la no-disyunción de cromosomas sexuales en machos tratados con la muestra ambiental (a partir de Crew, 1965).

Meiosis en Macho		Gameto ♀	Prueba SCLT
		unión con X	Fenotipo
Gametos producidos por una meiosis normal	X	XX	♀ y^2
	Y	XY	♂ $w^a B^s$
Gametos producidos por No disyunción en la 1ra división meiótica	XY	XXY	♀ B^s
	O	XO	♂ $y^2 w^a$
Gametos producidos por No disyunción en la 2da división meiótica	XX	XXX	M♀ ↓ viabilidad
	YY	XYY	♂ no viable
	O	XO	♂ $y^2 w^a$
Gametos producidos por No disyunción en la 1ra y 2da división meiótica	XXY	XXXY	m♀ no viable
	Y	XY	♂ $w^a B^s$
	XYY	XXYY	♀ B^s
	X	XX	♀ y^2
	XXYY	XXXYY	m♀ y^2 no viable
	O	XO	♂ $y^2 w^a$ estéril

Además de los eventos esperados por la prueba de clastogenia SCLT, se registraron eventos que están relacionados con pérdida de los cromosomas sexuales a nivel somático en la progenie. Se trata de eventos (ver cuadro 4) que tienen que ver como una herencia “normal” de los cromosomas parentales de organismos tratados, pero que poseen propiedades que los hacen inestables a través de la diferenciación celular (divisiones somáticas), resultando en la pérdida de los mismos.

Cuadro 6. Categorías de resultados que no pertenecen a la prueba SCLT (Zimmering, 1987) que han sido medidos en este trabajo.

Otros eventos	Ginandromorfos	Alteración en el desarrollo que lleva a la pérdida parcial y/o total de cromosomas o no-disyunción, visible como mosaicos celulares con distintos marcadores en el mismo cuerpo
	Otros	Alteración en el desarrollo que lleva a la formación anormal de estructuras en el adulto no tratado

Análisis estadístico

Para probar la homoscedasticidad (igualdad de varianzas entre diferentes grupos de datos) de los resultados de los tratamientos se utilizaron las pruebas de Levene y su versión modificada con distribuciones de Hartley, Cochran y Bartlett para la homogeneidad de varianzas, así como la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos.

Para poder realizar un ANOVA de dos vías, primero se realizaron las pruebas robustas para la igualdad de medias de grupos de Brown-Forsythe y de Welch. Finalmente, dado que no se cumplían con los requisitos necesarios para realizar el ANOVA de dos vías, se utilizó una prueba de Tukey para conocer el efecto de la variación de concentración de tratamiento con respecto a la sobrevivencia de los organismos tratados, así como para evaluar si existen diferencias significativas entre los 5 tratamientos. Posteriormente se aplicó la prueba de Spjotvoll/Stoline para discernir entre qué tratamientos se encuentran las diferencias significativas. La prueba de Tukey HSD para tamaños muestrales desiguales permitió hacer una agrupación homogénea de los tratamientos, determinando tratamientos con respuesta similar.

Con respecto a las cruzas, masivas e individuales, se utilizaron pruebas multinomiales basadas en la prueba de χ^2 para determinar diferencias significativas en la aparición de progenie excepcional con relación a la concentración con la que se trató a los machos progenitores.

Para el análisis de fecundidad se realizaron pruebas MANOVA de dos vías para cantidad de progenie y sexo contra concentración. Para conocer el efecto específico por concentración, se ocupó la prueba de Spjotvoll/Stoline. Finalmente, para conocer los patrones de distribución de las cantidades de progenie por macho, se ocupó un análisis de categorización homogénea.

Resultados

1. Muestra ambiental

Análisis espectrofotométrico de las muestras ambientales

Las muestras ambientales fueron enviadas a Estudios y Análisis Ambientales S.A. de C.V. y procesadas en el espectrofotómetro de absorbanza atómica para determinar el contenido de metales pesados (Tabla 1). Algunos metales que se encuentran relacionados comúnmente con los residuos que producen las cromadoras son Níquel, Hierro y Cromo (Medeiros *et al.*, 2003), sin embargo otros metales como el Arsénico y el Cadmio suelen estar presentes en las menas de Cromo, aunque en cantidades mínimas. En todo caso, es fundamental determinar la presencia de estos metales ya que son mutágenos y carcinógenos probados (Ramos-Morales *et al.*, 2002) y pueden afectar en mayor o menor medida los resultados de las pruebas con *Drosophila melanogaster*.

Tabla 1. Determinación de la cantidad (en gramos por kilogramo) de metales pesados de la muestra ambiental de acuerdo al procedimiento descrito por la Norma Mexicana vigente NMX-AA-51-1981.

	Promedio [g.kg ⁻¹]	Desv. Est.
Arsénico	0.00027	0.00003
Cadmio	0.00345	0.00007
Zinc	0.19900	0.01131
Hierro	42.75000	1.48492
Níquel	0.30000	0.01414
Cromo	99.40000	0.00000

Los metales más abundantes en la muestra fueron el Hierro y el Cromo (Tabla 1), con una abundancia menor de Níquel, aunque superior a los contenidos de todos los demás metales.

Tabla 2. Determinación a partir de la cantidad de Cromo total de acuerdo a los procedimientos de la NMX-AA-51-1981 del porcentaje de la muestra que corresponde a Cromo de distintos estados de oxidación y al Cromo hexavalente.

	Promedio %	Desv. Est.
Cromo Total	100	0
Cr[VI]	97.79	0.06
Cr[II, III]	2.21	0.06

Un 9.94 % de Cromo en la muestra nos habla de residuos externos al confinamiento que contienen aproximadamente 100 000 ppm, de las cuales aproximadamente un 97 % corresponde al Cromo hexavalente, es decir 97 200 ppm. Sin embargo, para todos los tratamientos se utilizó la mezcla compleja tal cual se tomó de la zona de muestreo y se elaboraron las concentraciones a partir de 200 ppm a través de diluciones consecutivas. Dado esto, los tratamientos contienen en realidad una menor cantidad de cromo y otros elementos que lo planteado por el valor nominal de la concentración probada (la concentración 200 ppm no contiene 200 ppm de cromo). En la tabla 3 se muestran las equivalencias de cromo total y cromo hexavalente que se presentan en cada concentración probada de acuerdo a los análisis mostrados en las Tablas 1 y 2.

Tabla 3. Equivalencias de las concentraciones probadas en cuanto a cromo total y cromo hexavalente de acuerdo a las determinaciones espectrofotométricas.

Muestra (ppm)	Cr Total (ppm)	Cr[VI] (ppm)
0	0.000	0.000
0.78	0.078	0.076
1.56	0.155	0.152
3.125	0.311	0.304
6.25	0.621	0.608
12.5	1.243	1.215
25	2.485	2.430
50	4.970	4.860
100	9.940	9.720
200	19.880	19.440

2. Cruzas Masivas

Sobrevivencia de los organismos tratados para cruzas masivas

El índice de sobrevivencia ha sido propuesto como un indicador primario de la respuesta de *Drosophila melanogaster* a los tratamientos con muestras ambientales (Arellano, 2002).

Este índice crea una relación entre el testigo y los organismos tratados a diferentes concentraciones, de manera que se pueda saber si el tratamiento provoca una pérdida de organismos. El valor del IS (índice de sobrevivencia) para el testigo siempre se considera igual a 1 y los tratamientos se van relacionando de manera que si se tiene un valor significativamente menor que el del testigo, se puede decir que el tratamiento está provocando la muerte de los organismos (tabla 4). Esta determinación también puede hacerse por separado para hembras y machos, lo que permite determinar si existe una susceptibilidad al tratamiento relacionada con la condición sexual de las moscas.

Tabla 4. Índices de sobrevivencia (IS) promedio \pm error estándar para las hembras y machos tratados con diferentes concentraciones de la muestra ambiental.

[ppm]	♀	♂	IS promedio ♀	Error Est. ♀	IS promedio ♂	Error Est. ♂
0	41	93	1.000	0.000	1.000	0.000
0.78	31	82	0.976	0.188	1.172	0.101
1.56	43	76	0.806	0.037	0.839	0.063
3.125	81	106	2.019	0.118	1.194	0.169
6.25	49	99	1.384	0.252	1.246	0.217
12.5	65	110	1.843	0.315	1.247	0.113
25	42	65	1.324	0.088	1.204	0.197
50	66	130	1.563	0.266	1.337	0.217
100	67	79	1.727	0.216	1.111	0.139
200	72	112	1.250	0.232	1.138	0.037

Tanto para hembras como para machos se observa que no hay una pérdida considerable en la cantidad de organismos tratados (ver tabla 4), incluso en la mayoría de los casos el IS

presenta valores por el encima del testigo. Para determinar si existen diferencias significativas en la sobrevivencia con relación a la concentración del tratamiento, se realizó una prueba MANOVA dos vías. Dicha evaluación tiene como requisitos la homoscedasticidad (tabla 5) y la normalidad de los datos que se quieran probar (tabla 6).

Tabla 5. Resultados de la prueba de Levene para homoscedasticidad de varianzas entre los IS de los tratamientos.

	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Xi-cuad.	g.l.	p
IS	4.6503	0.3968	25.0432	4	4.952E-05

La prueba de Levene para homogeneidad de varianzas con un $\alpha = 0.05$ arrojó un valor de $p = 4.952 \times 10^{-5}$, lo que indica que las varianzas son desiguales entre concentraciones. Dicho resultado también se encontró a través de las variantes de la prueba de Levene con distribuciones de Hartley, Cochran y Bartlett.

Tabla 6. Resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para normalidad de los IS de los tratamientos.

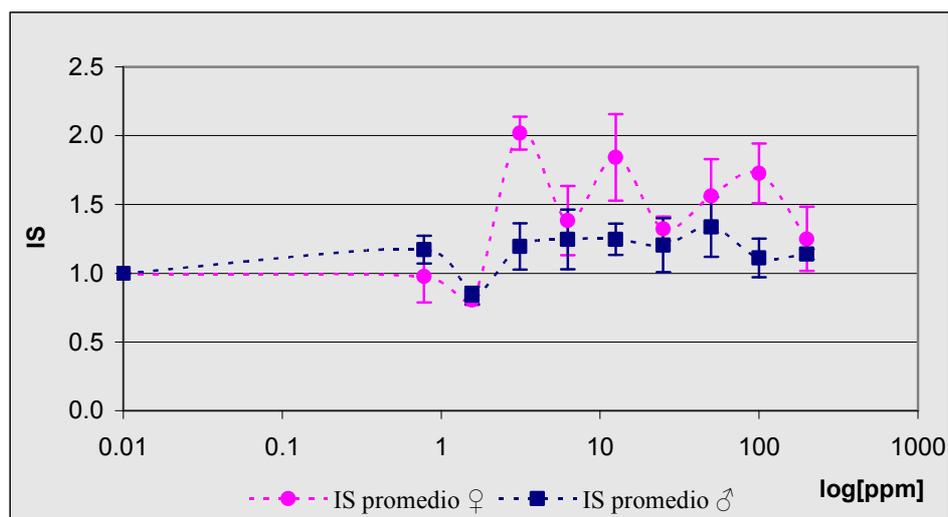
	N	D máxima	p
T1	34	0.1409	$p > .20$
T2	20	0.1474	$p > .20$
T3	38	0.1166	$p > .20$
T4	60	0.1024	$p > .20$
T5	40	0.1454	$p > .20$

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para normalidad dio un resultado de $p > 0.20$ para todos los tratamientos (tabla 6), mostrando que en todos los casos los datos se distribuyen de manera normal. Dado que no se cumple el requisito de homoscedasticidad para el MANOVA, se realizó una prueba MANOVA/Tukey que permite hacer una evaluación equivalente sin la restricción de la homogeneidad de las varianzas (tabla 7).

Tabla 7. Resultados de la prueba MANOVA/Tukey para concentración contra sobrevivencia.

	Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrada	F	p
Efecto	3.1564	9	0.3507	0.9471	0.4857
Error	67.3967	182	0.3703		

Esta evaluación, con un $\alpha = 0.05$, mostró un valor para $p = 0.48$, lo que muestra que no existe una diferencia significativa de sobrevivencia entre las concentraciones. Se puede entonces afirmar que los tratamientos a diferentes concentraciones no provocan una muerte significativa de los organismos tratados. En la gráfica 1 se presenta el promedio de los IS de los tratamientos para las cruzas masivas.



Gráfica 1. Promedio de sobrevivencia por concentración y error estándar para las cruzas masivas.

Resultados de las cruzas Masivas

Una vez tratados, los machos fueron cruzados con hembras vírgenes de la línea de hembras y^2w^a . Los resultados de estas cruzas se presentan en la tabla 8. La categoría de progenie regular se refiere a la progenie esperada dado el genotipo de los progenitores. La progenie

excepcional incluye a todos los organismos obtenidos de la cruce que presentan algún tipo de alteración genética de acuerdo a los resultados descritos por Zimmering (1987, ver Cuadro 4). La progenie excepcional también incluye los fenómenos somáticos de pérdida de cromosomas sexuales en la progenie, tal como se describen en el Cuadro 4. Dado esto, la prueba realizada se basa en la detección de estos eventos para determinar si la muestra tiene potencial para causar estas alteraciones a ciertas concentraciones.

Tabla 8. Progenie recobrada de la cruce masiva de machos tratados x hembras vírgenes no tratadas.

[ppm]	Machos	Progenie Regular		Progenie excepcional			Otros eventos		Total	Total
		H y ²	M w ^a B ^s	PL	TL	XXY	XX/X0	Otros	alt.	
0	51	1398	1035	0	61	0	5	0	66	2499
		0.55942	0.41417	0.00000	0.02441	0.00000	0.00200	0.00000	0.02641	
0,78	101	1208	954	1	56	1	4	1	63	2225
		0.54292	0.42876	0.00045	0.02517	0.00045	0.00180	0.00045	0.02831	
1,56	71	1522	1208	0	38	4	4	0	46	2776
		0.54827	0.43516	0.00000	0.01369	0.00144	0.00144	0.00000	0.01657	
3,125	99	1702	1375	0	42	0	5	0	47	3124
		0.54481	0.44014	0.00000	0.01344	0.00000	0.00160	0.00000	0.01504	
6,25	93	1385	1090	0	36	11	4	5	56	2531
		0.54721	0.43066	0.00000	0.01422	0.00435	0.00158	0.00198	0.02213	
12,5	150	2008	1624	0	56	3	17	7	83	3715
		0.54051	0.43715	0.00000	0.01507	0.00081	0.00458	0.00188	0.02234	
25	86	1755	1342	0	52	2	2	0	56	3153
		0.55661	0.42563	0.00000	0.01649	0.00063	0.00063	0.00000	0.01776	
50	118	1441	1301	0	43	2	10	1	56	2798
		0.51501	0.46497	0.00000	0.01537	0.00071	0.00357	0.00036	0.02001	
100	76	1522	1319	0	45	1	1	5	52	2893
		0.52610	0.45593	0.00000	0.01555	0.00035	0.00035	0.00173	0.01797	
200	97	1983	1347	0	79	3	15	0	97	3427
		0.57864	0.39306	0.00000	0.02305	0.00088	0.00438	0.00000	0.02830	
Totales	942	15924	12595	1	508	27	67	19	622	29141
		0.54645	0.43221	0.00003	0.01743	0.00093	0.00230	0.00065	0.02134	

Nota: El valor numérico se encuentra en negro y su frecuencia relativa en naranja. PL: pérdida parcial; TL: pérdida total; XXY: no disyunción en machos progenitores; XX/X0: organismos ginandromórficos; Otros: alteraciones fenotípicas.

Pruebas multinomiales para cruzas masivas

La hipótesis nula de las pruebas multinomiales establece que no existen diferencias significativas en cuanto a la proporción de progenie normal/excepcional conforme al cambio de concentración. Trabajando con un $\alpha = 0.005$ y un valor crítico de 18.55, en todas las concentraciones se encontraron valores superiores al crítico, por lo que se rechaza la hipótesis nula para todos los resultados de las cruzas masivas (tablas en Weimer, 1996). Esto nos indica que los organismos tratados (machos) que se han cruzado con hembras vírgenes no tratadas tienen una progenie significativamente distinta con respecto a los machos no tratados (testigos: 0 ppm) cruzados con las mismas hembras vírgenes.

3. Cruzas individuales

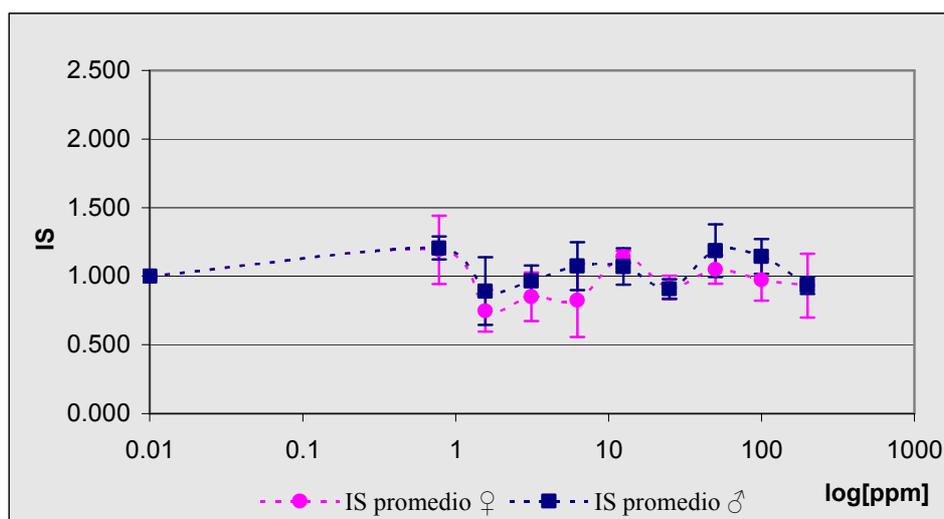
Sobrevivencia de los organismos tratados para cruzas individuales

De la misma manera que para las cruzas masivas, se estableció un IS para los organismos tratados destinados a las cruzas individuales, tanto para hembras como para machos. Estos resultados muestran nuevamente que el tratamiento con la muestra ambiental a diferentes concentraciones no provoca una pérdida significativa en la sobrevivencia de las moscas tratadas ($p = 0.48$, $\alpha = 0.05$, ver Tabla 7).

Tabla 9. Índices de sobrevivencia con error estándar para las hembras y machos tratados con diferentes concentraciones de la muestra ambiental.

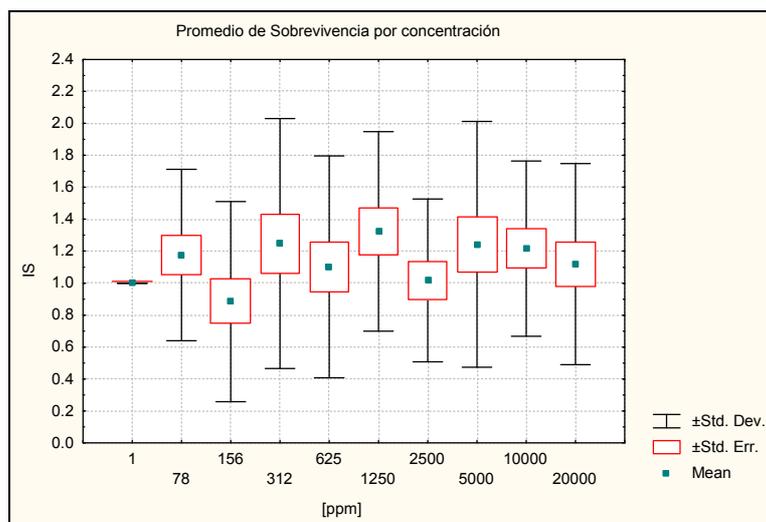
[ppm]	♀	♂	IS promedio ♀	Error Est. ♀	IS promedio ♂	Error Est. ♂
0	96	121	1.000	0.000	1.000	0.000
0.78	140	156	1.192	0.249	1.206	0.084
1.56	80	145	0.749	0.152	0.891	0.247
3.125	95	129	0.851	0.177	0.964	0.114
6.25	100	150	0.825	0.267	1.075	0.175
12.5	110	147	1.142	0.043	1.070	0.133
25	91	90	0.918	0.085	0.908	0.071
50	109	159	1.049	0.103	1.185	0.192
100	108	150	0.973	0.151	1.146	0.126
200	102	121	0.932	0.234	0.933	0.061

En la gráfica 2 se presenta el IS promedio de las moscas tratadas conforme a las concentraciones.



Gráfica 2. Índice de sobrevivencia promedio con error estándar para hembras y machos tratados con diferentes concentraciones de muestra ambiental para las cruza individuales.

Tanto para las cruza masivas como para las individuales, los análisis MANOVA/Tukey muestran que no existe una diferencia significativa en los IS (ver Tabla 7) con respecto a las diferentes concentraciones de tratamiento. El promedio de los IS de los 5 tratamientos (3 masivos y 2 individuales) por concentración se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Índice de supervivencia promedio (IS) para los cinco tratamientos.

Sin embargo, con la misma prueba se encuentra una diferencia significativa entre los tratamientos. Para conocer específicamente entre qué tratamientos se encuentran las diferencias (T1, T2 y T3: Cruzas masivas; T4 y T5: Cruzas individuales), se aplicó la prueba de Spjotvoll/Stoline que relaciona cada uno de los 5 tratamientos con sus contrapartes, de manera que los valores significativos ($\alpha=0.05$) muestran si existe una diferencia significativa entre dos tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de la prueba de Spjotvoll/Stoline.

	T1	T2	T3	T4	T5
T1					
T2	0.8158				
T3	0.0482	0.0126			
T4	0.9985	0.6897	0.0714		
T5	8.23E-05	7.24E-05	0.3418	6.396E-05	

Nota: en rojo se muestran las diferencias significativas entre los tratamientos.

Así, el T1 es significativamente distinto del T3 y el T5, al igual que el T2. Por otra parte, los tratamientos 4 y 5 también son significativamente distintos. La similitud que existe en

algunos de los resultados, permite hacer una agrupación basada en la prueba de Tukey denominada HSD para N desiguales (*Honest Significant Difference ó diferencia honesta significativa*), la cual nos entrega tres grupos homogéneos: [T1:T2:T4] , [T3:T4] y [T3:T5] (Tabla 11).

Tabla 11. Agrupación homogénea ($\alpha=0.05$) a partir de la prueba de Tukey HSD para N desiguales.

	Promedio IS	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
T5	0.7185			
T3	0.9536			
T4	1.2825			
T1	1.3209			
T2	1.5100			

Resultados de las cruzas individuales

Una vez tratados los machos fueron cruzados individualmente con 2 hembras vírgenes de la línea de hembras, en un total de 700 viales (70 por concentración). Al igual que en las cruzas masivas, la progenie regular se refiere a la descendencia esperada dado un desarrollo “normal” de la reproducción y el desarrollo de las moscas (tabla 12). La progenie excepcional se refiere a las alteraciones en las condiciones génicas y a errores en el desarrollo.

Tabla 12. Resultados de la cruce individual de machos tratados x hembras vírgenes no tratadas.

[]	Progenie Regular		Progenie excepcional			Otros eventos		Total alt.	Total
	H y2	M waBs	PL	TL	XXY	XX/XO	Otros		
0	1066	897	1	16	4	5	0	26	1989
	0.53595	0.45098	0.00050	0.00804	0.00201	0.00251	0.00000	0.01307	
0,78	1148	1061	0	20	1	5	1	27	2236
	0.51342	0.47451	0.00000	0.00894	0.00045	0.00224	0.00045	0.01208	
1,56	924	868	0	18	2	2	0	22	1814
	0.50937	0.47850	0.00000	0.00992	0.00110	0.00110	0.00000	0.01213	
3,125	1122	1047	0	21	4	2	8	35	2204
	0.50907	0.47505	0.00000	0.00953	0.00181	0.00091	0.00363	0.01588	
6,25	1330	1100	0	29	1	5	3	38	2468
	0.53890	0.44571	0.00000	0.01175	0.00041	0.00203	0.00122	0.01540	
12,5	981	970	1	19	0	9	2	31	1982
	0.49495	0.48940	0.00050	0.00959	0.00000	0.00454	0.00101	0.01564	
25	1279	1113	0	43	0	6	3	52	2444
	0.52332	0.45540	0.00000	0.01759	0.00000	0.00245	0.00123	0.02128	
50	1376	1299	0	22	0	9	11	42	2717
	0.50644	0.47810	0.00000	0.00810	0.00000	0.00331	0.00405	0.01546	
100	959	932	0	19	4	3	16	42	1933
	0.49612	0.48215	0.00000	0.00983	0.00207	0.00155	0.00828	0.02173	
200	1315	1309	0	37	3	4	7	51	2675
	0.49159	0.48935	0.00000	0.01383	0.00112	0.00150	0.00262	0.01907	
Totales	11500	10596	2	244	19	50	51	366	22462
	0.51198	0.47173	0.00009	0.01086	0.00085	0.00223	0.00227	0.01629	

Nota: El valor numérico se encuentra en negro y su frecuencia relativa en naranja. PL: pérdida parcial; TL: pérdida total; XXY: no disyunción en machos progenitores; XX/XO: organismos ginandromórficos; Otros: alteraciones fenotípicas.

Pruebas multinominales para las cruzas individuales

Al igual que para las cruzas masivas, la prueba se aplicó con un valor $\alpha = 0.05$ y un valor crítico de 18.55, encontrándose en todos los casos que existe una diferencia significativa en las proporciones de la progenie de los organismos tratados con respecto a la progenie de los testigos (resultados siempre superiores a 18.55; se rechaza H_0) (Tablas en Weimer, 1996).

Análisis de Fecundidad

De manera natural se piensa que cada macho utilizado en una cruce se reproduce de forma similar a los demás machos del mismo ensayo. Pero en los últimos años se ha observado que esto no necesariamente es cierto y que puede existir una reproducción diferencial entre machos de la misma cruce, presentándose incluso aquellos que son estériles. Las cruces individuales permiten visualizar la prole de cada macho de manera independiente y conocer si los tratamientos están provocando una diferencia en la cantidad o el tipo de descendencia que este tiene. En la tabla 13 se presenta el promedio de prole por macho de acuerdo a la concentración del tratamiento junto con el error estándar.

Tabla 13. Promedio de prole obtenida por macho en las cruces individuales con error estándar.

[]	Prog/macho	Error. Est.
0	33.6500	2.3647
0.78	40.1905	3.8098
1.56	41.0476	3.1322
3.125	38.2764	0.0360
6.25	42.9164	3.8322
12.5	33.3390	3.1534
25	36.8693	6.9534
50	37.7683	7.3098
100	35.2408	1.3686
200	44.5065	4.3383

Para determinar si existen diferencias significativas entre la serie testigo y las series experimentales, se utilizó la prueba MANOVA de dos vías. El análisis se basó en la cantidad de prole promedio por macho, en el sexo de la prole ó en la interacción de ambos. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados de la prueba MANOVA para progenie y sexo contra concentración.

	g.l.	MS Efecto	g.l. Error	MS Error	F	p
progenie/macho	9	593.2953	1138	90.2083	6.5770	3.43E-09
sexo	1	546.5319	1138	90.2083	6.0586	0.0140
progenie - sexo	9	46.21479	1138	90.2083	0.5123	0.8664

Tanto para las cantidad promedio de progenie por macho como para el sexo, se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos para cruza individuales (valores en rojo, Tabla 14), pero no en la interacción entre ambos. Para conocer de manera específica entre qué tratamientos se encuentran las diferencias significativas, se utilizó la prueba de Spjotvoll/Stoline (Tabla 15).

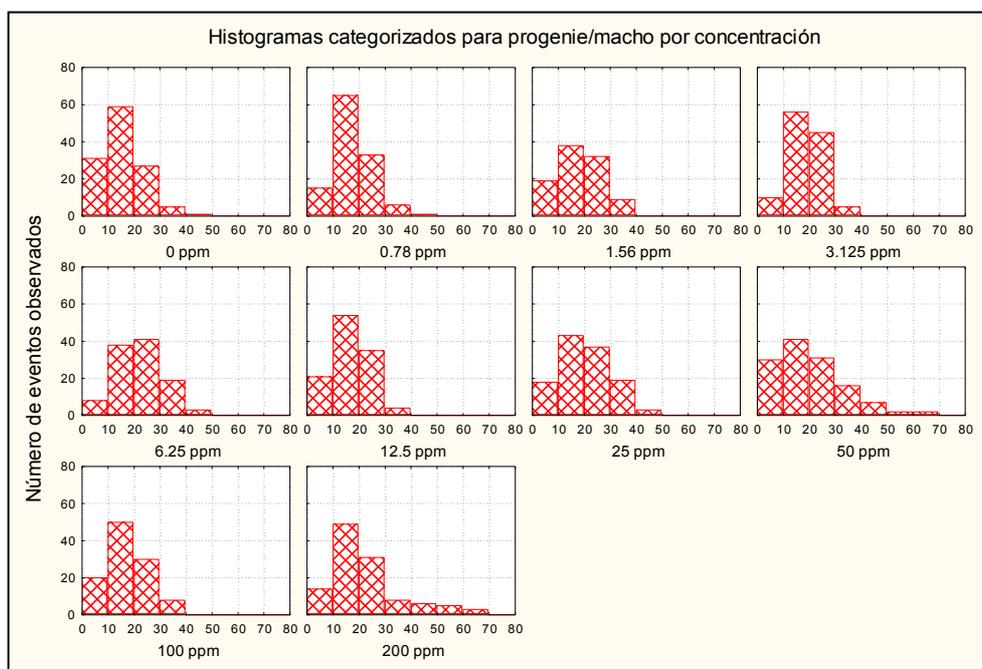
Tabla 15. Resultados de la prueba de Spjotvoll/Stoline ($\alpha=0.05$), mostrando las diferencias significativas para progenie entre concentraciones (rojo).

[ppm]	0	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
0										
0.78	0.5169									
1.56	0.7224	1								
3.125	0.5038	1	1							
6.25	3.68E-05	0.0874	0.1072	0.0961						
12.5	0.9870	0.9932	0.9983	0.9911	0.0033					
25	0.0081	0.8533	0.8813	0.8757	0.9124	0.2498				
50	0.0023	0.7039	0.7597	0.7374	0.9726	0.1409	1.0000			
100	0.9156	0.9999	1.0000	0.9999	0.0162	1.0000	0.5435	0.3741		
200	1.30E-05	0.0141	0.0275	0.0160	1.0000	0.0003	0.6089	0.7772	0.0026	

Los resultados del análisis Spjotvoll/Stoline muestran un aspecto muy interesante en cuanto a que distintas concentraciones presentaron una cantidad significativamente diferente de progenie promedio por macho con respecto al testigo (segunda columna, valores en rojo, Tabla 15). Esto indica que el tratamiento con diferentes concentraciones de la muestra ambiental provoca un cambio significativo en la cantidad de progenie, tanto en la concentración baja 6.25 ppm como para concentraciones mayores 25, 50 y 200 ppm.

Debe considerarse que el promedio de progenie por macho no necesariamente refleja la cantidad de descendencia que tienen todos los machos, ya que evidentemente existen algunos que son estériles así como otros que producen una cantidad muy superior de progenie con respecto al promedio. Una manera de comprender estas variaciones -sin analizar individualmente los 700 viales que se utilizaron en las cruzas individuales- es categorizar a la cantidad de progenie en grupos homogéneos y contar el número de eventos que se presentan. Esto permite conocer el número de machos con una descendencia mínima así como aquellos que tuvieron gran cantidad de progenie. Los resultados de esta categorización homogénea se presentan en la gráfica 4, cada una de las categorías comprende a 10 organismos descendientes y cada histograma corresponde a una concentración de tratamiento con la muestra ambiental.

Gráfica 4. Histogramas categorizados: número de machos que tuvieron cierta cantidad de progenie (categoría) en las cruzas individuales por concentración.



Como se había visto anteriormente, existe diferencia significativa en la cantidad promedio de progenie entre ciertas concentraciones y el testigo (ver Tabla 15). Si bien existen estas diferencias, lo más interesante son las diferencias significativas que existen entre distintas concentraciones y el testigo: 6.25, 25, 50 y 200 ppm. Al realizar una agrupación homogénea de la cantidad de progenie por macho (Gráfica 4), se observa que en ciertas concentraciones los valores se encuentran distribuidos en una cantidad menor de categorías (0 ppm: 4 categorías) que en otras (200 ppm: 7 categorías). En las concentraciones cuya progenie no es significativamente distinta del testigo se distribuyen, como el testigo, en 4 categorías (0.78 ppm, 1.56 ppm, 3.125 ppm, 12.5 ppm y 100 ppm), mientras que las concentraciones que sí son distintas se distribuyen en una cantidad mayor de categorías tales que 6.25 ppm: 5 categorías; 25 ppm: 5 categorías; 50 ppm: 7 categorías; 200 ppm: 7 categorías.

Discusión

La muestra ambiental

El hecho de encontrar una muestra ambiental que contenga alrededor del 15% de metales pesados es preocupante. Como se ha mencionado, se espera que las cromadoras produzcan este tipo de residuos, con una alta abundancia de compuestos con hierro y cromo (Medeiros *et al.*, 2003). Sin embargo, en muchos países del mundo existen medidas especiales para el manejo de éste y otros tipos de residuos (WHO, 2000), lo cual evidentemente no sucedió en el caso de Cromatos de México. Se considera que lo anterior se vio favorecido principalmente por la falta de un marco normativo mexicano con respecto al manejo de estos desechos, especialmente en los años en los que operaba la empresa. Más aún, los residuos de la empresa eran donados al municipio de Tultitlán de Mariano Escobedo, para la nivelación de las calles (que no se encontraban pavimentadas) en la zona de Lechería, el relleno de cimientos, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 1985). Hoy todavía, en algunas ocasiones puede verse el afloramiento de estos residuos en algunas calles que no han sido pavimentadas, o cuando se presentan grandes cuarteaduras en el concreto.

La figura 8 muestra claramente este tipo de afloramientos. Nótese además al fondo de la calle (cerrada) se encuentran unas 5 casas habitación, y que la gente que las habita debe caminar siempre sobre estos residuos ya que no existe ninguna otra forma de salir hacia la zona de Lechería. La muestra ambiental fue tomada de una zona muy cercana a este lugar. En la fig. 9 se pueden apreciar los residuos de la cromadora, que presentan una coloración amarilla muy llamativa.



Figura 8. Calle aledaña al contenedor de Cromatos de México (no pavimentada). El color amarillo más claro es característico de residuos con cromo.



Figura 9. Residuos crómicos en un muro exterior de Cromatos de México.

Una manera fácil para distinguir si se tienen sales de Cromo o Azufre en campo, es haciendo una prueba de solubilidad en agua. A pesar de tener el mismo color, las sales de azufre son insolubles en agua, mientras que las de cromo sí lo son. Confirmando esto, los análisis de espectrofotometría de absorbancia atómica indican que la muestra contiene un 10% de cromo y virtualmente nada de azufre. El hecho de encontrar este tipo de compuestos expuestos al ambiente y al contacto directo con la población nos habla de una situación de alto riesgo, aunque también debe reconocerse que se trata de un caso invaluable para la genotoxicología ambiental.

Los organismos tratados

Como lo indica la prueba de MANOVA/Tukey (Tabla 7), el IS de los organismos tratados no es significativamente distinto a aquel de los testigos (organismos no tratados). Dado esto, se puede establecer que el tratamiento por alimentación de la muestra ambiental a diferentes concentraciones no afecta significativamente la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster*. La primera observación que se hace con respecto al IS es tratar de encontrar un “patrón” o tendencia que nos indique qué es lo que pasa cuando se aumenta la concentración de compuesto o muestra a probar. En la visión más clásica de la toxicología se maneja un modelo de dosis/respuesta prácticamente lineal, en el cual, a mayor concentración se espera una mayor cantidad de daño observable. Ahora sabemos que esto no es del todo cierto, sobre todo cuando se trabaja a concentraciones bajas como en este trabajo (Wise *et al.*, 1994; Zhitkovich *et al.*, 1996; Ramos-Morales, c.p.). Así pues, no es tan fácil definir un patrón de comportamiento del IS con respecto a las concentraciones, y lo que las gráficas 1 y 2 muestran es justamente que no existe linealidad en la respuesta.

Un aspecto interesante es que en muchos de los casos se obtienen valores de IS superiores a los del testigo. Nuevamente en una visión clásica no se puede concebir que los organismos tratados con elementos nocivos sobrevivan más que aquellos no tratados. En todos los organismos, un hecho generalizado es que de aquellos que inician el desarrollo, hay una fracción característica que no alcanza la edad reproductiva, la pérdida de estos organismos puede ocurrir en cualquier momento a partir de la fecundación y hasta poco antes de la madurez sexual. En el caso de *Drosophila melanogaster* se ha determinado que alrededor del 40 % de los huevos que pone una hembra no tratada no terminan su desarrollo y por lo tanto mueren –como huevos, larva o pupa– sin llegar al estadio adulto (García-Niño, 2004). Esto se ha explicado por el fallo en la activación de uno o varios genes maestros, o de un mecanismo de diferenciación celular. Sin embargo, el estrés provocado por el tratamiento con agentes genotóxicos puede provocar la activación de estos mecanismos, o puede provocar la activación de otros procesos celulares y sistémicos que permitan un resultado equivalente, lo cual explicaría porqué se observan IS más altos en los tratados que en los testigos (Zhitkovich *et al.*, 1996; Ramos-Morales, c.p.).

La prueba de clastogenia SCLT

- **Cruzas masivas**

La utilización de los marcadores morfológicos en *Drosophila melanogaster* permite hacer una evaluación rápida y precisa de toda una serie de eventos genéticos. A pesar de que se sabe que el cromo tiende a interactuar con el DNA al entrar a la célula, en este trabajo no se aplicó una prueba de mutagénesis. Esto es debido a que ya se han descrito una gran variedad de compuestos de cromo con capacidad clastogénica, y si bien la prueba SCLT no permite detectar las mutaciones, sí permite evaluar el efecto clastogénico predicho para la

muestra ambiental. Un clastógeno ambiental representa un alto riesgo para las poblaciones, y los efectos a corto y largo plazo son tan importantes en una evaluación de riesgo como el de los mutágenos, teratógenos y carcinógenos (WHO, 2000). De hecho, un aspecto interesante del cromo hexavalente es que presenta efectos de toxicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad probados para humanos y otros sistemas (EPA, 2000).

Los resultados de las pruebas multinominales para cruza masivas nos indican no solo el hecho de que la muestra ambiental tiene la posibilidad de afectar a los cromosomas sexuales, sino que este efecto es transgeneracional. Este efecto heredable puede estar dado por daño a nivel de la diferenciación espermática en el macho tratado (no disyunción de cromosomas sexuales, pérdidas parciales y totales), o bien en el paso de arreglos cromosómicos inestables que provoquen en su progenie daños somáticos visibles en la morfología (ginandromorfos, mala fusión de segmentos abdominales, alteración de estructuras, mosaicos celulares).



Figura 10. XX/X0: Mosaico celular en una de las moscas de la prueba SCLT

El tipo de fenómeno mostrado en la Figura 10 indica que la mosca heredó del parental macho una estructura cromosómica inestable, por lo que a través de las divisiones celulares se perdió el marcador w^a (ojo color durazno) y entonces se hizo visible la forma silvestre (ojo color rojo), por lo cual se observa que el ojo tiene dos colores. Este fenómeno puede presentarse de manera natural (Crew, 1965), sin embargo los tratamientos incrementan significativamente la frecuencia de aparición para este caso así como para los demás eventos que mide la SCLT. La figura 11 muestra una hembra B^S recobrada a través de un evento de no-disyunción en el macho tratado.



Figura 11. Hembra B^S (XXY), resultado de no disyunción en el macho tratado

- **Cruzas individuales**

Este tipo de cruce es una modificación al protocolo original de la prueba “Sex chromosome loss test” o SCLT (Zimmering, 1987). El hacer una cruce individual permite evaluar el efecto específico de acuerdo a la susceptibilidad individual de los machos tratados, y

también permitió medir la fecundidad diferencial entre machos, aspecto que no puede hacerse en las cruza masivas.

La Gráfica 3 muestra los promedios de los índices de sobrevivencia (IS) por concentración para los 5 tratamientos. Como lo indican los resultados de la prueba MANOVA/Tukey (Tabla 7), no existen diferencias significativas entre la sobrevivencia del testigo y las demás concentraciones. Sin embargo, la prueba de Spjotvoll/Stoline (Tabla 10) muestra que existen diferencias significativas entre ciertos tratamientos. Si bien esto no se espera ya que cada tratamiento es una repetición de la misma metodología, debe recordarse que la muestra ambiental es una mezcla compleja, y por lo tanto no es homogénea. Así pues, al hacer las diluciones sucesivas para las diferentes concentraciones a probar, el hecho de que se haya tomado la misma cantidad de muestra no garantiza que se hayan tomado exactamente los mismos compuestos y en las mismas cantidades. Este es un aspecto común cuando se está trabajando con muestras ambientales, notablemente en muestras complejas. La agrupación homogénea (Tabla 11) muestra que no existe ninguna relación cronológica (los tratamientos se fueron realizando de T1 a T5) ni tampoco en el tipo de procedimiento para las cruza (masivas e individuales), sino que se trata de asociaciones aleatorias (que unen por ejemplo a los tratamientos 1 y 4, realizados en distintos tiempos, uno para cruza masivas y otro para individuales) que indican que la muestra no es uniforme.

En las pruebas multinominales para cruza individuales, nuevamente se encontraron siempre valores significativos para todas las concentraciones. Esto indica que la muestra ambiental a diferentes concentraciones tiene potencial para causar un daño clastogénico a los individuos expuestos. Dado que los residuos de los cuales se obtuvo la muestra se

encuentran directamente expuestos a la población (ver Figura 9), es evidente que la población de Lechería se encuentra frente a una situación de muy alto riesgo. Prueba de esto son los numerosos casos de cáncer que se han presentado en la zona, notablemente neoplasias pulmonares (Diario Amanecer, varios ejemplares).

Análisis de fecundidad de los machos tratados

En las cruza masivas se asume que cada una de las moscas que se encuentra en el frasco se reproduce una cierta cantidad de veces y la progenie observada es una mezcla de la descendencia de todos los ejemplares. Lo que las cruza individuales muestran es que esto no siempre es así, ya que se presenta el hecho de que muchos machos nunca se reproducen, por lo cual la progenie observada solo deriva de un cierto número de moscas y no de la totalidad de ellas. Al colocar a un macho con dos hembras vírgenes, se puede determinar su tasa reproductiva y de fecundidad (cantidad de progenie por organismo expuesto), ya que no todos los machos tienen la misma cantidad de hijos, y que la composición de su progenie esta relacionado con un daño a nivel de células reproductivas provocado por el tratamiento con la muestra ambiental en el estadio larvario.

La prueba MANOVA para concentración y sexo contra progenie (Tabla 14) muestra que existen diferencias significativas en la cantidad de progenie por macho y proporción de sexos entre las diferentes concentraciones probadas. Si bien en el testigo no se espera que todos los machos tengan la misma cantidad de progenie, se esperaría que no existieran diferencias significativas entre éste y las demás concentraciones si la muestra no afectase la fecundidad de los machos tratados. La prueba MANOVA indica lo contrario, y las

diferencias específicas para progenie entre concentraciones dadas por la prueba Spjotvoll/Stoline (Tabla 15) lo confirman. Si bien existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de tratamiento (valores en rojo, Tabla 15), lo más interesante son las diferencias significativas que existen entre distintas concentraciones y el testigo. Las concentraciones 6.25, 25, 50 y 200 ppm tienen un efecto significativo en la cantidad de progenie que tuvieron los machos tratados, más específicamente que estas concentraciones se “agrupan” en 5 o más categorías, mientras que las que no presentan diferencias significativas se agrupan solo en cuatro. Este tipo de fenómeno muestra una variación no lineal de la respuesta observable a bajas concentraciones, en la cual se observan valores significativos comprendidos entre valores no significativos, y es característico de respuestas positivas a bajas concentraciones (Ramos-Morales *et al.*, 2000; 2002). Todo esto indica que la muestra tiene el potencial para afectar a la progenie de los machos expuestos a distintas concentraciones bajas (desde 6.25 ppm).

La situación actual de Cromatos: una zona de alto riesgo para la población.

Aunque las autoridades del Estado de México afirman que no se ha rebasado la media nacional, ha habido una gran cantidad de casos de cáncer en la comunidad de Lechería desde hace 50 años (Diario Amanecer, varios ejemplares). Uno de los casos más escandalosos fue la presencia de una gran cantidad de niños con Leucemia, todos alumnos de la escuela primaria “La Reforma” cuyos muros son aledaños al contenedor que tiene en su interior las 75 000 toneladas de residuos que quedan como huella de la existencia operacional de la cromadora (Secretaría de Salud del Estado de México). Existen además reportes de personas con perforación del tabique nasal así como una gran cantidad de

habitantes que presentan sangrado nasal frecuente. De hecho, en el transcurso del 2005, han muerto unas 12 personas por cáncer pulmonar en Lechería (Diario Amanecer, varios ejemplares, 2003; 2004; 2005).

El hecho de que aún a concentraciones muy bajas (0.78 ppm de muestra equivalentes a 0.07 ppm de Cr[VI]) se presente un efecto clastogénico significativo, nos habla de la capacidad que tienen este tipo de compuestos para causar daño genético. Esto nos lleva a pensar que, dado el estado actual del contenedor y la filtración de los residuos hacia el exterior del predio, Lechería se encuentra en un estado de alto impacto ambiental. El contenedor (fig. 12) en donde se encuentra la mayor parte de los residuos (entre 75 000 y 120 000 toneladas) no fue construido siguiendo las especificaciones necesarias, y es sabido que ya ha habido filtraciones hacia el manto freático del valle de Tultitlán (Gutiérrez *et al.*, 1985). De hecho dicha construcción parece estarse colapsando (al igual que todas las construcciones del predio), ya que presenta una gran cantidad de grietas y perforaciones en su superficie, además de la precipitación de sales de cromo.



Figura 12. Vista del contenedor de Cromatos de México

El hecho de que se pueda tomar una muestra ambiental raspando la pared (a la cual tiene acceso cualquier persona) que contenga aproximadamente 100 000 ppm de cromo es simplemente alarmante, más aún si el 97% de este cromo es hexavalente (estado de oxidación que la EPA ha considerado como carcinógeno humano probado por vía respiratoria). El potencial clastogénico de la muestra indica que los pobladores de la zona se encuentran en muy alto riesgo, ya que los residuos pueden aumentar significativamente la frecuencia de cánceres (particularmente pulmonares) y otras patologías asociadas con la alteración de los cromosomas y el material genético.

La manera por la cual un efecto clastogénico conduce al cáncer ha sido explicada por diversos autores. Ried *et al.* (1995; 1998; 2004; 2005) han demostrado que la inestabilidad cromosómica y los rompimientos de las estructuras cromosómicas conducen generalmente a la reparación por recombinación entre cromátidas hermanas. Es sabido que en los casos de cáncer el orden en el que se encuentran las secuencias y la presencia de reguladores son esenciales en la aparición de las neoplasias (Dorritie *et al.*, 2005). El problema es que al reparar por recombinación, pueden quedar desplazadas las secuencias de regulación que acompañan a un gen. El caso de la familia de genes *breast cancer* es un ejemplo muy claro. No es necesario que se altere la secuencia del gen para que se provoque el cáncer –de hecho estos genes están presentes de manera natural en los organismos, incluso en *Arabidopsis thaliana*– sino que se pierda la asociación con sus secuencias regulatorias (es decir que la reparación por recombinación permite conservar íntegras las secuencias pero no siempre el orden en el cual estas se ubican en el cromosoma). El cáncer de seno en humanos –por ejemplo– se presenta cuando se pierde la secuencia regulatoria que tiene una posición previa en el cromosoma (Valdés, c.p.), y esto generalmente está asociado a la reparación

por recombinación (Ghadimi *et al.*, 2005), que puede ser provocada por mezclas complejas como la utilizada en este trabajo. Upender *et al.*, (2004) también han mostrado que las aneuploidías pueden resultar en una desregulación compleja del transcriptoma celular, conduciendo generalmente a cáncer. Estas aneuploidías también pueden ser producidas por la exposición a la muestra ambiental, y lo más grave es que este efecto no es siempre visible inmediatamente, sino a través de las generaciones.

Como lo indican los análisis de fecundidad, el daño a las células reproductivas de los organismos expuestos también es un problema, aún a bajas concentraciones. La progenie de los humanos es mucho menor a la de *Drosophila melanogaster*, por lo que el efecto en las personas causado por los residuos no sería necesariamente a nivel de tasa de fecundidad, sin embargo está claro que la muestra tiene el potencial para afectar significativamente la progenie de las moscas tratadas, lo que indica que daña a las células reproductivas.

Algunos investigadores de la Facultad de Ingeniería de la UNAM, han propuesto realizar tratamientos químicos para cambiar la valencia de los residuos de Cr[VI] a Cr[III], con lo cual aparentemente se reduciría el riesgo. Si bien es cierto que el Cr[III] no ha sido aceptado como carcinógeno humano, su relación con el Cr[VI] es demasiado íntima como para ser ignorada. De acuerdo al “Toxic metals research program” de la Universidad de Dartmouth fundado por la Dra. Karen Wetterhahn (quien descubriera el mecanismo de acción del cromo hexavalente para dañar al DNA), las personas expuestas a mezclas de Cr[III] y Cr[VI] tienen 4 veces más posibilidades de contraer cáncer pulmonar que las no expuestas. La solución parece ser más bien una movilización y confinamiento adecuado de los residuos, más que el tratamiento químico *in situ* que dejaría una enorme cantidad de

residuos supuestamente “inactivos”. Es sabido que los estados de oxidación-reducción de los metales pueden cambiar de acuerdo a las condiciones ambientales o a la influencia de procesos biológicos (WHO, 2000). Es decir, no existe una garantía de que el Cr[III] permanezca inerte a lo largo del tiempo, como bien lo predice el modelo de Wetterhahn (Uptake-reduction model, 1994). Incluso, aunque se ha encontrado que el 90% de las personas tiene una dieta deficiente en Cr[III] se recomienda no tomar complementos alimenticios que contengan este metal ni exceder las dosis recomendadas, ya que tiende a acumularse en los tejidos de los seres humanos hasta alcanzar concentraciones en las que se han observado daños al DNA en animales e *in vitro* (Stearns *et al*, 1995). Consecuentemente, provocar la exposición de la población ante residuos cuya actividad no es completamente conocida implica un riesgo similar o incluso mayor, que debe evitarse a toda costa. Finalmente, con la deslocalización de las industrias hacia provincia, la zona de Tultitlán se está convirtiendo en una zona más densamente habitada, dado también por el actual programa presidencial de promoción de la vivienda (Fig. 13). Tristemente, no se tiene una idea clara de la capacidad de dispersión de los residuos, por lo que la cantidad de personas expuestas puede aumentar dramáticamente en los próximos años.



Figura 13. Casas Geo recién construidas en Tultitlán, Edo. de México.

Conclusiones

- El tratamiento con distintas concentraciones de muestra ambiental no afecta significativamente la sobrevivencia de los organismos.
- La exposición a la muestra ambiental altera significativamente la frecuencia de alteraciones genéticas medibles por la prueba SCLT, aún a bajas concentraciones.
- Los residuos filtrados tienen el potencial para afectar significativamente la fecundidad de los organismos tratados, lo que indica que son capaces de dañar a las células reproductoras.
- Los efectos de los residuos implican un gran peligro para la salud de las personas expuestas, con altas probabilidades de daño al material genético, al sistema respiratorio, así como problemas durante el embarazo y cáncer.
- Es necesario que se declare al predio de “Cromatos de México” como zona de desastre ecológico y que se tomen las medidas necesarias para detener la filtración de los residuos hacia el ambiente.



Figura 14. Muestra de la cantidad de sales que se precipitan en los muros de Cromatos de México.

Bibliografía

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1998. Toxicological Profile for Chromium. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia.
- Alcedo JA, Misra M, Hamilton JW, Wetterhahn KE. 1994. The genotoxic carcinogen chromium (VI) alters the metal-inducible expression but not the basal expression of the metallothionein gene in vivo. *Carcinogenesis*. May;15(5):1089-92.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 1999 TLVs and BEIs. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents, Biological Exposure Indices. Cincinnati, Ohio.
- Aschengrau A, Zierler S, Cohen A. 1993. Quality of community drinking water and the occurrence of late adverse pregnancy outcomes. *Arch Environ Health*. Mar-Apr;48(2):105-13.
- Auluck,P.K., EdwinChan,H.Y., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M.Y. y Bonini,N.M. 2002. Chaperone supression of -Synuclein toxicity in *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, **295**, 865–868.
- Benford,D.J., Hanley,B.A., Bottrill,K., Oehlschlager,S., Balls,M., Branca,F., Castengnaro,J.J., Descotes,J., Hemminiki,K., Lindsay,D. and Schitter,B. 2000. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. *Altern. Lab. Anim.*, **28**, 119–131.
- Butterworth, F. M., A. Gunatilaka y M.E. Gonsebatt (eds). 2001. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2: A handbook. Environmental science research vol. 56. Kluwer Academic / Plenum publishers.
- Clarke, A. M. 1982. The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutat Res*. Feb 22;92(1-2):89-97.
- Cohen MD, Kargacin B, Klein CB, Costa M. 1993. Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 23(3):255-81. Review.
- Crew, F. A. E. 1965. Determinación del sexo. Editorial Alhambra, S.A. Madrid, España.

- Crump C, Crump K, Hack E, Luippold R, Mundt K, Liebig E, Panko J, Paustenbach D, Proctor D. 2003. Dose-response and risk assessment of airborne hexavalent chromium and lung cancer mortality. *Risk Anal.* Dec;23(6):1147-63.
- De Flora S, Serra D, Basso C, Znacchi P. 1989. Mechanistic aspects of chromium carcinogenicity. *Arch Toxicol Suppl.* 13:28-39. Review.
- De Flora S, Serra D, Camoirano A, Znacchi P. 1989. Metabolic reduction of chromium, as related to its carcinogenic properties. *Biol Trace Elem Res.* Jul-Sep;21:179-87. Review.
- Depault F, Cojocar M, Fortin F, Chakrabarti S, Lemieux N. 2005. Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay. *Toxicol In Vitro.* Epub Nov 5.
- Dorantes V., Y. A. 2000. Aplicación de *Drosophila melanogaster* como biomonitor indicador de contaminación acuática. ENEP Iztacala. UNAM.
- Dorritie K, Montagna C, Difilippantonio MJ, Ried T. 2004. Advanced molecular cytogenetics in human and mouse. *Expert Rev Mol Diagn.* Sep;4(5):663-76.
- Dubrovskaya VA, Wetterhahn KE. 1998. Effects of Cr(VI) on the expression of the oxidative stress genes in human lung cells. *Carcinogenesis.* Aug;19(8):1401-7.
- Festing, M.F.W., Baumans, V., Combes, D.R., Hadler, M., Hendriksen, F.M., Howard, B.R., Lovell, D.P., Moore, G.J., Overend, P. and Wilson, M.S. 1998. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. *Altern. Lab. Anim.*, **26**, 283–301.
- Finnis M, Dayan S, Hobson L, Chenevix-Trench G, Friend K, Ried K, Venter D, Woollatt E, Baker E, Richards RI. 2005. Common chromosomal fragile site FRA16D mutation in cancer cells. *Hum Mol Genet.* 2005 May 15;14(10):1341-9. Epub Apr 6.
- Fornace AJ Jr, Seres DS, Lechner JF, Harris CC. 1981. DNA-protein cross-linking by chromium salts. *Chem Biol Interact.* Sep;36(3):345-54.
- Fossi MC. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. 1994. *Environ Health Perspect.* Dec;102 Suppl 12:49-54. Review.

- Gaivao, I., Sierra, L.M. and Comendator, M.A. 1999. The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutat. Res.*, **440**, 139–145.
- Gambelunghe A, Piccinini R, Ambrogi M, Villarini M, Moretti M, Marchetti C, Abbritti G, Muzi G. 2003. Primary DNA damage in chrome-plating workers. *Toxicology*. Jun 30;188(2-3):187-95.
- Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Fuzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, Ried T. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy.
- Glickman M. 1991. Epidemiological use of NHS activity data. *AMRO*. Feb;32(1):18-23.
- Gutiérrez, M. E., G. Bocco y S. Castillo. 1985. Contaminación por cromo en el norte de la Ciudad de México, un enfoque interdisciplinario. Proyecto de la dirección general de prevención y control de la contaminación. SEDUE.
- Hällström I, Magnusson J, Ramel C. 1982. Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*. Feb 22;92(1-2):161-8.
- Hneihen AS, Standeven AM, Wetterhahn KE. 1993. Differential binding of chromium(VI) and chromium(III) complexes to salmon sperm nuclei and nuclear DNA and isolated calf thymus DNA. *Carcinogenesis*. Sep;14(9):1795-803. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1826-38.
- Ishikawa Y, Nakagawa K, Satoh Y, Kitagawa T, Sugano H, Hirano T, Tsuchiya E. 1994. Characteristics of chromate workers' cancers, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: an autopsy study. *Br J Cancer*. Jul;70(1):160-6.
- Ishikawa Y, Nakagawa K, Satoh Y, Kitagawa T, Sugano H, Hirano T, Tsuchiya E. 1994. "Hot spots" of chromium accumulation at bifurcations of chromate workers' bronchi. *Cancer Res*. May 1;54(9):2342-6.

- Kar Chowdhuri,D., Nazir, A. and Saxena,D.K. 2001. Effect of three chlorinated pesticides on *hsw* stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **15**, 173–186.
- Kar Chowdhuri,D., Saxena,D.K. and Viswanathan,P.N. 1999. Effect of hexachlorocyclohexane (HCH), its isomers and metabolites on hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **63**, 15–25.
- Kazantsev,A., Walker,H.A., Slepko,N. *et al.* 2002. A bivalent Huntington binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat. Genet.*, **30**, 367–376.
- Kilbey BJ, MacDonald DJ, Auerbach C, Sobels FH, Vogel EW. 1981. The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutat Res. Jun*;85(3):141-6. Review.
- Knutsen T, Gobu V, Knaus R, Padilla-Nash H, Augustus M, Strausberg RL, Kirsch IR, Sirotkin K, Ried T. 2005. The interactive online SKY/M-FISH & CGH database and the Entrez cancer chromosomes search database: linkage of chromosomal aberrations with the genome sequence. *Genes, Chromosomes, Cancer*. Sep 44(1): 52-64.
- Kronenwett U, Huwendiek S, Castro J, Ried T, Auer G. 2005. Characterisation of breast fine-needle aspiration biopsies by centrosome aberrations and genomic instability. *Br J Cancer*. Jan 31;92(2):389-95.
- Lee WR, Abrahamson S, Valencia R, von Halle ES, Wurgler FE, Zimmering S. 1983. The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res. Oct*;123(2):183-279.
- Lindsley, D.L. y G.G. Zimm. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic press Inc.
- Lukanova A, Toniolo P, Zhitkovich A, Nikolova V, Panev T, Popov T, Taioli E, Costa M. 1996. Occupational exposure to Cr(VI): comparison between chromium levels in lymphocytes, erythrocytes, and urine. *Int Arch Occup Environ Health*. 69(1):39-44.

- Mason JM, Valencia R, Zimmering S. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*: VIII. Reexamination of equivocal results. *Environ Mol Mutagen*. 1992;19(3):227-34.
- McNeil N, Kim JS, Ried T, Janz S. 2005. Extrasosseous IL-6 transgenic mouse plasmacytoma sometimes lacks Myc-activating chromosomal translocation. *Genes Chromosomes Cancer*. Jun;43(2):137-46.
- Medeiros MG, Rodrigues AS, Batoreu MC, Laires A, Rueff J, Zhitkovich A. 2003. Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis*. Jan;18(1):19-24.
- Mertz, W., Roginski EE, Feldman FJ, Thurman DE. 1969. Dependence of chromium transfer into the rat embryo on the chemical form. *J Nutr*. Nov;99(3):363-7.
- Mertz, W., 1969. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev*. Apr;49(2):163-239. Review.
- Misra M, Alcedo JA, Wetterhahn KE. 1994. Two pathways for chromium(VI)-induced DNA damage in 14 day chick embryos: Cr-DNA binding in liver and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in red blood cells. *Carcinogenesis*. Dec;15(12):2911-7.
- Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. 2005. Accumulated Chromosomal Instability in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Malignant Transformation. *Stem Cells*. Epub Nov 10.
- Mukhopadhyay,I., Nazir,A., Saxena,D.K. and Kar Chowdhuri,D. 2002. Toxicity of cypermethrin: hsp70 as a biomarker of exposure in transgenic *Drosophila*. *Biomarkers*, 7, 501–510.
- Mukhopadhyay,I., Saxena,D.K. and Kar Chowdhuri,D. 2003. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster (hsp70-lacZ)*. *Environ. Health Perspect.*, 111, 1926–1932.
- Mukhopadhyay,I., Saxena,D.K., Bajpayee,V.K. and Kar Chowdhuri,D. 2003. Argemone oil induced cellular damage in the reproductive tissues of transgenic

Drosophila melanogaster: protective role of 70 kDa heat shock protein. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **17**, 223–233.

- Nagaya T, Ishikawa N, Hata H, Takahashi A, Yoshida I, Okamoto Y. 1994. Early renal effects of occupational exposure to low-level hexavalent chromium. *Arch Toxicol.* 68(5):322-4.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 1997. Pocket Guide to Chemical Hazards. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention. Cincinnati, OH.
- Nazir,A., Mukhopadhyay,I., Saxena,D.K. and Kar Chowdhuri,D. 2001. Chlorpyrifos induced hsp70 expression and effects on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp70-lacZ*)Bg9. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **41**, 443–449.
- Nazir,A., Mukhopadhyay,I., Saxena,D.K. and Kar Chowdhuri,D. 2003. Evaluation of no observed adverse effect level (NOAEL) of solvent dimethyl sulphoxide in *Drosophila melanogaster*: a developmental, reproductive and cytotoxicity study. *Toxicol. Mech. Methods*, **13**, 147–152.
- Nazir,A., Saxena,D.K. and Kar Chowdhuri,D. 2003. Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochem. Biophys. Acta*, 1621, 218–225.
- O'Brien, T.J., S. Ceryak y S.R. Patierno. 2003. Complexities of Chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mut. Rsch.* 533. 3-36.
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA). 1998. Occupational Safety and Health Standards, Toxic and Hazardous Substances. Code of Federal Regulations. 29 CFR 1910.1000.
- O'Flaherty EJ, Kerger BD, Hays SM, Paustenbach DJ. 2001. A physiologically based model for the ingestion of chromium(III) and chromium(VI) by humans. *Toxicol Sci.* Apr;60(2):196-213.

- Osgood C, Bloomfield M, Zimmering S. 1991. Aneuploidy in *Drosophila*, IV. Inhalation studies on the induction of aneuploidy by nitriles. *Mutat Res.* Feb; 259(2):165-76.
- Osgood C, Zimmering S, Mason JM. 1991. Aneuploidy in *Drosophila*, II. Further validation of the FIX and ZESTE genetic test systems employing female *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* Feb;259(2):147-63.
- Paustenbach DJ, Finley BL. 1999. DNA-protein cross-links as a biomarker of Cr(VI) exposure. *Environ Health Perspect.* Oct;107(10):A494-5
- Quievryn G, Goulart M, Messer J, Zhitkovich A. 2001. Reduction of Cr (VI) by cysteine: significance in human lymphocytes and formation of DNA damage in reactions with variable reduction rates. *Mol Cell Biochem.* Jun;222(1-2):107-18.
- Quievryn G, Messer J, Zhitkovich A. 2002. Carcinogenic chromium(VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA in vitro and in human lung A549 cells. *Biochemistry.* Mar 5;41(9):3156-67.
- Ramos-Morales P, Rodriguez-Arnaiz R. 1995. Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen.* 25(4):288-99.
- Ramos-Morales, P. 1994. Efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias, División de estudios de posgrado. UNAM.
- Rao, VK, Knutsen T, Ried T, Wangsa D, Flynn BM, Langham G, Egorin MJ, Cole D, Balis F, Steinberg SM, Bates S, Fojo T. 2005. The extent of chromosomal aberrations induced by chemotherapy in non-human primates depends on the schedule of administration. *Mutat Res.* Jun 6;583(2):105-19.
- Rao VK, Wangsa D, Robey RW, Huff L, Honjo Y, Hung J, Knutsen T, Ried T, Ried T, Dorritie K, Weaver Z, Wangsa D, Difilippantonio MJ, Montagna C. 2004. Molecular cytogenetics of mouse models of breast cancer. *Breast Dis.* 19:59-67.
- Ried T, Just K, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher M, Schröck E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T, Auer G. 1995. Comparative Genomic

Hybridization of Formalin-fixed, Paraffin-embedded Breast Tumors Reveals Different Patterns of Chromosomal Gains and Losses in Fibroadenomas and Diploid and Aneuploid Carcinomas. *Cancer Res.* 55. 5415-5423.

- SAIC. 1998. PM/Toxics Integration: Addressing Co-Control Benefits. Submitted to U.S. Environmental Protection Agency. Office of Air Quality Planning and Standards. Research Triangle Park, NC.
- Sehgal A, Osgood C, Zimmering S. Aneuploidy in *Drosophila*. 1990. III: Aneuploidogens inhibit in vitro assembly of taxol-purified *Drosophila* microtubules. *Environ Mol Mutagen*;16(4):217-24.
- Singh J, Pritchard DE, Carlisle DL, Mclean JA, Montaser A, Orenstein JM, Patierno SR. 1999. Internalization of carcinogenic lead chromate particles by cultured normal human lung epithelial cells: formation of intracellular lead-inclusion bodies and induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* Dec 15;161(3):240-8.
- Standeven AM, Wetterhahn KE. 1992. Ascorbate is the principal reductant of chromium(VI) in rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium-DNA binding in vitro. *Carcinogenesis.* Aug;13(8):1319-24.
- Stearns DM, Belbruno JJ, Wetterhahn KE. 1995. A prediction of chromium(III) accumulation in humans from chromium dietary supplements. *FASEB J.* Dec;9(15):1650-7.
- Stearns DM, Courtney KD, Giangrande PH, Phieffer LS, Wetterhahn KE. 1994. Chromium(VI) reduction by ascorbate: role of reactive intermediates in DNA damage in vitro. *Environ Health Perspect.* Sep;102 Suppl 3:21-5.
- Stearns DM, Kennedy LJ, Courtney KD, Giangrande PH, Phieffer LS, Wetterhahn KE. 1995. Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks in vitro. *Biochemistry.* Jan 24;34(3):910-9.
- Stearns DM, Wetterhahn KE. 1997. Intermediates produced in the reaction of chromium(VI) with dehydroascorbate cause single-strand breaks in plasmid DNA. *Chem Res Toxicol.* Mar;10(3):271-8.

- Stearns DM, Wetterhahn KE. 1994. Reaction of chromium(VI) with ascorbate produces chromium(V), chromium(IV), and carbon-based radicals. *Chem Res Toxicol.* Mar-Apr;7(2):219-30.
- Stearns DM, Wise JP Sr, Patierno SR, Wetterhahn KE. 1995. Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *FASEB J.* Dec;9(15):1643-8.
- Sutherland JE, Zhitkovich A, Kluz T, Costa M. 2000. Rats retain chromium in tissues following chronic ingestion of drinking water containing hexavalent chromium. *Biol Trace Elem Res.* Apr;74(1):41-53.
- Taioli E, Zhitkovich A, Kinney P, Udasin I, Toniolo P, Costa M. 1995. Increased DNA-protein crosslinks in lymphocytes of residents living in chromium-contaminated areas. *Biol Trace Elem Res.* Dec;50(3):175-80.
- U.S. Department of Health and Human Services. 1993. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Integrated Risk Information System (IRIS) on Chromium VI. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Integrated Risk Information System (IRIS) on Chromium III. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Toxicological Review of Hexavalent Chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Toxicological Review of Trivalent Chromium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- Upender MB, Habermann JK, McShane LM, Korn EL, Barrett JC, Difilippantonio MJ, Ried T. 2004. Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex

dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.* Oct 1;64(19):6941-9.

- Valencia R, Mason JM, Zimmering S. 1989. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. VI. Interlaboratory comparison of mutagenicity tests after treatment of larvae. *Environ Mol Mutagen*;14(4):238-44.
- Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. 1999. Suppression of polyglutamine mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperon HSP70. *Nat. Genet.*, **23**, 425–428.
- Weber BG, Semlitsch MF, Streicher RM. 1993. Total hip joint replacement using a CoCrMo metal-metal sliding pairing. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* May;67(5):391-8.
- Weimer, R.C. 1996. *Estadística*. Compañía editorial continental. México.
- Wetterhahn KE, Hamilton JW, Aiyar J, Borges KM, Floyd R. 1989. Mechanism of chromium(VI) carcinogenesis. Reactive intermediates and effect on gene expression. *Biol Trace Elem Res.* Jul-Sep;21:405-11. Review.
- Wetterhahn KE, Hamilton JW. 1989. Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: effect on gene expression. *Sci Total Environ.* Oct 1;86(1-2):113-29.
- Wiegand HJ, Ottenwalder H, Bolt HM. 1985. Fast uptake kinetics in vitro of ⁵¹Cr (VI) by red blood cells of man and rat. *Arch Toxicol.* Apr;57(1):31-4.
- Wiegand HJ, Ottenwalder H, Bolt HM. 1984. The reduction of chromium (VI) to chromium (III) by glutathione: an intracellular redox pathway in the metabolism of the carcinogen chromate. *Toxicology.* Dec;33(3-4):341-8.
- Wise JP Sr, Stearns DM, Wetterhahn KE, Patierno SR. 1994. Cell-enhanced dissolution of carcinogenic lead chromate particles: the role of individual dissolution products in clastogenesis. *Carcinogenesis.* Oct;15(10):2249-54.
- Wise JP Sr, Stearns DM, Wetterhahn KE, Patierno SR. 1994. Cell-enhanced dissolution of carcinogenic lead chromate particles: the role of individual dissolution products in clastogenesis. *Carcinogenesis.* Oct;15(10):2249-54.
- Witmer CM, Harris R, Shupack SI. 1991. Oral bioavailability of chromium from a specific site. *Environ Health Perspect.* May;92:105-10.

- World Health Organization (WHO). 1988. Chromium Environmental Health Criteria 61. Geneva, Suiza.
- Xie H, Holmes AL, Wise SS, Gordon N, Wise JP Sr. 2004. Lead chromate-induced chromosome damage requires extracellular dissolution to liberate chromium ions but does not require particle internalization or intracellular dissolution. *Chem Res Toxicol.* Oct;17(10):1362-7.
- Zhitkovich A, Quievryn G, Messer J, Motylevich Z. 2002. Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). *Environ Health Perspect.* Oct;110 Suppl 5:729-31.
- Zhitkovich A, Shrager S, Messer J. 2000. Reductive metabolism of Cr(VI) by cysteine leads to the formation of binary and ternary Cr--DNA adducts in the absence of oxidative DNA damage. *Chem Res Toxicol.* Nov;13(11):1114-24.
- Zhitkovich A, Voitkun V, Costa M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry.* Jun 4;35(22):7275-82.
- Zhitkovich A, Voitkun V, Kluz T, Costa M. 1998. Utilization of DNA-protein cross-links as a biomarker of chromium exposure. *Environ Health Perspect.* Aug;106 Suppl 4:969-74.
- Zijlstra JA, Vogel EW. 1988. Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hydrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* Nov;202(1):251-67.
- Zijlstra JA, Vogel EW. 1988. Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* Mar;198(1):73-83.
- Zimmering S, Mason JM, Osgood C. 1986 Current status of aneuploidy testing in *Drosophila*. *Mutat Res.* Jan-Mar;167(1-2):71-87.
- Zimmering S. 1983. Selective elimination of potential ring-X as opposed to rod-X in matings of males treated with diepoxybutane (DEB) to repair-deficient st mus302 females of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*;5(3):363-5.

- Zimmering S. 1982. Induced chromosome loss following treatment of postmeiotic cells of the *Drosophila melanogaster* male with MMS and DMN and matings with repair-proficient females and the repair-deficient females *mei-9a* and *st mus302*. *Mutat Res.* May;94(1):79-86.
- Zimmering S., Mason JM, Aaron CS, Lee WR, Smith PD, Thakar A, Valencia R, Woodruff RC, Wurgler FE. 1987. A guide for performing germ cell mutagenesis assays using *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* Oct;189(2):93-102.
- Zimmering S, Kammermeyer KL. 1982. On the nature of partial losses of the Y chromosome from treatment of ring-X/BSYy+ males with diethylnitrosamine (DEN) or procarbazine and matings with repair-deficient *st mus302* females of *Drosophila*. *Mutat Res.* Apr;104(1-3):121-3.
- Zimmering S, Osgood C, Mason JM. 1990. Aneuploidy in *Drosophila*, I. Genetic test systems in the female *Drosophila melanogaster* for the rapid detection of chemically induced chromosome gain and chromosome loss. *Mutat Res.* Oct; 234(5):319-26.
- Zimmering S. 1982. Induced chromosome loss with nitrosopiperidine in the male *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*;4(4):521-4.
- Zimmering S. 1992. Sex chromosome loss induced by X-rays in sperm of *Drosophila*. *Mutat Res.* Jan;281(1):1-2.