



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INDUCTORA DE  
ADUCTOS ADN-PROTEINAS POR EFECTO DEL  
ARSÉNICO Y FLÚOR EN HÍGADO Y RIÑÓN DE  
RATÓN DE LA CEPA BALB/c”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**IRIS MENDOZA VELÁZQUEZ**

**ASESORA: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

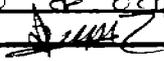
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

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

NOMBRE: Lris Mendoza  
Velázquez

FECHA: 20 de octubre del 2005

FIRMA: 



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio de la capacidad inductora de aductos ADN-Proteínas  
por efecto del arsénico y flúor en hígado y riñón de ratón  
de la cepa BALB/c"

que presenta la pasante: Iris Mendoza Velázquez  
con número de cuenta: 092028702 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de septiembre de 2005

PRESIDENTE	<u>QFI. Leticia Zúñiga Ramírez</u>	
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Patricia Ramírez Noguera</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Martha Patricia Campos Peón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MFC. Cecilia Hernández Barba</u>	

## DEDICATORIAS

### DIOS

*Porque has estado conmigo siempre en mi pensamiento en mi corazón en mi vida, porque en los momentos más difíciles no perdí la fe en ti, porque me lo has dado todo sin que yo me hubiera dado cuenta, hasta ahora en este momento de reflexión.*

### MAMITA

*"Parecía irrealizable el momento de poder ofrecerte la cosecha que sembraste hace muchos ayeres".*

*Gracias porque sin ti no hubiera podido lograrlo, porque en ti tengo un ejemplo de lucha y de lo más importante de amor y entrega, gracias por demostrarme que no se debe rendir uno nunca, por enseñarme que con esperanza, fe y esfuerzo se puede lograr lo que se cree imposible.*

### PAPI

*Por estar a mi lado y ofrecerme tu apoyo y paciencia. Se que con esto contribuyo un poco a la alegría que te caracteriza. Gracias por quererme tanto eres muy bien correspondido te quiero Papi*

### A MI HIJA XIUNHEL

*Al mirarte ahora no puedo evitar darme cuenta cuanto tiempo ha pasado. Parte de ese tiempo no he estado a tu lado por querer cumplir con este objetivo que me propuse hace mucho tiempo y tú de tan pequeña entendiste mi ausencia y te acostumbraste a ello. Gracias mi amor por ofrecerme un abrazo cuando me vez llegar. Te dedico este trabajo porque eres lo más importante en mi vida y sólo quisiera tener la oportunidad de verte crecer y poder brindarte parte de los frutos que este esfuerzo traerá con seguridad. Eres mi adoración.*

### A MIS HERMANOS LAURA Y JULIO

*No puedo más que ofrecerles con todo mi amor este logro que también les pertenece. Son los mejores hermanos del mundo, gracias por el esfuerzo que hicieron al apoyarme y por la paciencia que me tuvieron. Son mis mejores CUATES*

### ALEX

*Ha sido difícil y largo el camino para lograr esto, pero no estando a tu lado hubiese sido imposible. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, espero que el tiempo nos una aún más. Te amo eres muy importante en mi vida*

### A MI SOBRINA YOLOTL

*Mi pequeña "pelas" gracias por tolerar mis malos ratos. Llegaste de manera inesperada y de esa manera también te ganaste mi corazón Te quiero mucho*

#### **A LA MEMORIA DE LOANA**

*Porque contribuiste con un poco para hacer menos duro el recorrido en la escuela, por cuidar a mi hija y darle todo tu cariño, porque al partir me dejaste una lección muy dura pero que realmente aprendí. Gracias donde quiera que te encuentres*

#### **A MI (SSS) SANDRA**

*Por estar conmigo y apoyarme en todo momento espero que el tiempo no destruya la amistad que hemos logrado TQM, no olvido los hermosos momentos que hemos pasado juntas*

#### **A MI AMIGUI ARLET**

*Por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio y por tu apoyo durante la parte experimental de este trabajo, eres realmente una buena amiga a la cual quiero mucho.*

#### **AGRADECIMIENTOS**

##### **A LA UNAM**

*Gracias por permitirme pasar realmente momento agradables durante mi formación por lo cual soy orgullosamente universitaria*

##### **A LA DRA. PATY**

*Gracias, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y porque realmente la admiro y se que es un ejemplo de mujer tenaz sencilla y capaz de realizar lo que se proponga.*

##### **A VERO Y NYDIA**

*Gracias por dejarme pasar junto a ustedes realmente momentos divertidos y agradables.*

##### **A LA DOCTORA GONSEBATT**

*Por la disponibilidad para la realización de este trabajo.*

##### **SANDRA, ARLET, VERO, NYDIA, VICTOR, OSCAR, MARTHA Y LA DRA. PATY**

*Gracias por hacer mas sencillos estos momentos, por pertenecer al selecto grupo de trabajo del laboratorio de TOXICOLOGÍA CELULAR*

*GRACIAS a mi suegra Laura por apoyarme ofreciéndome su hogar y dejarme pertenecer a su familia.*

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO I MARCO TEORICO</b>	
<b>1.0 Propiedades del arsénico</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Propiedades del flúor</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Fuentes naturales del arsénico</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Factores que influyen en el contenido de arsénico en el suelo</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Fuentes naturales del flúor</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Fuentes antropogénicas del arsénico</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Fuentes antropogénicas del flúor</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Usos y aplicaciones del arsénico</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Usos y aplicaciones del flúor</b>	<b>16</b>
<b>1.9 Fuentes de contaminación del arsénico</b>	<b>17</b>
<b>1.10 Fuentes de contaminación del flúor</b>	<b>17</b>
<b>1.11 Fuentes de exposición por arsénico</b>	<b>17</b>
<b>1.12 Fuentes de exposición por flúor</b>	<b>19</b>
<b>1.13 Incidencia en México por la exposición a arsénico y flúor</b>	<b>20</b>
<b>1.14 Modos de administración del flúor</b>	<b>22</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>2.0 Metabolismo del arsénico</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Metabolismo del flúor</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Mecanismo de toxicidad del arsénico pentavalente</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Mecanismos de toxicidad del arsénico trivalente</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Mecanismo de toxicidad del flúor</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Genotoxicidad del arsénico</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Efectos genotóxicos del flúor</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Citotoxicidad del flúor</b>	<b>31</b>
<b>2.8 Flúor y la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>34</b>
<b>2.9 Mecanismos de acción relacionados con la carcinogenicidad por efecto del arsénico</b>	<b>34</b>
<b>2.10 Mecanismos de acción del flúor</b>	<b>35</b>

## **CAPITULO III**

<b>3.0 Importancia del flúor y el arsénico en la salud</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Fluoruro de sodio</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Fluorosis mundial</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Fluorosis en México</b>	<b>43</b>
<b>3.4 Efectos en la salud por arsénico</b>	<b>44</b>
<b>3.5 Recomendaciones que se han hecho para proteger la salud pública</b>	<b>45</b>
<b>3.6 Previendo el envenenamiento por fluoruros</b>	<b>45</b>

## **CAPÍTULO IV BIOMARCADORES**

<b>4.0 Biomarcador</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Marcadores biológicos</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Como elegir el biomarcador más útil</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Interacciones ADN-proteínas</b>	<b>51</b>
<b>4.4 Aductos ADN-proteínas (DPC) como biomarcador</b>	<b>52</b>

## **CAPÍTULO V**

<b>5.0 Planteamiento del problema</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Objetivo general:</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Objetivos específicos</b>	<b>55</b>
<b>5.3 Materiales y reactivos</b>	<b>56</b>
<b>5.4 Estrategia experimental</b>	<b>57</b>
<b>5.5 Desarrollo experimental</b>	<b>56</b>

## **CAPÍTULO VI**

<b>Resultados y discusión</b>	<b>62</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>74</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>75</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Propiedades del arsénico	10
TABLA 2: Propiedades del flúor	13
TABLA 3: Efectos observados en humanos y animales de laboratorio después de una exposición crónica de arsénico.	18
TABLA 4: Concentración de fluoruro y arsénico en el ambiente	19
TABLA 5: Porcentaje de los niveles promedio en la ingestión natural de áreas endémicas.	20
TABLA 6: Tratamientos	58
TABLA 7: Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en hígado de ratón hembra	70
TABLA 8: Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en hígado de ratón macho	71
TABLA 9: Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en riñón de ratón hembra	72
TABLA 10: Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en riñón de ratón macho	73

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1: Inducción de aductos ADN-proteína por efecto de arsénico y flúor en hígado de ratones BALB/c hembras y machos	63
GRÁFICA 2: Inducción de aductos ADN-proteína por efecto de arsénico y flúor en riñón de ratones BALB/c hembras y machos.	63
GRÁFICA 3. DPC en hígado y riñón en ratones hembra	66
GRÁFICA 4. DPC en hígado y riñón en ratones machos	66

<b>GRÁFICA 5. Inducción de DPC en hígado de ratones hembras y machos por efecto del flúor</b>	<b>67</b>
<b>GRÁFICA 6. Inducción de DPC por efecto del arsénico y flúor en forma conjunta en hígado de ratón hembra y macho</b>	<b>68</b>
<b>GRÁFICA 7. Inducción de DPC por efecto del arsénico y flúor en forma conjunta en riñón de ratón hembra y macho</b>	<b>69</b>

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1: Estructura cristalina del arsénico</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA 2: Configuración electrónica del arsénico</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA 3: Mineral que contiene flúor</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 4: Modos de administración del flúor</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 5: Biotransformación del arsénico</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 6: Mecanismos de acción del flúor en la prevención de la caries dental</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 7: Como elegir el biomarcador más útil</b>	<b>50</b>

## ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
DPC	Aductos ADN- proteína
iAs	Arsénico inorgánico
As <sup>3+</sup>	Arsénico trivalente
KCL	Cloruro de potasio
DMA	Dimetil Arsénico
MMA	Monometil Arsénico
SDS	Dodecilsulfonato de sodio
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superoxidasa dismutasa
GSH	Glutación reducido
ICH	Intecambio de cromátidas hermanas
MN	Micronúcleos
UVR	Rayos ultravioleta
PBS	Solución Buffer de fosfatos pH=8
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
Ca <sup>2+</sup>	Ion de calcio
HF	Fluoruro de hidrógeno
F	Flúor
ppm	Partes por millón
SNC	Sistema Nervioso Central

## RESUMEN

El arsénico es un elemento ubicuo que ha sido utilizado en la medicina y en varios campos como la agricultura, ganadería, electrónica y en la industria metalúrgica. Los compuestos del arsénico pueden ser clasificados en tres grupo: Compuestos inorgánicos del As (iAs), compuestos orgánicos de As y gas arsina.

Por otro lado el flúor es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, su uso ha sido aceptado y practicado en prevención de caries dental. El flúor se presenta en forma de fluoruros en el agua de mar en los ríos, manantiales minerales en los tallos de ciertas hierbas, en los huesos y dientes de los animales. La toxicidad del flúor se da generalmente por envenenamiento causado por la ingesta accidental o intencional de este elemento (Whitford, 1990). Se han encontrado evidencias en áreas de contaminación endémicas que muestran diferentes padecimientos relacionados con la exposición aguda y crónica de arsénico y flúor por separado dando como ejemplo regiones de México como la Comarca Lagunera, Chihuahua, San Luis Potosí y Aguascalientes que causan aún más interés en este proyecto de investigación. (Mandal y Suzuki, 2002).

Considerando que existe poca información acerca de la co-toxicidad de agentes potencialmente genotóxicos como el flúor y de carcinógenos comprobados como el arsénico se decide conocer la capacidad conjunta de estos elementos por inducir un tipo de daño al genoma conocido como aductos ADN-proteína (DPC) mismos que se han considerado herramientas útiles en la evaluación del daño temprano por la exposición a estos agentes tóxicos (Ramírez y cols.2000) Considerando los antecedentes propusimos determinar si los elementos en estudio son capaces de inducir la formación de aductos tanto en forma individual como en forma conjunta *in vivo* en hígados y riñones de ratones de la cepa BALB/c después de una exposición crónica de 9 días a diferentes dosis diarias de

arsenito de sodio y fluoruro de sodio. Después de la exposición se extrajeron los órganos (hígado y riñón), se aislaron y se lisaron los núcleos, posteriormente se precipitaron los DPC y se cuantificaron.

Los resultados mostraron un incremento en la formación de estos aductos, observándose un mayor daño en las formas combinadas de As y F y observándose una mayor susceptibilidad a la formación de estos aductos en los órganos de los ratones machos principalmente en riñón. Además de observar que el flúor tienen un mayor efecto inductor a la menor concentración.

## **CAPÍTULO I**

### **GENERALIDADES DEL ARSÉNICO Y FLÚOR**

#### **1.0 PROPIEDADES DEL ARSÉNICO**

El arsénico es un elemento cristalino que comprende del 1% al 0.00005% en la corteza terrestre con una concentración en roca sedimentaria de 2 mg/kg (Gulledge et. al., 1973).

Es un elemento semimetálico extremadamente venenoso.

El número atómico del arsénico es 33 y se encuentra en el grupo 5 (o VA ) del sistema periódico. (<http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Química/Arsénico.htm>). De manera general algunas de sus propiedades son resumidas en la tabla 1. Sin embargo, químicamente el arsénico se encuentra entre los metales y los no metales. Sus propiedades responden a su situación dentro del grupo al que pertenece. Cuando se calienta, se sublima, pasando directamente de sólido a gas a 613° C. Una de las formas más comunes del arsénico es gris, de apariencia metálica y tiene una densidad relativa de 5.7. Existe también una forma amarilla no metálica con una densidad relativa de 2.0.

La masa atómica del arsénico es 74.92.

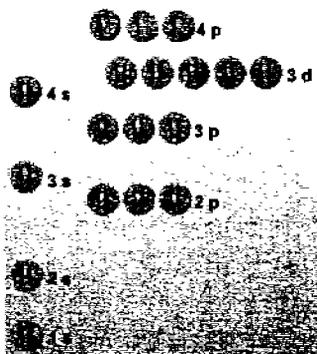
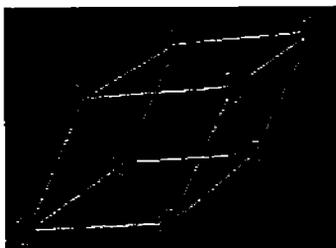
(<http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Química/Arsénico.htm>).

**Tabla 1.** Propiedades del arsénico

([www.acienciasgalilei.com/quielementos/as.htm](http://www.acienciasgalilei.com/quielementos/as.htm))

<b>As ARSÉNICO</b>	<b>33</b>
<b>Peso atómico</b>	<b>74,922 g/mol</b>
<b>Estados oxidación</b>	<b>(+/-)3,5</b>
<b>Punto de fusión</b>	<b>1090 (28 atm) K (*)</b>
<b>Punto de ebullición</b>	<b>876 (subl.) K (*)</b>
<b>Densidad</b>	<b>5,78 g/cm<sup>3</sup></b>
<b>Configuración electrónica</b>	<b>[Ar] 3d<sup>10</sup> 4s<sup>2</sup> p<sup>4</sup></b>
<b>Propiedades ácido/base</b>	<b>Ácido</b>
<b>Estructura cristal</b>	<b>Romboédrico</b>
<b>Electronegatividad</b>	<b>2,18</b>
<b>Calor de vaporización</b>	<b>32,4 kJ/mol</b>
<b>Calor de fusión</b>	<b>27,7 kJ/mol</b>
<b>Conductividad eléctrica</b>	<b>3,8 10<sup>6</sup> Ω<sup>-1</sup>m<sup>-1</sup></b>
<b>Conductividad térmica</b>	<b>50 W m<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup> (a 300 K)</b>
<b>Calor específico</b>	<b>0,33 Jg<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup> (a 300 K)</b>
<b>Primer potencial ionización</b>	<b>9,81</b>
<b>Volumen atómico</b>	<b>13,10 cm<sup>3</sup>/mol</b>
<b>Radio atómico</b>	<b>1,39 Å</b>
<b>Radio covalente</b>	<b>1,20 Å</b>
<b>Sintético</b>	<b>No</b>

**Figura 1.** Estructura cristalina del Arsénico



**Figura 2.** Configuración electrónica del Arsénico.

El arsénico se conoce desde la antigüedad. El elemento puro puede prepararse fácilmente calentando un mineral común llamado arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ). Cuando esta puro se encuentra en la naturaleza ocasionalmente. El arsénico sustituye con frecuencia algún azufre en los sulfuros, que son las menas principales de muchos de los metales pesados. Cuando se calcinan esos minerales, el arsénico se sublima y se obtiene como subproducto en forma de polvo en los tubos de las calderas.

(<http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Química/Arsénico.htm>).

## 1.1 PROPIEDADES DEL FLÚOR

Aunque las propiedades generales son presentadas en la tabla 2 es necesario mencionar que el flúor es un elemento gaseoso químicamente reactivo y venenoso. Se encuentra en el grupo 17 (o VIIA) de la tabla periódica, y es uno de los halógenos. Su número atómico es de 9. (Hescot 3° Congreso Latinoamericano). El elemento fue descubierto en 1771 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele y fue aislado en 1886 por el químico francés Henri Moissan. (<http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Química/Flúor.htm>)

El flúor es un gas amarillo verdoso pálido ligeramente más pesado que el aire, venenoso, corrosivo y que posee un olor penetrante y desagradable. Su masa atómica es de 18.998. Tiene un punto de fusión de  $-219.61\text{ }^{\circ}\text{C}$ , un punto de ebullición de  $188.13\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una densidad relativa de 1.51 en estado líquido y a su punto de ebullición. (<http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Química/Flúor.htm>)



Figura 3. Mineral que contiene Flúor

Tabla 2. Propiedades del Flúor (<http://www.lenntech.com>)

Nombre	Flúor
Valencia	-1
Número atómico	9
Estado de oxidación	-1
Electronegatividad	4,0
Radio covalente (Å)	0,72
Radio iónico (Å)	1,36
Configuración electrónica	$1s^2 2s^2 2p^5$
Masa atómica (g/mol)	18,9984
Densidad (g/ml)	1,11
Punto de ebullición (°C)	-188,2
Punto de fusión (°C)	-219,6
Descubridor	Moissan en 1886

## 1.2 FUENTES NATURALES DEL ARSÉNICO

El arsénico ocupa el lugar 52 en abundancia entre los elementos naturales de la corteza terrestre. (Mandal 2002). Está presente de forma natural en el suelo, las rocas, los animales y las plantas. Puede ser emitido al medio ambiente mediante procesos naturales como actividad volcánica, erosión de rocas e incendios forestales.

Según diversos estudios realizados en Estados Unidos (acuíferos detríticos en Wisconsin) una de las fuentes naturales de arsénico en las aguas subterráneas puede tener relación con ambientes geoquímicos que requieren la presencia de piritita y arsenopiritita entre sus constituyentes minerales y medios reductores. En este tipo de ambiente el arsénico

inorgánico se moviliza en forma de trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ).  
(<http://www.miliarium.com/monografias/arsénico>)

Antes del hombre, la actividad y el efecto de arsénico en la naturaleza sólo era precisamente para mantenerla en balance, el arsénico está distribuido ubicuamente en la corteza terrestre, suelo y sedimento así como en agua y organismos vivos.  
(Mandal.,et.al.,2002).

El arsénico se encuentra naturalmente en 200 diferentes formas minerales las cuales aproximadamente el 60% son arsenatos 20% sulfitos y sulfatos y el otro 20% remanentes incluidos arsenitos, óxidos, silicatos y el elemento arsénico. Uno de los minerales más comunes es el arsenopirita. (Onishi., 1969)

En suelo y sedimentos el arsénico los niveles de arsénico varían de 0.1 a 40 mg/Kg según las regiones geográficas.

Un estudio hidrogeológico también apunta hacia un origen similar la procedencia del arsénico en numerosas localidades castellano-leonesas: una vez que las capas de pirita de los pozos subterráneas se ponen en contacto con el oxígeno y, al impulsar el agua desde el interior del pozo, se solubiliza el arsénico. ).

(<http://www.miliarium.com/monografias/arsénico>).

Las grandes presiones y temperaturas a que quedan sometidas las aguas subterráneas profundas pueden originar un medio reductor con incorporación del arsénico al agua subterránea.

### **1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE ARSÉNICO EN EL SUELO**

Los principales factores que influyen las concentraciones de arsénico en el suelo y en rocas originales y en actividades humanas, son factores importantes como el clima, componentes orgánicos e inorgánicos del suelo y el estado de potencial redox, es decir bajo condiciones de oxidación, en un ambiente aerobio los arsenatos ( $iAsV$ ) son especies estables fuertemente absorbidas por la arcilla, hierro y manganeso en su estado de hidróxido u óxido y materiales orgánicos.

(Tang, 1987).

## **1.4 FUENTES NATURALES DEL FLÚOR**

El flúor existe en la naturaleza combinado en forma de fluorita, criolita y apatito. La fluorita, de la que se derivan la mayoría de los compuestos de flúor, está muy extendida en México en el centro de Estados Unidos, Francia e Inglaterra. El flúor también se presenta en forma de fluoruros en el agua del mar, en los ríos y en los manantiales minerales, en los tallos de ciertas hierbas y en los huesos y dientes de los animales. Ocupa el lugar 17 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. En la superficie, el agua dulce, las concentraciones del fluoruro son normalmente bajas de 0.01 ppm. En el agua subterránea, la concentración natural de fluoruro depende de aspectos geológico, químico y características físicas del acuífero, la porosidad y acidez de la tierra y piedras, la temperatura, la acción de otros elementos químicos y la profundidad de los pozos de extracción. Las concentraciones del fluoruro en el agua subterránea pueden ir de 1 ppm a más de 35 ppm debido al número elevado de variables. En Kenya y África del sur, los niveles pueden exceder 25 ppm. En India han sido reportadas concentraciones de 38.5 ppm. ([http://www.sdpt.net/fluoruro\\_en\\_el\\_agua.htm](http://www.sdpt.net/fluoruro_en_el_agua.htm).)

## **1.5 FUENTES ANTROPOGÉNICAS DEL ARSÉNICO**

El arsénico puede ser también generado por la actividad humana. Aproximadamente el 90% del arsénico industrial en EEUU se emplea como conservante de la madera, aunque también, se usa en pinturas tintes, metales, droguería, jabones y semiconductores. La quema de combustibles fósiles, la producción de papel, la industria sementera y la minería emiten a su vez arsénico a la atmósfera. (Mandal et.al.2002).

La presencia de arsénico en las aguas subterráneas también se puede explicar como resultado de la utilización, a veces excesiva y sin control, de productos relacionados con actividades agrícolas, la jardinería y limpieza de malezas, como son los fungicidas, insecticidas y plaguicidas en general. Muchos de ellos tienen arsénico como compuestos tóxicos, por que su utilización está indicada para erradicar plagas diversas (<http://www.monografias.com> )

## 1.6 FUENTES ANTROPOGÉNICAS DEL FLÚOR

Los procesos de combustión en las industrias pueden liberar fluoruro de hidrógeno al aire. Los fluoruros que se encuentran en el aire acabarán depositándose en el suelo o en el agua. (Wright, 2003)

## 1.7 USOS Y APLICACIONES DEL ARSÉNICO

El As se usa en grandes cantidades en la fabricación de vidrio para eliminar el color verde causado por las impurezas del hierro. Se usa como aditivo para endurecer el plomo. También se usa en la fabricación de gases venenosos militares. EL As es ampliamente utilizado en la agricultura y silvicultura como pesticida y herbicida. También es utilizado en la fabricación de semiconductores, en la producción de acumuladores de plomo y como preservativo para la madera dándole resistencia a la descomposición. (EHC, 1981; Wyatt et al., 1998; ATSDR, 1999). Hasta la introducción de la penicilina el As era muy importante en el tratamiento de la sífilis. Los arsenatos de plomo y calcio se usan frecuentemente como insecticidas. Algunos compuestos como arseniuro de galio (GaAs) se utilizan como semiconductores como láser. El disulfuro de arsénico ( $As_2S_2$ ) conocido también como oropimente rojo y rubí arsénico se usan como pigmento en la fabricación de juegos artificiales y pinturas ( <http://www.prodigyweb.net.mx> )

## 1.8 USOS Y APLICACIONES DEL FLÚOR

Los compuestos del flúor tienen muchas aplicaciones. Los clorofluorocarbonos, ciertos líquidos o gases inodoros y no venenosos, como el freón se usaban como agente dispersante en los vaporizadores aerosol y como refrigerante. Otro producto químico el teflón un plástico del flúor muy resistente a la acción química se usa ampliamente para componentes en la industria automovilística y también como recubrimiento antiadherente de la superficie interior de las sartenes y otros utensilios de cocina.

## **1.9 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DEL ARSÉNICO**

El arsénico es ampliamente usado en la industria agricultura y silvicultura como pesticida y herbicida. También es utilizado en la fabricación de semiconductores, en la producción de acumuladores de plomo y como preservativo para la madera para darle resistencia a la descomposición, puede encontrarse en los vapores de las fundidoras de cobre, plomo, zinc y otros metales. Además, se utilizan cantidades pequeñas en la industria del vidrio y la cerámica y como aditivo de alimentos. (EHC, 1981;Wyatt y cols.,1998;ATSDR,1999).

## **1.10 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DEL FLÚOR**

El flúor no puede ser destruido en el ambiente; solamente puede cambiar de forma. El flúor forma sales con minerales en el suelo. Además que si está en estado gaseoso como fluoruro de hidrógeno será absorbido por la lluvia, las nubes y la niebla y formará ácido fluorhídrico, el cual caerá a la tierra. Si los fluoruros son liberados en el aire por los volcanes y la industria es transportada por el viento y la lluvia a aguas, suelo y fuentes de alimentos cercanas y como en el agua y en el suelo los fluoruros se adherirán fuertemente al sedimento o a partículas en el suelo se acumulan en plantas y en animales. (ATSDR 2003).

## **1.11 FUENTES DE EXPOSICIÓN POR ARSÉNICO**

El arsénico se encuentra naturalmente en el ambiente. Y se puede estar expuesto al As mediante los alimentos, el agua de bebida así como el aire que respiramos. Los niños pueden también exponerse al As por estar en contacto con la tierra. Se puede estar expuesto al estar en contacto la tierra con la piel o con agua que contiene arsénico. Los niveles de concentración de As a los que es esta expuesto y que producen estos efectos aún son inciertos pero es probable que estén por encima de 100 microgramos de As por metro cúbico ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) a una exposición corta. En exposiciones más larga y en concentraciones

más bajas nos puede llevar a tener efectos en la piel, así como nerviosos y de sistema circulatorio. También hay algunos datos que sugieren que la inhalación de iAs puede interferir con un desarrollo normal fetal, aunque esto aún es incierto. (ATSDR 2004). Se han reportado experimentos en animales de laboratorio que han sido expuestos crónicamente al arsénico y que presentan lesiones en la piel así como otros efectos que se muestran en la tabla 3 posteriores a la exposición.

**Tabla 3.** Efectos observados en humanos y animales de laboratorio después de una exposición crónica de arsénico.

SISTEMA	EFEECTO
Piel	Lesiones de la piel
Cardiovascular	Enfermedades de "Pie Negro"
Nervioso	Neuropatía periférica y encefalopatía
Hepático	Hepatomegalia, cirrosis, alteraciones en el metabolismo
Hematológico	Depresión de médula ósea y hueso
Endocrino	Diabetes
Renal	Degeneración del tubo proximal, necrosis cortical y papilar.

(Hughes, 2002)

## 1.12 FUENTES DE EXPOSICIÓN POR FLÚOR

Se puede considerar a una población expuesta a los fluoruros mediante los alimentos agua potable y suelo contaminado. (ATSDR2004)

Como fuente de exposición del flúor se encuentra el agua de bebida que tiene pequeñas cantidades de NaF para la prevención. Se cree que esta es la principal fuente de exposición aunque la podemos encontrar en otros alimentos como pescados mariscos que contienen altos concentraciones de fluoruros sobre todos si estos alimentos están enlatados. Además del consumo de alimentos preparados con agua fluorada. (WHO 1984; Smith1985) El continuo uso de agentes dentríficos tales como pastas dentales y enjuagues bucales podría considerarse como fuentes de exposición así como la aplicación de flúor con el fin de reducir la caries dental Como se muestra en la siguientes tablas 3 y 4 los niveles de exposición en áreas endémicas son elevados

( <http://www.gineconet.com>).

**Tabla 4.** Concentración de fluoruro y arsénico en el ambiente.

Sitio de muestreo	Atmosfera ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		Agua de bebida (mg/l)	
	Fluoruro	Arsénico	Fluoruro	Arsénico
Fluoruro elevado	0.81	0.60	2.30	0.015
Arsénico elevado	0.81	0.60	0.47	0.15
Fluoruro y arsénico elevado	0.15	0.08	4.05	0.58
Estandar	7.00	3.00	1.00	0.05

**Tabla 5. Porcentaje de los niveles promedio para la ingestión natural en áreas endémicas. (Zheng et al, 2002)**

Sitio de muestreo	% FLUORURO			% ARSÉNICO		
	Alimentos	Agua	Aire	Alimentos	Agua	Aire
Fluoruro elevado	21.26	75.58	0.16	-	-	-
Arsénico elevado	-	-	-	20.48	79.01	2.67
Fluoruro y arsénico elevado	10.98	89.00	0.021	7.44	92.47	0.08

### 1.13 INCIDENCIA EN MÉXICO POR LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO Y FLÚOR

La exposición crónica al arsénico vía agua de bebida es reportada en 6 áreas de la región lagunera situada en la parte central del norte de México con una población de 200000 personas de 1963-1983. (M.E. Cebrian 1983) rango total de la concentración de arsénico va de 0.08-0.624 mg l<sup>-1</sup> y concentraciones mayores de 0.05 mg l<sup>-1</sup> son encontrados en 50% de ellos. La mayoría del As se encuentra en forma inorgánica y en la especie del As pentavalente donde se encuentra predominantemente el 93% de las muestras (Del Razo1990) sin embargo, los porcentajes son variables. También se observó que altas

concentraciones de fluoruro que van de 0.5-3.7mg mg l<sup>-1</sup> y concentraciones mayores que 1.5 mg l<sup>-1</sup> se encontraron en un 20% de las muestras analizadas (Del Razo1993).

En el gobierno del estado de San Luis Potosí se llevó a cabo una convocatoria en el 2002 de una demanda específica a la remoción del arsénico y flúor en ese estado ya que se basaron en los antecedentes de que varias regiones de estados como Chihuahua, Coahuila, Durango Hidalgo y San Luis Potosí se han detectado concentraciones de arsénico en los cuerpos de agua subterránea por encima de la concentración máxima permisible de 0.050 mg / L (50 ppb), desafortunadamente diversas comunidades, poblados y ciudades de abastecen de agua potable de estos cuerpos de agua y esto ocasiona serios problemas de salud por exposición al arsénico.

También se tiene documentado el caso toxicológico y la concentración de los fluoruros en agua.

En estas demandas se pretende desarrollar métodos eficientes para remover arsénico y fluoruro de agua de consumo humano.

## 1.14 MODOS DE ADMINISTRACIÓN DEL FLÚOR

La siguiente figura nos muestra de forma resumida que la administración de flúor pueden realizarse de dos formas sistémica o tópica. La administración sistémica puede a su vez hacerse de modo colectivo (fluoración del agua potable) o individual. La aplicación tópica también puede a su vez realizarse mediante preparados concentrados (geles, barnices), colutorios y pastas dentífricas.

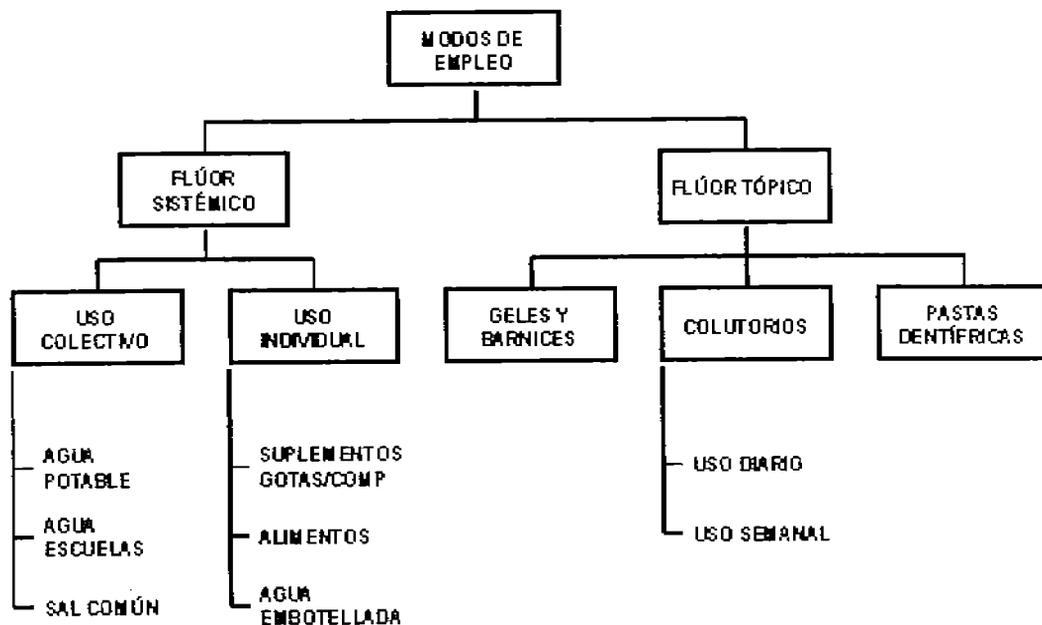


Figura 4. Modos de administración del flúor.

## CAPÍTULO II

### 2.0 METABOLISMO DEL ARSÉNICO

El As, como arsenato o arsenito, es bien absorbido por vía oral o inhalación para después ser transportado por la sangre a diferentes órganos del cuerpo principalmente el hígado, los pulmones, los riñones y la tiroides (ATSR, 1999; EHC, 1981)

Las partículas de arsénico que entran en el tracto respiratorio son absorbidas por el pulmón, aunque se desconocen la tasa de absorción en humanos. La mayoría de los derivados del arsénico son rápidamente excretados con la orina pero el arsénico absorbido se reparte por el pelo y las uñas (<http://www.sos-arsenic.net/espanol/as-estandar.html>)

Los humanos están expuestos en muchas y diferentes formas del arsénico orgánico e inorgánico que se encuentran en agua alimentos así como el medio ambiente. Y cada una de las formas de los arsenicales tiene diferentes propiedades fisicoquímicas y de biodisponibilidad por consiguiente el estudio de cinética y metabolismo en animales y humanos es muy complejo. La entrada de estos arsenicales in vivo es considerada como respiratoria a través de gases y/o polvos ya sea del medio ambiente o contenidos en los alimentos, el agua y suelo. Algunos datos indican que la absorción del arsénico generalmente está por debajo del 10% sin embargo hay ciertas formas del arsénico mayormente absorbidas.

La biodisponibilidad de la ingesta de iAs puede variar dependiendo de la mezcla de la sustancia en la que se encuentre en el alimento o bebida además de la solubilidad de los compuestos arsenicales, Y de la presencia de otros constituyentes en los alimentos en el tracto gastrointestinal. La distribución del arsénico en el tejido va a depender de la perfusión sobre la sangre, tejido, volumen, coeficiente de difusión, característica de la membrana y afinidad al tejido. El destino de la ingesta de arsénico in vivo va a depender sobre: 1) reacciones de oxidación y reducción entre el  $iAs^V$  y  $iA^{III}$  en el plasma y

2) la consecuente reacción de metilación en el hígado. El arsénico inorgánico es metilado en el humano. El arsenato es rápidamente reducido a arsenito el cual después es metilado. La mayoría de los sitios de metilación aparecen en el hígado donde el arsénico y la metil transferasa intervienen en el proceso de metilación con s-adenosil metionina como donador del grupo metilo y donde el GSH glutation funge como co-factor. (Mandal 2002). Estudios en humanos sugieren que la metilación puede comenzar con una dosis mínima de cerca de 0.2-1 mg/kg (0.003-0.015 mg/kg de As por día (Navgi y cols., 1994). Se ha comparado los tejidos de infantes que van de 5 meses a un año de edad y se ha encontrado que el As se encuentra acumulado en tejidos y esto se relaciona con los datos observados en animales de laboratorio. ( Raie., 1996).

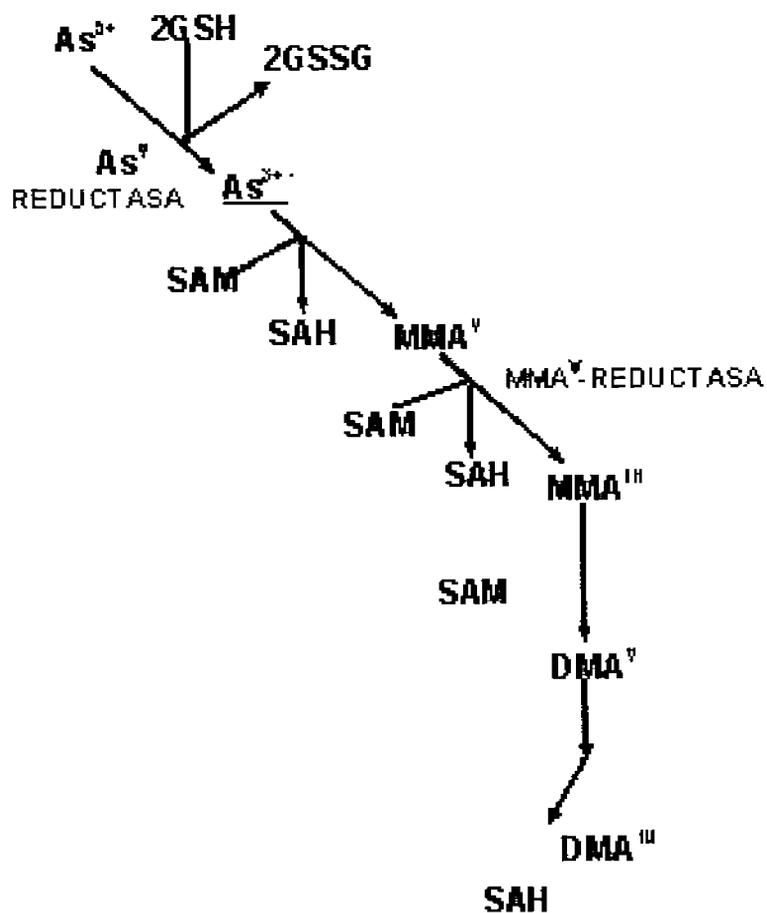


Figura 5 . Biotransformación del arsénico (Figura modificada de : Groering y cols., 1999)

La detoxificación bioquímica del arsénico se da en todos los organismos vivos entre los más estudiados son:

- 1) Conversión del arsénico pentavalente a arsenato por medio de transportadores de fosfato.
  - 2) Reducción del arsénico pentavalente a arsénico trivalente por arsenato reductasa.
  - 3) Mecanismo de secuestro del arsénico trivalente.
- (Rosen y cols., 2002).

## 2.1 METABOLISMO DEL FLÚOR

El ión fluoruro aportado por la alimentación se absorbe a nivel gastrointestinal en forma pasiva. Los iones fluoruro aportados por el agua de bebida son los más fáciles de asimilar (86 a 97 %) mientras que la ingesta de importantes cantidades de calcio, sobre todo en forma de productos lácteos puede disminuir la absorción normal de fluoruros en un 50% aproximadamente. Los fluoruros absorbidos se concentran en el plasma en una proporción equivalente al aporte. Se desencadena entonces un proceso de regulación tendiente a reestablecer los valores normales de concentración, comprendidos entre 0.05 y 0.5 ppm.

Si el aporte fluorado es bajo y constante, la excreción urinaria es equivalente al aporte. En caso de aportes importantes, solo la mitad de los fluoruros se elimina a través de los riñones y el 30 % se deposita en el esqueleto en forma de fluorapatita. Esta formación es más o menos reversible en función de la velocidad de renovación del hueso, su grado de vascularización y el aprovisionamiento en flúor. El flúor se filtra entonces a nivel de los glomerúlos y es eliminado por orina. El 15% podrá acumularse en las estructuras amelares y dentinarias durante su período pre-eruptivo. La dentina secundaria, cercana a la pulpa, se ira enriqueciendo con el flúor a lo largo de toda su existencia (Hescot, 2003)

## EFFECTOS TÓXICOS DEL ARSÉNICO Y FLÚOR

### 2.2 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO PENTAVALENTE

El arsenato puede reemplazar al fosfato en muchas reacciones bioquímicas porque tienen estructura y propiedades similares (Dixon 1997). Por ejemplo el arsenato reacciona *in vitro* con glucosa y gluconato (Lagunas 1980; Gresser 1981), a la forma glucosa-6-arsenogluconato, respectivamente. La glucosa-6-gluconato es un sustrato para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y puede inhibir la hexoquinasa, como lo hace la glucosa-6-fosfato (Lagunas, 1980). El arsenato puede también reemplazar el fosfato en la bomba de sodio e intercambiar el anión y transportarlo al sistema de las células de la sangre (Keney and Kaplan, 1988).

El arsenato desacopla *in vitro* la formación de 5-trifosfato (ATP). Por un mecanismo llamado arsenolisis; la arsenolisis puede ocurrir en el sustrato durante la glicólisis. En el paso de la vía glicolítica en la que el fosfato es enlazado enzimáticamente a D-gliceraldehído-3-fosfato para formar 1,3-biofosfo-D-glicerato. El arsenato puede reemplazar al fosfato en esta reacción para formar el anhídrido 1-arsebati-3-fosfoDglicerato. sin embargo, este anhídrido es inestable y es hidrolizado a arsenato y a 3-fosfato-D-glicerato. La baja estabilidad del arsénico anhídrido puede ser debido a la longitud del As-O que es 10% más largo que el P-O. (Dixon, 1997). A nivel mitocondrial la arsenolisis puede ocurrir por vía fosforilación oxidativa. Adenosin 5' difosfato-arsenato es sintetizado por partículas submitocondriales de adenosin 5'difosfato (ADP) y arsenato en presencia de succinato. (Gresser, 1981).|

## 2.3 MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO TRIVALENTE

Dentro de los grupos funcionales de las enzimas específicas o coenzimas se encuentran los tioles o sulfhidrilo, los cuales tienen un rol muy importante en la actividad de esas moléculas. Los arsenicales trivalentes reaccionan fácilmente *in vitro* con moléculas que contienen el grupo tiol como por ejemplo el GSH y la cisteína uniendo la MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup> a proteínas (Scout et al, 1993; Delnomdedieu, et. al 1994b). El arsenito tiene una alta afinidad por los ditiolos más que con los monotioles, debido a que se favorece, en alto grado, la transferencia del arsenito en el GSH. (Delnomdedieu et al, 1993).

La unión del arsénico trivalente al grupo tiol es crítica ya que puede inhibir eventos bioquímicos importantes que pueden inducir una toxicidad. Sin embargo, la unión del arsenito a la proteínas no es esencial, también puede llevarse a cabo un mecanismo de detoxificación. (Aposhian, 1989).

La piruvato deshidrogenasa es una enzima que requiere un cofactor que contiene un grupo ditiol para llevar a cabo su actividad enzimática. El arsenito inhibe la PDH (Peaters, 1955; Szinies y Forth 1988; Huet al. 1998).

Petrick y colaboradores en el 2001, han demostrado que MMA<sup>III</sup> es un inhibidor más potente de la DPH que el arsenito. La DPH oxida el piruvato a CoA un precursor de intermediarios en el ciclo del ácido cítrico. En el ciclo del ácido cítrico se degradan los intermediarios lo que ocasiona una reducción en el transporte de electrones en la producción de ATP. La inhibición del PDH puede finalmente inducir a un decremento en la producción de ATP. También los intermediarios del ciclo del ácido cítrico pueden ser usados en la gluconeogénesis. Los arsenicales metilado trivalentes como son potentes inhibidores del GSH reducido (Styblo et al. 1997) y la tioredoxina reductasa. (Lin et al, 1999).

El mecanismo de toxicidad del arsénico es la inhibición de enzimas que contienen el grupo sulfhidrilo y remplazando moléculas de fosfato con alta energía (arsenolisis).

El arsénico trivalente es más potente inhibiendo enzimas, mientras que el arsénico pentavalente esta más envuelto en un proceso de arsenolisis (ATSDR, 1990).

## 2.4 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL FLÚOR

La toxicidad del flúor se da inicialmente como efecto local sobre la mucosa intestinal, una vez absorbido uno de los iones de calcio provocando hipocalcemia además de tener efectos citotóxicos ya que interfieren con varias enzimas al interrumpir eventos tan importantes como la fosforilación oxidativa, glicólisis, coagulación y neurotransmisión por uniones con el ion calcio (Geofrey Nochinson Dpto. of Emergency Medicine Hospital).

En los humanos y ratas, el flúor disminuye la actividad de la enzima superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Además este elemento se acumula en el cerebro. (Rzeuski y cols., 1988; Guan y cols., 1988.)

La administración oral del flúor en ratas de 3-7 meses, y en una concentración baja, provoca una acumulación en el cerebro y ocasiona las siguientes alteraciones, que se cree pueden estar envueltas en la patogénesis de daño cerebral: 1) Desmielinización focal, decremento en las células de Purkinje, espesamiento y desaparición de dentritas, hinchamiento de sustancia de Nissl, y pycnosis de neuronas individuales. 2) Decremento inicial en la ubiquinona 9 y 10 y su posterior incremento tardío. 3) Peroxidación de los lípidos de la membrana. 4) Modificación de los fosfolípidos cerebrales (decremento 10 a 20 %) y los lípidos neutros. 5) Disminución del 15% del contenido de proteínas (Guan y cols., 1988)

## 2.5 GENOTOXICIDAD DEL ARSÉNICO

Un estudio que ha comparado los efectos de arsenicales metilados e inorgánicos en un sistema L5175Y/TK+/- en un sistema de linfomas de ratón establece un rango de potencia de la siguiente manera:

arsenito > arsenato > ac. metilarsenoso (methylarsenic acid) > ac. metilarsénico (Moore et al., 1997).

En este sistema se detectó un amplio rango de efectos genotóxicos, ya que el arsenito y el arsenato son efectivos en un rango de concentración de  $\mu\text{g}$  por ml, mientras que el ac. metilarsenoso y el ac. metilarsénico lo son en un rango de concentración de mg por ml.

Otros estudios se enfocan en el efecto genotóxico del ac. Dimetilarsénico y se ha encontrado que este compuesto se retiene y acumula en el pulmón (Vahter et al., 1984; Hughes et al., 2000). También se ha observado que la exposición de la células L132 a ac. dimetilarsénico 10mM incrementa la frecuencia de rompimientos en el DNA reduciendo el porcentaje de replicación y acortando la longitud de la cadena de DNA (Tezuka et al., 1993) Sugiriendo que ambos la replicación y la reparación del DNA son afectados por el arsenical.

Una gran cantidad de DNA se somete a un rompimiento de las cadenas en células L132 tratada con ac. dimetilarsénico y *paraquat* sobre un generador de O<sub>2</sub> que en células tratadas con arsenicales sugiere una interacción entre esos dos agente en la producción y presencia de daño a el DNA ( Kawaguchi et al. 1996). Se ha postulado que los DMAs forman aductos estables con el DNA y que esos aductos incrementa la susceptibilidad a la inducción por O<sub>2</sub> de rompimiento en las cadenas ssDNA (Rin et al., 1996).

Aberraciones cromosómicas, aductos ADN proteínas (crosslinks) e intercambio de cromatidas hermanas se han observado en células de embriones de Hamster, (Rossman et al, 1980; Lee et al 1985b; Kochhar et al et al, 1996) y en linfocitos y fibroblastos humanos (Okui y Fujiwara 1986; Jha et al, 1992), después de una exposición a arsénico inorgánico. Las aberraciones cromosómicas son características por cromátidas abiertas por rompimiento o fragmentación, endoduplicación y rompimientos cromosómicos. Esos efectos son dosis-dependientes y el arsenito es más potente que el arsenato.

Los arsenicales orgánicos pentavalentes son genotóxicos en células de pulmón (V79) de hamster chinos ( Endo et al, 1992; Eguchi et al, 1997) y en células de pulmón humanas (Tezuka et al 1993; Yamonaka et al, 1998), pero se requiere una mayor cantidad de dosis que los arsenicales inorgánicos. Los efectos incluyen exceso de tetraploidia con (DMA<sup>V</sup> y TMAO<sup>V</sup>) arresto mitótico MMA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup> y TMAO<sup>V</sup>) perdida de escisiones sencillas del DNA (DMA<sup>V</sup> y Crosslinks DNA- proteínas (DMA<sup>V</sup>).

## 2.6 EFECTOS GENOTÓXICOS DEL FLÚOR

En numerosos estudios se ha investigado el efecto genotóxico de fluoruros en sistemas variados incluyendo bacterias, plantas, mosquitos de frutas, animales y también en células humanas. Desafortunadamente la información es superficial además de limitada y el resultado ha sido muy discutido. Pero en general hay 3 diferentes puntos importantes 1) El fluoruro no tiene un efecto genotóxico; 2) El fluoruro es un agente mutagénico y causa daño tanto en cromosomas como en el DNA; 3) El fluoruro tiene efectos sinérgico o antagonistas con ciertos agentes mutagénicos. Al mismo tiempo un grupo de japoneses también han reportado resultados de varios estudios del potencial genotóxico del fluoruro. (Imai et al., 1983), observó que el fluoruro en concentraciones de 18 y 36 ppm inhibió el crecimiento de células humanas, HeLa y colon I-5C-4, inhibiendo la síntesis de proteínas. Esos autores concluyen que el la síntesis de DNA fue un daño primario del NaF pero que el fluoruro interfiere con la producción del DNA al inhibiendo la síntesis de proteínas que se requiere para la producción del DNA. (Tsutsui et al., 1984<sup>a</sup>) encontró un incremento significativo en los niveles de síntesis de DNA no programada. (UDS) fueron inducidos en cultivos de queratinocitos en dosis que van de 100-300 ppm de NaF (45-135 ppm de F). En células de embriones de hámster la exposición a NaF en concentraciones de 75 a 125 ppm (34 a 56 ppm de F) dio por resultado un incremento en aberraciones cromosómicas, (SCE y UDS (Tsutsui et al., 1984b).

Algunos estudios han demostrado que en trabajadores que laboran en la producción de fertilizantes y que se encuentran expuestos aun ambiente contaminado con HF y SiF<sub>4</sub>, esta exposición está directamente asociada con un incremento en AC (aberraciones cromosómicas) y en MN (micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica, este estudio fue realizado en una población China. (Yiamouyianmis, 1977)

## 2.7 CITOTOXICIDAD DEL FLÚOR

Varios grupos de investigadores han reportado efectos citotóxicos por la ingestión de compuestos fluorados y aunque la sensibilidad a ese efecto puede variar dependiendo sobre el tipo de célula y el pH del medio en que se encuentre. (Helgeland and Leirker, 1976;

Holland 1980). El fluoruro de sodio NaF ha sido reportado como inhibidor del crecimiento de células diploides en cultivos de células humanas (Oguro, et al., 1990). También se ha reportado que co tratamiento del fluoruro de sodio induce aberraciones cromosómicas y síntesis de DNA no programado en fibroblastos diploides (JHU-I cells) (Tsutsui; et al., 1984). Además ha sido demostrado que el NaF es mutagénico en células L578 y en células linformas de ratones ( Caspary et al. 1987) y que el NaF puede transformar las células de Hámster (Jones et al. 1988) Además de ser citotóxico y clastogénico en fibroblastos del prepucio.( Hayaashi and Tsutsui, 1993)Esos efectos ocurrieron en células de manera ciclo-dependientes mientras que una pequeña citotoxicidad fue observada en células en fase G1, mientras que un incremento significativo fue observado en aberraciones cromosómicas fueron observados en células en el inicio y la mitad de la fase S (Hayaashi and Tsutsui, 1993; Jeng et al. 1988). La inhibición de síntesis de proteína por efecto del NaF es tóxico para los fibroblastos de la mucosa oral *in vitro*. Además de que esta citotoxicidad ha sido asociada con un decremento general en DNA y RNA y biosíntesis de proteínas (Slameova et al. 1992). Por lo que se sugiere que esta toxicidad del flúor puede estar asociada con apoptosis en hígado alveolar, macrófagos y células de osteosarcoma ( Hirano y Ando, 1997).

## NEUROTOXICIDAD DEL FLÚOR

La relación entre el efecto del fluoruro sobre el sistema nerviosos central (SNC) no ha mostrado resultados claros sobre enfermedades tales como apoplejía, letargo, salivación, temblores, parálisis y deficiencias sensoriales. Y aunque aún es un campo todavía no muy explorado, existe la posibilidad de que la exposición a fluoruro tenga una relación ligera con las disfunciones del cerebro (Mullenix., et al., 1996).

En los diseños de experimentos de animales se han reportado ligeros pero muy reales cambios en el comportamiento de los modelos seguidos después de la ingestión del fluoruro después de la exposición prenatal, se presenta una hiperactividad y en una exposición en adultos se presento un déficit cognitivo. La acumulación de fluoruro en regiones importantes del cerebro de ratas aumento, especialmente en el hipocampo, al

incrementar la cantidad de consumo en el agua de bebida. Efectos similares fueron reportados en otros estudios.

La experiencia con otros desarrollos neurotóxicos tiene que ver con los cambios en el comportamiento de este indica que tienen un fuerte potencial como motor de disfunción en el déficit de IQ en humanos y problemas de aprendizaje.(Mullenix et al.,1996).

Jacqueline Calderón y colaboradores en el 2000 investigaron un importante problema de salud en México específicamente en la ciudad de San Luis Potosí. En el que por encima del 90% de los niños tienen un grado de fluorosis dental, en este estudio el objetivo fue evaluar la exposición crónica al fluoruro sobre el desarrollo neuropsicológico en niños de 1-6 años de edad y de 6-8. La concentración del fluoruro en el agua donde se realizó este estudio tiene un rango de 1.2 a 3.0 mg/l. La exposición al fluoruro fue medido en muestras de orina por el método selectivo de ión electrotérmico. También fueron medidas la cantidad de plomo en la sangre (PbS) por un método de espectrofotometría de absorción atómica. El índice de talla por edad fue medida de acuerdo a una historia del estado nutricional. Tres pruebas fueron usadas para evaluar el desarrollo neuropsicológico; 1) Escala de inteligencia para niños en una versión para México 2) complejión del cuerpo y 3) Desempeño continuo. Como resultados se observó que los datos del IQ no se vieron influenciados por la exposición al fluoruro, aunque se observó un incremento en el tiempo de reacción lo que puede afectar el proceso de atención, también se observó que la organización viso-espacial era baja lo que puede estar afectando las habilidades para leer y escribir en los niños.

Mientras que Li XS y colaboradores en 1995 hicieron un estudio donde midieron la inteligencia de 907 niños de entre 8-13 años, que viven en áreas con fluorosis severa y donde no hay fluorosis, encontrando que la inteligencia parece ser afectada en las áreas donde hay fluorosis media y severa asociándola con la alta ingesta de fluoruro no encontrándose una relación entre la edad y la inteligencia. El efecto de la exposición a altos niveles de fluoruro sobre la inteligencia ocurre en un estado temprano en el desarrollo del embrión e infante cuando la diferenciación que conforman las células del cerebro ocurre de manera muy rápida. Según Guan y colaboradores en 1998 estudiaron la influencia de la fluorosis crónica sobre la membrana lipídica en el cerebro de ratas encontrando una

disminución en las proteínas que contiene el cerebro, mientras que el DNA que permaneció estable durante el periodo completo de la investigación. Después de 7 meses de tratamiento con fluoruro el total de fosfolípidos en el cerebro disminuyó de 10 a 20% en los grupos tratados con una concentración de fluoruro de 30 y 100 ppm respectivamente. La principal especie de fosfolípidos influenciados por la fluorosis fueron los fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y la fosfatidilserina. Los ácidos grasos y aldehídos que son compuestos que integran a los fosfolípidos fueron incrementados. No se detectaron modificaciones en las cantidades de colesterol. Después de 3 meses de tratamiento con fluoruro, la ubiquinona contenida en el cerebro fue baja, sin embargo, a los 7 meses de tratamiento fue evidente un incremento en los dos grupos tratados. Los resultados demostraron que el contenido de fosfolípidos y ubiquinona en el cerebro son modificados al ser afectados por una fluorosis crónica y esos cambios de la membrana lipídica pueden estar involucrados en enfermedades y patogénesis.

## **2.8 FLÚOR Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Algunos estudios indican que la fuerte afinidad del fluoruro por el aluminio y la capacidad del flúor para atravesar la barrera hematoencefálica ; permite el fácil acceso del aluminio al tejido cerebral también es bien sabido que el aluminio es un neurotóxico y que se encuentra en altas concentraciones en el cerebro de personas que padecen Alzheimer, así como en víctimas de otras enfermedades neurológicas y pacientes con SIDA.(Escárcega, 2003).

En enero de 1987 el departamento de endocrinología en Newcastle, Inglaterra, y el departamento de física de la Universidad de Ruhana , Sri Lanka demostraron que cuando el agua fluorada en 1 ppm es utilizada al cocinar con utensilios de aluminio la concentración de aluminio se eleva por arriba de 600 ppm, mientras que esto no sucede con el agua sin fluoruro. Experimentos bajo las mismas condiciones usando el agua fluorada de Wisconsin, E.U.A. Reportan una concentración de 833 veces y un aumento en el contenido de fluoruro del 100%.([www.gine.com/flúoride](http://www.gine.com/flúoride)).

Actualmente, el mal de Alzheimer afecta a entre un diez y un quince por ciento de la población europea y estadounidense mayor de 65 años de edad, y a casi un veinte por ciento de los mayores de 80 años en esos países desarrollados. En general, causa la muerte entre los cinco y los quince años después de su inicio.

En México es un padecimiento que va en aumento. Se calcula que en nuestro país hay entre 220 y 250 mil casos de probable enfermedad de Alzheimer aunque no todos están diagnosticados.

**Los daños cerebrales** "La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento degenerativo, que implica la pérdida masiva de neuronas colinérgicas y disminuye la actividad y los niveles de acetilcolina en la corteza cerebral y en el hipocampo, dos importantes áreas involucradas en los procesos de aprendizaje, memoria, atención y otros procesos cognitivos". Esta enfermedad tiene varios factores de riesgo. Uno es la edad: tiene una prevalencia de 1.4 por ciento en pacientes de 60 a 70 años de edad, cifra que aumenta a 6 por ciento en enfermos de 70 a 80 años, y se incrementa hasta 15 por ciento en personas de 80 a 90 años. Otro factor importante es el hereditario: los familiares en línea directa de un enfermo tienen cuatro veces más riesgo de padecer el mal que cualquier otra persona. Se han encontrado cuatro genes asociados con el Alzheimer: los genes 1, 14, 19 y 21.

Las estadísticas muestran que las mujeres padecen más frecuentemente el padecimiento, en el que además de factores genéticos y hereditarios influyen algunas deficiencias nutricionales, la presencia de **aluminio** en el organismo y un bajo nivel de educación. ([www.invdes.com.mx/antiores/Septiembre1999/htrn/alzheim.html](http://www.invdes.com.mx/antiores/Septiembre1999/htrn/alzheim.html)).

## **2.9 MECANISMOS DE ACCION RELACIONADOS CON LA CARCINOGENICIDAD POR EFECTO DEL ARSÉNICO**

Se han propuesto varios mecanismos de acción y algunos de estos incluyen genotoxicidad, proliferación de células, alteraciones en la reparación del DNA, alteración del DNA metilado, promoción de tumores y co-carcinogénesis. Ha sido muy difícil definir un mecanismo de acción para la carcinogenicidad del As debido a los resultados contrastantes

de los diferentes autores. A continuación se describen algunos de los mecanismos asociados con fenómenos de transformación celular y cáncer asociados a exposición de arsénico.

## **CO-COMUTAGENESIS DEL ARSÉNICO INORGÁNICO**

El arsénico inorgánico (iAs)  $As_2O_3$  arsenito y arsenato es co-mutagenico con otros químicos y luz UV ultravioleta en forma leve en células mamíferas. Un incremento sinergista se da con UV aberraciones cromosómicas y mutación de cromátidas fueron observadas en células de ovario en Hamster chinos en las que se les expuso a iAs (Lee et al, 1985\*; Li and Rossman 1991). Se ha observado en células animales que el As es co-mutagénico con químicos y con radiación electromagnética en células humanas y daños en el DNA son inducidos por agentes como el dipoxibutano en linfocitos (Wiencke y Yager 1991). Y con rayos x o UV en fibroblastos son potenciados, después de una exposición a arsenito de sodio. Estos no tienen un efecto sinergista del arsénico sobre el intercambio de cromátidas hermanas porque el efecto fue inducido por el dipoxibutano o la luz UV.

## **AMPLIFICACIÓN DE GENES**

Las células de crecimiento 3T6 de ratón en un medio que contiene arsénico inorgánico se vuelven resistentes a la toxicidad del metotrexato (Lee et al, 1988). El número de células resistentes es dependiente de la dosis de arsénico y arsenito también se observó que el arsenito es más potente que el arsenato. El arsénico incrementa la amplificación de genes que codifican para la enzima dihidrofolato reductasa. Lee y colaboradores en 1988 sugirió que la amplificación de genes inducida por el arsénico puede tener un rol muy importante en el efecto carcinógeno. Esta propuesta esta basada sobre observaciones de que el arsénico no tiene un punto mutagénico, ya que es carcinógeno, y que los oncogenes son amplificados en tumores de varios animales y humanos.

## ALTERACIONES EN LA REPARACIÓN DEL DNA

La inhibición de la reparación del DNA puede llevarnos a un evento genotóxico, el DNA reparador es inhibido en células tratadas con arsénico, y esta inhibición puede dar como resultado un efecto co-mutagénico con rayos X, luz UV, y varios agentes químicos. La reparación de DNA por escisión de dímeros de timina en fibroblastos humanos es inhibida por iAs, con  $As_2O_3$  es más potente que el arsenato de sodio (Okui and Fujiwara, 1986). La actividad de la DNA ligasa en extracto nuclear es disminuida por arsenito (disminuye 55% en arsenito 10  $\mu M$ ). Li y Rossman, en 1989; Hu et al, 1998) sugieren que el arsenito puede inhibir indirectamente la actividad de la DNA ligasa por alteración celular de los niveles redox afectando las señales de transducción y la vía de fosforilación de proteínas con las que se enlaza a DNA ligasa.

Las células eucariotas reaccionan con los rompimientos del DNA estimulando la enzima poli-(ADP-ribosa) polimerasa, la cual puede tener un rol en la reparación del DNA (Berg, 1985; Grube et al, 1991). Yager and Wiencke en 1997 observaron un decremento significativo dosis dependiente en la actividad de esta enzima en células T y linfomas en dosis de 10  $\mu M$  de arsenito, este decremento es aproximadamente de 50% en la actividad de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa y de un 80% en la viabilidad de la célula. La enzima contiene dos grupos sulfhidrilos, y el arsenito puede unir uno o dos grupos e inhibir la enzima.

## METILACIÓN ALTERADA DEL DNA

La metilación alterada del DNA puede tener un importante papel en el desarrollo de cáncer (Counts and Goodman, 1995). Mass y Wang en 1997 examinaron el efecto de arsénico sobre la metilación del DNA en muestras de tumor que contienen el gen supresor p53 y en la línea celular humana de adenocarcinoma A549 en esta investigación el arsenito incremento la resistencia de promotor p53 de la región de hendidura por la restricción de la enzima HpaII, la cual rompe la citosina metilada dentro de la secuencia CCGG. El incremento de la resistencia a la ruptura indica más citosina metilada que fue presentada

dentro del gen p53 y la habilidad de los factores de transcripción a unir el DNA, la cual modificaría el gen de expresión, y puede ser alterado por la citosina metilada. El arsenato fue el menos potente en el incremento de la metilación de la citosina, y el DMA<sup>v</sup> fue inefectivo con la dosis que se usó en este estudio. La hipermetilación inducida por arsenito fue confirmada por la secuenciación del DNA de la región promotora además de usar bisulfito para visualizar la 5-metilcitosina. Se observa que la secuencia CpG dentro del genoma completo fue metilado, por la disminución de la habilidad de SssI metilasa a transferir grupos metilos de SAM a DNA. Aunque el gen p53 fue hipermetilado no se sabe si la expresión genética fue alterada.

## ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se presenta cuando la especie de oxígeno reactivo ha generado que pueda reaccionar con constituyentes celulares tales como los tioles y los lípidos. El agotamiento del glutatión por agentes oxidantes, por ejemplo puede alterar el estado redox de la célula y presentar un estrés total y una situación tóxica. El arsénico induce un estado de choque térmico o estrés de proteínas en cultivos de células humanas (Keyse and Tyrell., 1989) en *in vivo* y Brown and Rush., 1984). La especie reactiva de oxígeno es detectada en células híbridas de humanos y hamster después de 5 minutos de exposición al arsenito (Liu et al., 2001). Enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa las cuales metabolizan oxidantes, reducen la inducción por arsenito de micronucleos en células de ovarios de hamster chino (Wang and Huang, 1994), e intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Nordenson and Beckman, 1991). Antioxidantes tales como la vitamina E, metilamina y vino de alcohol reducen a la muerte de fibroblastos por arsenito (Lee and Ho, 1994).

En el DMA peróxido ha sido detectado un radical *in vitro* (Yamaka et al., 1990) un daño oxidativo en el pulmón de ratos después de la exposición a DMA<sup>v</sup> (Yamaka et al 1991). Arsenicales orgánicos trivalentes inhiben el GSH reductasa (Stybło et al., 1997) y la tioredoxina reductasa (Lin et al., 1999). La inhibición de esas enzimas pueden resultar en un decremento de la habilidad de las células a proteger en contra de oxidantes.

En las células de mamífero la glutatión peroxidasa y catalasa son enzimas claves en la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), y de la protección celular contra el daño por el arsenito. El arsenito indujo a la apoptosis a varias líneas celulares provocando la disminución del antioxidante N-acetil-L- cisteína el cual contiene grupos tioles ya que este oxidantes se encarga de inhibir la apoptosis además de unirse a las ROS que favorecen también en inicio de la apoptosis (Cohen et al.,2001). Los radicales libres pueden provocar rupturas o alteraciones en el ADN así como un incremento en la heterocromatización *in vivo* según (Yamanaka et al.,1989, 1994). Estos investigadores proponen que DMA y la dimetil arsina producen radicales libres los cuales ayudan a provocar el daño sobre el ADN.

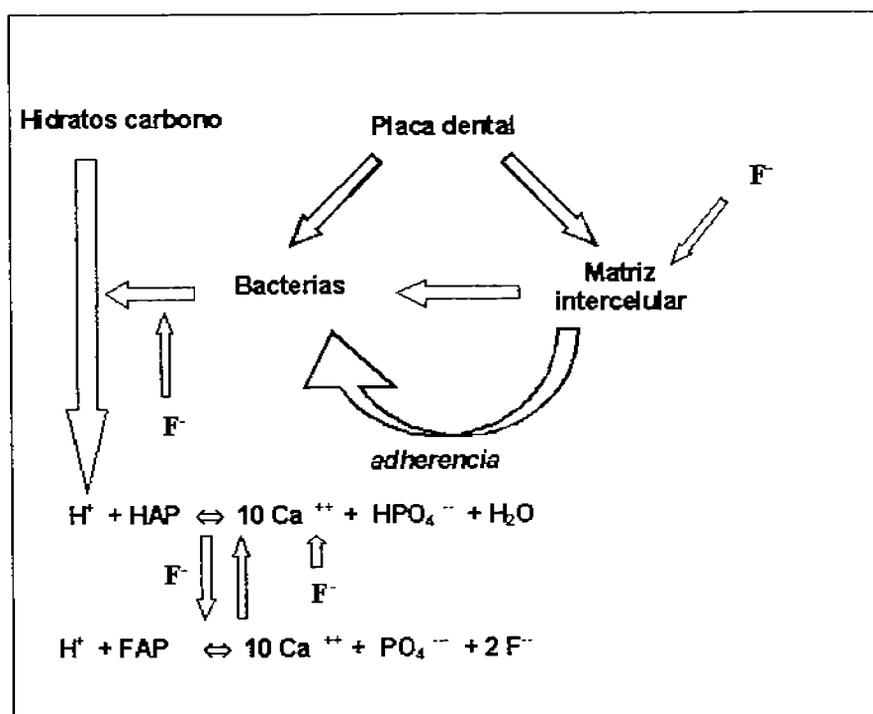
## 2.10 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL FLÚOR

Aumenta la formación ósea por actuar sobre los osteoblastos, aumentando su número (actividad mitogénica). Actúa como agente anabólico del hueso que requiere la presencia del IGF-1 o del TGF-beta para estimular la proliferación de la célula ósea. Se piensa que trabaja de manera similar al fosfato sobre el hueso y que probablemente actúe más en las células osteoprogenitoras no diferenciadas. Sus propiedades mitogénicas obedecen a su acción inhibitoria sobre una proteína del osteoblasto, la fosfotirosil fosfatasa, (PTP) lo que estimula la proliferación celular ósea, logrando aumentar la MAP kinasa, (proteína clave de señal intracelular) esencial para el mecanismo de activación de la mitogénesis. Resumiendo, se aumentan los niveles de tirosilfosforilación de unas proteínas que regulan la mitosis.(Lau KHW, et.al 1998). El flúor se incorpora a la hidoxiapatita alterando el tamaño y la estructura de los cristales disminuyendo por ende la competencia mecánica del hueso.(Red di, 1979; Lindsay, 1990) Es un agente formador de hueso, reflejado claramente en los marcadores de formación ósea sin alterar los de resorción.(Eastell,1998; Rosen, 2001).

El mecanismo de acción del flúor es múltiple:

1º) Inhibición de la desmineralización y catálisis de la remineralización del esmalte desmineralizado. Tal como se observa en la figura 6 las reacciones químicas son

reversibles y se rigen por la ley de acción de masas, de modo que si aumenta la acidez (aumento de hidrogeniones) se produce una descalcificación o desestructuración de las moléculas de hidroxiapatita y de fluorapatita. Para la hidroxiapatita el cristal empieza a disolverse cuando se el pH es menor de 5,5 mientras que para la fluorapatita esto ocurre si el pH es menor de 4,5 (pH crítico).



**Figura 6.** Mecanismos de acción del flúor en la prevención de la caries dental.

Cuando el ácido presente en la interfase es neutralizado por sistemas tampón (calcio, fosfatos, saliva) se produce una acumulación de Ca y P disponibles para volver a reaccionar y hacer posible la remineralización, formándose nuevas moléculas de hidroxiapatita y de

fluorapatita. Además el esmalte desmineralizado tendría mayor capacidad para captar el F que el esmalte sano. En definitiva, el proceso de desmineralización y remineralización dental sería un proceso dinámico que duraría toda la vida del diente.

2º) Transformación de la hidroxiapatita en fluorapatita, que es más resistente a la descalcificación. Esta reacción química entre la hidroxiapatita y la fluorapatita presenta una reversibilidad en función de la concentración de flúor en el entorno del esmalte dental, de modo que la fluorapatita no sería una situación definitiva y estable. Este mecanismo es el que se creía fundamental.

3º) Inhibición de las reacciones de glucólisis de las bacterias de la placa dental (sobre todo, *Streptococcus mutans*), con lo que disminuye la formación de ácidos (butírico y acético), mecanismo inicial indispensable para la descomposición de la hidroxiapatita en iones calcio, fosfato y agua).

4º) Reducción de la producción de polisacáridos extracelulares en la placa dental

*En todos los casos parece que el factor más importante en la prevención de la caries dental es la exposición a bajas dosis pero continuadas de fluoruro en la cavidad oral*

## CAPÍTULO III

### IMPORTANCIA DEL FLÚOR Y ARSÉNICO EN LA SALUD

#### 3.0 IMPORTANCIA DEL FLUORURO EN LA SALUD

El fluoruro fue utilizado por primera vez en la prevención de caries en la década de 1940, su actividad es defendida en dos áreas:

- El fluoruro inhibe las enzimas que producen ácidos en las bacterias de la placa dental. Esta observación es válida, pero algunos científicos creen ahora que el impacto dañino del fluoruro en otras enzimas útiles pesa más que el efecto beneficioso de la prevención de caries.
- Los iones fluoruro se ligan a los iones del calcio, fortaleciendo el esmalte del diente en los niños. Muchos investigadores consideran más una presunción que un hecho, debido a la evidencia contradictoria de los estudios en India y otros países durante los últimos años 10 a 15 años. No obstante, el acuerdo es universal que la ingesta de flúor excesiva lleva a la pérdida de calcio en la matriz del diente, produciendo una amelogénesis imperfecta conocida como fluorosis dental. La sobre exposición severa, crónica y acumulativa puede causar la fluorosis del esqueleto.

La ingesta crónica y excesiva de fluoruro puede llevar a un severo daño a la estructura ósea del individuo. Los síntomas tempranos incluyen el dolor esporádico y limitación del movimiento en articulaciones, dolor de cabeza, dolor de estómago y debilidad muscular pueden estar advirtiendo del problema. La fluorosis dental y del esqueleto, es irreversible y

no hay tratamiento actual. El único remedio es prevenirla, evitando la ingesta excesiva del fluoruro.

. ([http://www.sdpt.net/fluoruro\\_en\\_el\\_agua.htm](http://www.sdpt.net/fluoruro_en_el_agua.htm).)

### **3.1 FLUORURO DE SODIO**

El Flúor es un elemento traza indispensable, se piensa que juega un papel importante en la salud dental y ósea; tiene una particular afinidad por el tejido óseo. La dosis recomendada diaria es de 1.5 a 4mg. Su ingesta baja se asocia a retardo del crecimiento y del desarrollo y su ingesta alta y continua, a esclerosis esquelética. La dosis farmacológica de 20 a 100 mg al día aumenta la masa esquelética.(Libanati y cols.,1996) Se considera que su concentración adecuada en el agua tiene efectos benéficos para la salud dental y ósea sin ocasionar patología esquelética. (Demos y cols.2001; J Am Diet Assoc.,2001).

### **3.2 FLUOROSIS MUNDIAL**

La fluorosis es endémica en por lo menos 25 países del globo. El número total de personas no es conocido, pero una estimación conservadora es de varias decenas de millones. En 1993, 15 de los 32 estados de la India se identificaron como endémicos para la fluorosis. La fluorosis es prevalente en algunas partes de China central y occidental, y no sólo causada por el agua de bebida sino por la respiración de ambientes saturados con fluór . ([http://www.sdpt.net/fluoruro\\_en\\_el\\_agua.htm](http://www.sdpt.net/fluoruro_en_el_agua.htm).)

### **3.3 FLUOROSIS EN MÉXICO**

En México, 5 millones de personas aproximadamente el 6 % de la población es afectada por el fluoruro debido al agua subterránea. ([http://www.sdpt.net/fluoruro\\_en\\_el\\_agua.htm](http://www.sdpt.net/fluoruro_en_el_agua.htm).)

### 3.4 EFECTOS EN LA SALUD POR ARSÉNICO

#### **Efectos agudos:**

La intoxicación aguda debida a la inhalación de arsénico ocurre muy ocasionalmente en los lugares de trabajo. Los síntomas son respiratorios (tos, dolor de pecho, dispnea), desvanecimiento, dolor de cabeza y debilitamiento general, seguidos de síntomas gástricos como dolor, vómitos o diarrea.

#### **Efectos crónicos:**

Los signos de una intoxicación crónica en trabajadores expuestos a arsénico están relacionados con los sistemas gastrointestinal y nervioso, la piel y las mucosas, raramente aparecen desórdenes circulatorios. Los efectos crónicos en el hígado presentan tres fases según los síntomas:

*Primera fase:* sensación de debilidad, pérdida de apetito, náuseas, vómitos esporádicos  
Sensación de pesadez en el estomago y diarrea.

*Segunda fase:* conjuntivitis, estado catarral de las membranas nasales, de la laringe y respiratorias.

*Tercera fase:* neuritis periférica, inicialmente en las manos y los pies y esencialmente sensorial. (<http://www.sos-arsenic.net/espanol/as-estandar.html>)

### **3.5 RECOMENDACIONES QUE SE HAN HECHO PARA PROTEGER LA SALUD PÚBLICA**

La EPA ha establecido una cantidad máxima permisible para fluoruro en el agua potable de 4.0 miligramos por litro de agua (4.0 mg/l). Mientras que la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido límites de 0.2 miligramos por metro cúbico (0.2 mg/m<sup>3</sup>) para flúor , 2.0 mg/ para fluoruro de hidrógeno y 2.5mg/m<sup>3</sup> para fluoruro en el aire del trabajo para proteger a los trabajadores durante una jornada de 8 horas diaria, 40 horas a la semana.(ATSDR, 2004).

### **3.6 PREVIENIENDO EL ENVENENAMIENTO POR FLUORUROS**

Puede prevenirse el envenenamiento por fluoruro o puede minimizarse usando las fuentes de agua alternativas, quitando el fluoruro excesivo del agua de bebida, y mejorando el estado nutritivo de las poblaciones en riesgo.

#### **Fuentes de agua alternativa:**

- ❖ Agua de superficie
- ❖ Agua de lluvia
- ❖ Agua subterránea con baja concentración de flúor

Existen varios métodos para quitar el flúor del agua:

- ❖ Floculación. El método consiste en agregar alumbre al agua a tratar produciendo la precipitación del flúor .
- ❖ Adsorción. Este sistema se basa en filtrar el agua a través de una columna condensada con un adsorbente, como la alúmina activada ( $Al_2O_3$ ).
- ❖ Evaporación. Es el simple uso del sistema de destilación, el sistema en si debe tener una fuente calórica. Puede ser eléctrica, gas o combustible líquido. El resultado es óptimo para la eliminación del flúor.
- ❖ Condensación de humedad ambiente. El proceso consiste en la condensación de la bruma proveniente del mar durante la noche, unas mallas metálicas dispuestas en el paso de la bruma logran condensar la humedad del ambiente en su superficie. El agua así recolectada en tanques es utilizada como agua dulce.(ASTDR, 2004).

## CAPÍTULO V

### BIOMARCADORES

#### *Definición:*

**4.0 BIOMARCADOR.** *BIOMARKER.* Una variación xenobióticamente inducida en los procesos, estructuras o funciones celulares y bioquímicas, que puede ser cuantificable en una muestra o en el sistema biológico en general. (*Sinónimo:* marcador biológico.

(<http://www.ensayistas.org/critica/ecologia/diccionario/b.htm>).

#### 4.1 MARCADORES BIOLÓGICOS

Los marcadores biológicos, también denominados determinantes o indicadores biológicos de exposición a un compuesto químico pueden ser, según su naturaleza, el propio compuesto, sus metabolitos característicos, productos procedentes de reacciones de conjugación del compuesto o de sus metabolitos que se puedan producir en los ciclos bioquímicos endógenos, aductos formados por reacción del compuesto o por sus metabolitos con macromoléculas, interferencias bioquímicas o enzimáticas cuantificable, etc. (Que Hee S.S., 1997).

El monitoreo del medio ambiente y la evaluación del riesgo a la exposición de agentes xenobióticos, se realiza utilizando sistemas de pruebas biológicas. En ellos se intenta establecer la existencia, naturaleza o grado del daño tóxico provocado por un agente y da pautas acerca del mecanismo de acción a través de indicadores o biomarcadores (Ramírez P., 2000).

Atendiendo al tipo de información que suministren se puede distinguir distintos tipos de indicadores. **Indicadores de dosis** son aquellos que suministran información sobre la dosis

interna de un compuesto, ya sean de dosis real, es decir aquellos que indican la cantidad de xenobiótico presente en organismo o de dosis efectiva entendiendo por tales los que reflejan la interacción entre el tóxico y el órgano crítico. **Indicadores de efecto**, que, a su vez, pueden ser de efecto bioquímico, cuando reflejan una alteración de parámetros bioquímicos (como la actividad enzimática), de efecto fisiológico que están basados en las variaciones fisiológicas inducidas por un tóxico (generalmente del sistema nervioso o respiratorio), o de efecto biológico precoz que son aquellos que reflejan las manifestaciones iniciales de los efectos adversos característicos. Finalmente, los **indicadores de acumulación**, ya sea diaria o semanal, reflejan la cantidad de compuesto acumulado en los compartimentos biológicos en que se encuentran almacenados (por ejemplo, en el tejido graso). (Periago F., INSHT., 2002).]

#### **Otras fuentes clasifican a los biomarcadores de la siguiente manera:**

**Biomarcadores de Exposición:** Miden la exposición a un compuesto particular, detectando la presencia del compuesto y de sus metabolitos en fluidos corporales; poniendo de manifiesto la presencia y el grado de exposición al tóxico por el organismo. Un ejemplo de estos, son los aductos de proteínas y ADN, que pueden ser detectados en sangre, tejidos y células sanguíneas. (Escárcega. L. 2004)

**Biomarcadores de dosis biológicamente efectivas;** Indican que el tóxico ya ha producido daños en el organismo. Son los compuestos de adición estables que forman el tóxico o sus productos de bioactivación con los ácidos nucleicos y proteínas (Universidad de Arizona, Centro de Toxicología).

**Biomarcadores de Susceptibilidad;** Se utilizan para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población. Algunos individuos tienen probabilidades más altas que otros de recorrer completo el camino exposición-enfermedad. Esto se puede deber a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, de excretar o de reparar daños. (Castro V. 2003).

Biomarcadores de respuesta biológica; Representan estados avanzados del proceso de daño. Son más persistentes y a menudo representan alteraciones genéticas.

Biomarcadores de enfermedades; Son manifestaciones preclínicas tempranas de enfermedades, representan el último paso antes de que se establezca la enfermedad que produce la exposición. Los pólipos en el colon son un marcador de enfermedad ya que la continuación de la exposición puede conducir a la generación de un cáncer.

Los biomarcadores son útiles para:

- a) Detecta la presencia de una exposición
- b) Determinar las consecuencias biológicas de la exposición
- c) Detectar los estados iniciales e intermedio de un proceso patológico
- d) Identificar a los individuos sensibles de una población
- e) Fundamenta la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

(Artega . L.,Sandra, 2003)

En el diseño de una rutina de muestreo es necesario considerar lo siguiente:

- a) Especificidad y sensibilidad del biomarcador
- b) Dificultad del muestreo
- c) Cinética de la formación del biomarcador
- d) Estabilidad del biomarcador

(koplin, 2001).

Cuando un organismo se expone a un agente tóxico es necesario saber que tipo de biomarcador es más útil para el estudio que se pretende realizar. La siguiente figura (7) nos puede ayudar a elegir el biomarcador más adecuado.

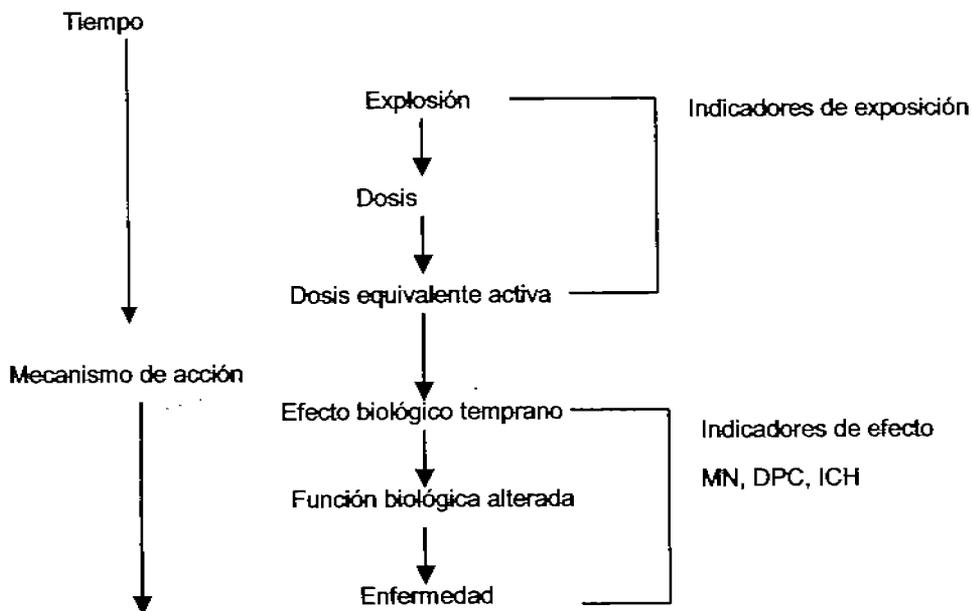


FIGURA 7. Como Elegir el biomarcador más útil (Gonsebatt 2003).

#### 4.4 INTERACCIONES ADN-PROTEÍNAS

Las interacciones entre el ADN y las proteínas están implicadas en la expresión de genes, y la interrupción en el balance que guardan las proteínas junto con la cromatina y/o el ADN puede tener serias consecuencias genéticas; ya que solas o unidas con otras, interactúan con consecuencias específicas del ADN para encender y apagar genes, mediante interacciones reversibles y no covalentes. Al mismo tiempo, el ADN contiene proteínas y péptidos covalentemente unidos, que son muy importantes en el mantenimiento de la estructura de la cromatina o como importantes enzimas funcionales (Escárcega, 2004).

En el núcleo celular el material genético interacciona constantemente con proteínas, la unión ADN-proteína está implicada en proceso de expresión génica, reparación, replicación, recombinación, transcripción y en mantener la organización estructural del material genético (Minko et al., 1993).

Existen evidencias de que algunos agentes químicos clasificados como carcinógenos pueden inducir que ciertas proteínas reguladoras se unan por medio de enlaces covalentes al DNA formando aductos ADN-proteínas (DPC), en los que se combinan bases nitrogenada o fosfatos del ADN con residuos de aminoácidos de las proteínas tales como la cisteína, ácido glutámico, histidina, treonina, tirosina y lisina (Ramírez et al., 2000; Costa et al., 1993).

La generación de entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas con las que interaccionan (DPC) pueden producir interrupciones en las hebras de ADN, originando deleciones importantes durante su síntesis y reparación, lo que puede ocasionar la inactivación o pérdida de genes como los involucrados en la supresión de tumores o en secuencias teloméricas cuya preservación resulta esencial en el mantenimiento de la integridad cromosómica. (Ramírez et al., 2000)

#### **4.5 ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS (DPC) COMO BIOMARCADOR**

Existen estudios que apoyan el interés de proponer a los DPC como biomarcadores en la exposición a carcinógenos (IARC, 1992). Ya que se ha observado un incremento dramático en los niveles de DPC después de la exposición a agentes como la luz UV (Shetlar et al., 1980), radiación ionizante (Oleinick et al., 1987), aldehídos (Voitkun et al., 1999), así como otros agentes químicos.

Y aunque el significado biológico de los aductos ADN-proteínas en términos de carcinogenicidad, citotoxicidad y mutagenicidad está poco explorado aún cuando hay gran cantidad de agentes inductores de este tipo de aductos como primera lesión genotóxica. (Arteaga, 2003).

Una gran cantidad de fenómenos celulares, dependen de interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos.

El ADN está asociado con una variedad de proteínas. Específicamente en la cromatina, se encuentra formando parte de un complejo con histonas conocido como nucleosoma. En esta combinación ambas moléculas mantienen la organización estructural del material genético y coordinan diversos procesos celulares entre los que destacan la replicación, reparación, recombinación y transcripción celular (Minko y cols., 2002).

Las interacciones que se generan entre proteínas y el ADN son generalmente reversibles (Costa y cols., 1993; Hunter y cols., 1992; Neuer y cols., 1985).

Sin embargo, existen varios agentes físicos y químicos capaces de modificar o inducir la unión de proteínas con el ADN mediante interacciones fuertes de tipo covalentes o iónicas. (Werfel, U., 1998; Quievryn y Zhitkovich, 2000; Ramírez y cols., 2000).

Los DPC incrementan su cantidad basal dramáticamente después de la exposición a una variedad de agentes químicos y físicos.

Tal es el caso de las radiaciones ionizantes (Simic y cols., 1985), algunos aldehídos (Casanova y cols., 1994), el arsenito de sodio (Ramírez y cols., 2000), cromo (Costa y cols., 1993), entre otros. Agentes quimioterapéuticos, como el cisplatino también inducen la formación de DPC.

Existen datos experimentales que permiten proponer a los DPC como biomarcador de exposición al cromo, conocido carcinógeno humano, esta propuesta se fundamenta ya que se ha encontrado una correlación positiva entre el nivel de exposición a este agente y el incremento de cáncer de pulmón en trabajadores de industrias fundidoras y cromadoras (Hughes y cols., 1994).

Recientemente se ha propuesto al mecanismo de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER) como uno de los medios mediante el cuál los DPC pueden ser removidos en las células. Este mecanismo es efectivo en la remoción de los DPC inducidos por radiaciones ionizantes (Minko y col., 2002).

El proceso de reparación de DPC es probablemente un fenómeno complejo ya que durante la formación de este tipo de daño genético por acción de agentes tóxicos se combinan bases nitrogenadas o fosfatos del ADN con residuos de aminoácidos como la cisteína, ácido glutámico, histidina, treonina, tirosina y lisina así como por los nitrógenos o fosfatos en las bases del DNA. En algunos casos se conoce cuales aminoácidos y bases son susceptibles a interactuar entre sí para formar los DPC, por ejemplo el cis-platino se une a el N7 de las bases púricas formando monoadductos los cuales se transforman en entrecruzamientos inter e intra hebras. Si el daño generado al ADN no es eficientemente reparado, pueden derivarse una serie de mutaciones que dependiendo del sitio específico y del gen dañado se pueden producir cambios en los procesos metabólicos, muerte celular, alteraciones cromosómicas, transformación celular incluso cáncer (Steeg y cols., 2001).

A pesar del significado biológico que pueden tener los DPC inducidos por agentes genotóxicos con potencial carcinógeno en humanos y de las consecuencias que este tipo de lesiones genéticas pueden favorecerse en la célula. Los estudios encaminados a dilucidar los mecanismos de formación de los DPC, la especificidad de agentes tóxicos sobre su formación, inducción del daño, las secuencias y las proteínas involucradas en los DPC, el tipo de enlace entre las dos biomoléculas involucradas, la sensibilidad del ADN y proteínas por interactuar mediante enlaces fuertes, las bases y aminoácidos involucrados; entre otras características fundamentales son pocos.

## CAPÍTULO VI

### 5.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estados de México como Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo y San Luis Potosí así como en diferentes partes del mundo, se han detectado concentraciones de arsénico en los cuerpos de agua subterránea por arriba de las concentraciones máximas permisibles, desafortunadamente diversas comunidades, poblados y ciudades se abastecen de agua potable de estos cuerpos de agua y las actividades relacionadas ocasionan serios problemas de salud por exposición al arsénico y otros agentes. Se tiene documentado un incremento en los niveles contenidos en los mantos acuíferos de agentes potencialmente tóxicos entre los que destacan el arsénico y el flúor, incrementando el riesgo de exposición a este tipo de agentes en poblaciones.

Considerando lo anterior y el hecho de que estos elementos pueden ser incorporados al organismo de manera natural por vía oral y biotransformarse principalmente en hígado con la subsiguiente excreción a través de riñón por orina, es que ha surgido el interés por conocer la acción conjunta de estos dos elementos con el fin de evaluar si el flúor es capaz de inducir por sí sólo la formación de aductos ADN-proteínas, o de modificar la acción ya conocidas del arsenito para formar DPCs en el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c. Para este fin, se trataron ratones de la cepa BALB/c durante 9 días, transcurrido el período de tratamiento, se aislaron los aductos ADN-proteínas de hígado y riñón con el fin de conocer la proporción de aductos en hembras y machos tras una exposición por vía oral de arsenito y flúor.

## **5.1 OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la capacidad de formación de aductos ADN-proteínas del arsénico, flúor y la combinación de estos elementos en un modelo *in vivo*

## **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Investigar la capacidad inductora del arsénico en combinación con el flúor, sobre la formación de aductos ADN-proteína en hígado y riñón de ratones BALB/c después de 9 días de tratamiento.
- Investigar el efecto inductor del arsénico y flúor en forma individual, sobre la formación de aductos ADN-proteína en el hígado y riñón de ratones BALB/c después de 9 días de tratamiento.
- Determinar si la capacidad de los elementos en estudio sobre la formación de aductos ADN-proteína tiene una respuesta dependiente de la dosis.
- Conocer si existe diferencias en la susceptibilidad de acuerdo al género, para formar aductos ADN-Proteína en ratones BALB/c.

## 5.3 MATERIALES Y REACTIVOS

### MATERIAL

Ultracentrifuga	Beckman Coulter (USA)
Microcentrifuga	HERMLE (MEX)
Fluorometro	PRECISION (USA)
Baño María	PRECISION (USA)
pH-metro	OAKTON (USA)
Balanza Analítica	SARTORIUS (USA)
Vortex	GENIE 2 (USA)
Tubos de ensaye para ultracentrifuga	
Pipetas	
Vasos de precipitado	
Tubos Eppendorf	
Agitador	

### REACTIVOS

Buffer de Sacarosa 0.25 M / (0.01M Tris-HCl;PMSF 0.01mM) pH7.5

Buffer de Sacarosa 2.2 M / (0.01M Tris-HCl; PMSF0.1mM) pH 7.5

Proteinasa K (2 mg/ml)

PMSF (10mg/ml)

PBS (NaCl, KCl, (NaHPO<sub>4</sub>) anhidro y (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). pH 7.5

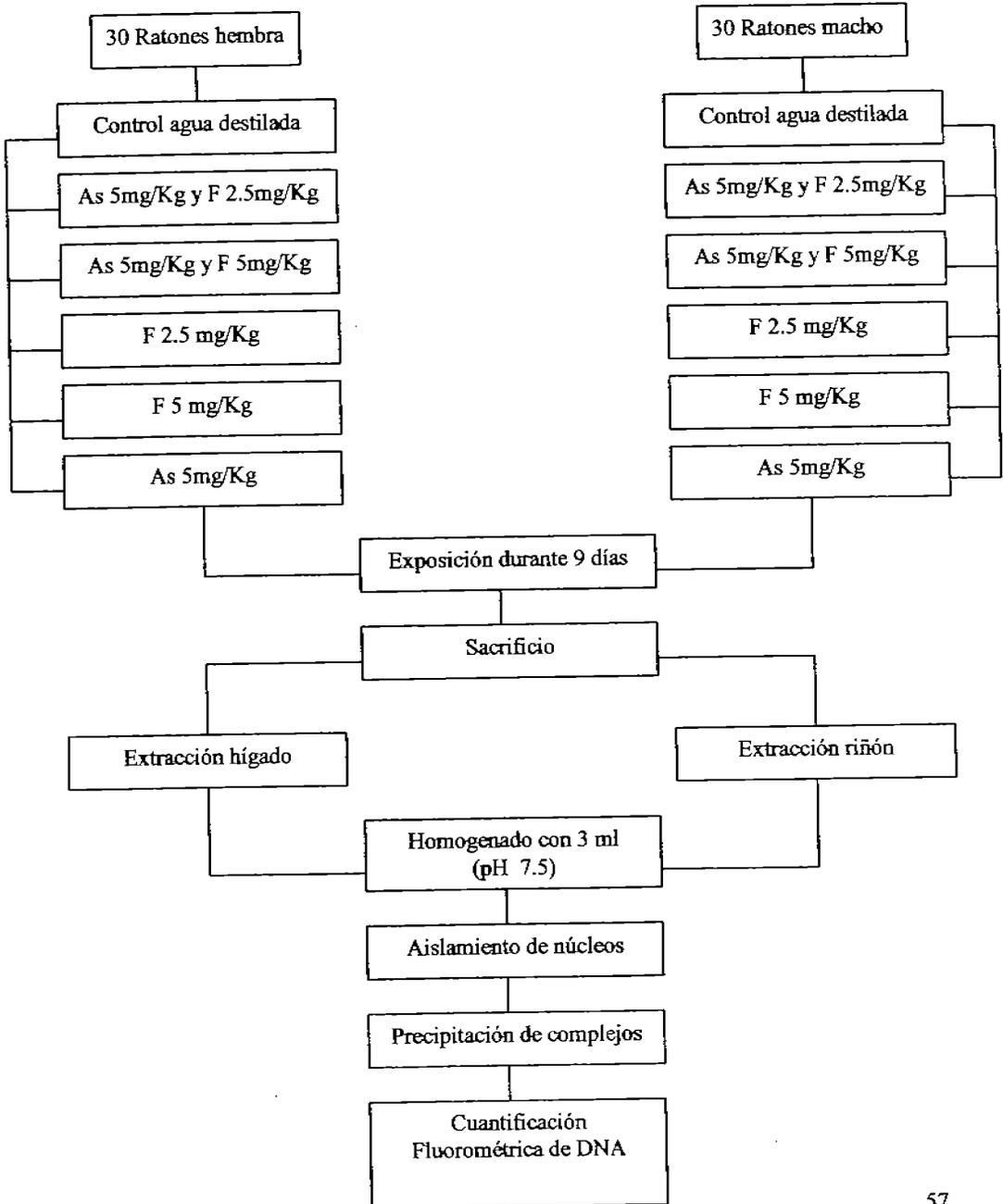
Sol. A (SDS 2%,Tris-HCl 20mM) pH 7.5

Sol. B (200 mM KCl,20mM Tris-HCl). pH 7.5

Sol. C (KCl 100mM, Tris-HCl 20 mM) pH 7.5

Sol. D (KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM) ) pH 7.5

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 5.4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se formó un grupo de 30 ratones hembra y otro grupo de 30 ratones macho todos de entre 4-6 semanas de edad. Cada grupo se dividió en 6 lotes con 5 ratones de la cepa BALB/c. El experimento se hizo por duplicado Cada lote se trató por 9 días de la siguiente manera:

**Tabla 6.** Tratamientos

Lote	Tratamiento
1	Blanco Agua destilada
2	As (5mg/Kg) y flúor (2.5mg/Kg)
3	As (5mg/Kg) y Flúor (5mg/Kg)
4	Flúor( 2.5mg/Kg)
5	Flúor ( 5mg/Kg)
6	Arsénico (5 mg/Kg)

Cabe mencionar que la concentración de Arsénico de 5mg/kg fue elegida ya que en un trabajo previo(Arteaga 2003), ésta fue la concentración en donde se observó una mayor formación de aductos ADN-proteínas.

Después del tratamiento los animales se sacrificaron por dislocación cervical, aislando el hígado y riñón y se colocaron en una solución de PBS pH 7.2 con inhibidores de proteasa y manteniendola en hielo.

La obtención de los DPC se realizó a partir de los núcleos aislados del hígado y riñón de los ratones. Los núcleos se aislaron de la siguiente forma.

## **AISLAMIENTO DE NÚCLEOS**

Una vez extraído los órganos de interés, se homogenizaron en 3 ml de buffer de fosfatos pH 7.5 suplementado con inhibidores de proteasa: PMSF 10mg/ml, Azida de sodio 0.5M (30µl/ml). Los tubos se mantuvieron siempre en hielo.

- 1) El homogenado se diluyó 1:10 en buffer de sacarosa 0.25M, transcurrido 5 min. se centrifugó a 15000g por min. A 4° C.
- 2) El sobrenadante fue descartado y se conservó la pastilla
- 3) La pastilla obtenida se resuspendió y se repitió el paso 1.
- 4) La pastilla obtenida nuevamente, se resuspendió en una solución de 500µl (SDS 2%, Tris-HCl 20mM, PMSF 1mM pH=7.5). y se congelaron a -70°C para proceder a la precipitación de los complejos.

## **TÉCNICA PARA LA PRECIPITACIÓN DE LOS COMPLEJOS ADN-PROTEÍNA.**

- a) Un volumen de 500 µl de núcleos aislados se descongelaron a 37°C por cada ratón tratado. Los núcleos fueron lisados, pasando la suspensión a través de una aguja calibre 21 cuatro veces. Los lisados se mantuvieron en hielo durante este proceso. Se tomaron alícuotas de 100 µl para y se determinó el ADN total mediante fluorimetría (Labarca y Paigen, 1980).

- b) El resto del lisado se adicionó a 500  $\mu$ l de solución B (KCl 100mM, Tris-HCl 20mM, pH=7.5).
- c) Las muestras se incubaron 10min. a 65° C en un baño María.
- d) Transcurrido el tiempo los tubos se invirtieron 3 veces y se colocaron en hielo 5 min. para precipitar los complejos.
- e) Los precipitados se centrifugaron a 10000 g durante 10 min. a 4°C
- f) El sobrenadante se removió y se lavó el precipitado con 1 ml de solución C (KCl 100mM, Tris-HCl 20mM pH 7.5) y se agitó.
- g) Los precipitados se centrifugaron a 6000g durante 5 min. a 4°C.
- h) Se repitieron los pasos del c) al g) 2 veces más.
- i) Posteriormente se centrifugó a 6000g por 5 min. a 4°C.
- j) Se removió el sobrenadante y se agregó al precipitado 250  $\mu$ l de la sol. D ( KCl 100mM, Tris-HCl 20 mM , EDTA 10 mM).
- k) A los 250  $\mu$ l se le agregó PK hasta obtener una concentración final de 0.2 mg/ml de PK
- l) Se incubó a 50°C durante 3 hrs.
- m) Se agregó a cada tubo albúmina hasta obtener una concentración final de 100  $\mu$ g de albúmina por cada tubo.
- n) Después se incubó en hielo durante 10 min.
- o) Se centrifugaron los tubos a 10000 g durante 10 min. a 4°C.
- p) Finalmente se recuperó el sobrenadante DNA que estuvo complejoado y se congeló a -75°C.

(Zhitkovich et al., 1992; Costa et al., 1993).

Al término de la precipitación de los complejos se procedió a determinar la concentración del ADN complejoado y el ADN total mediante fluorometría.

## CUANTIFICACIÓN DEL ADN POR FLUOROMETRÍA

### ADN COMPLEJADO

- 1) 100  $\mu$ l DNA complejo + 890  $\mu$ l de sol. D + 12.5  $\mu$ l de sol. De Hoechst
- 2) Guardar 10 min. En la oscuridad
- 3) Leer en el fluorómetro

### ADN TOTAL

- 1) 10  $\mu$ l de homogenado total + 980  $\mu$ l de sol. D + 12.5  $\mu$ l de sol. de solución Hoechst
- 2) Incubar 10 min. En la oscuridad
- 3) Leer en el fluorómetro filtro de emisión EM/D460/10 y excitación EX/D360/40 BIORAD.

Las lecturas de fluorescencia obtenidas se utilizaron para poder obtener el porcentaje de aductos formados en cada muestra utilizando una curva estándar preparada con DNA de timo de ternera. Estos datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de ANOVA con una  $p < 0.05$  de significancia y un análisis de comparación múltiple de medias (prueba de Fisher).

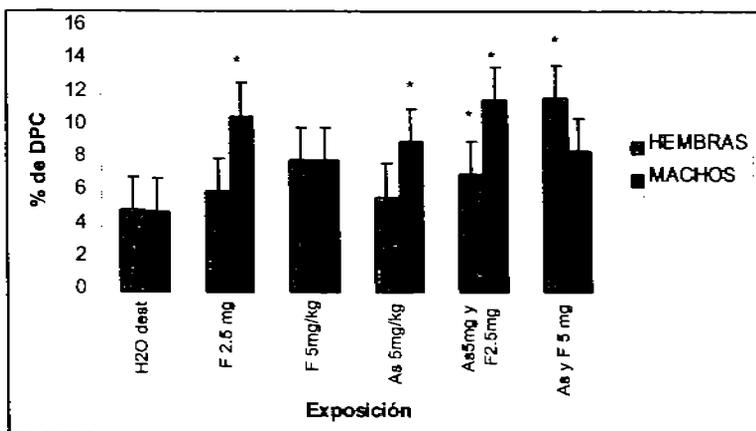
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen reportes en donde los entrecruzamientos ADN-Proteínas (DPC) incrementan su cantidad en sistemas biológicos como resultado de la exposición a una variedad de agentes químicos y físicos, muchos de ellos carcinógenos reconocidos, (Minko et al., 2002). Es por eso que los DPC's han sido propuestos como biomarcadores de exposición a agentes genotóxicos.

En estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo en modelos experimentales *in vitro e in vivo* (cultivo de cortes de hígado de ratón), observamos un efecto temprano significativo (3hrs y 9 días de exposición) sobre la capacidad inductora del arsénico y flúor de aductos ADN-proteínas en el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c (Arteaga 2003; Castro 2003; Escárcega 2004).

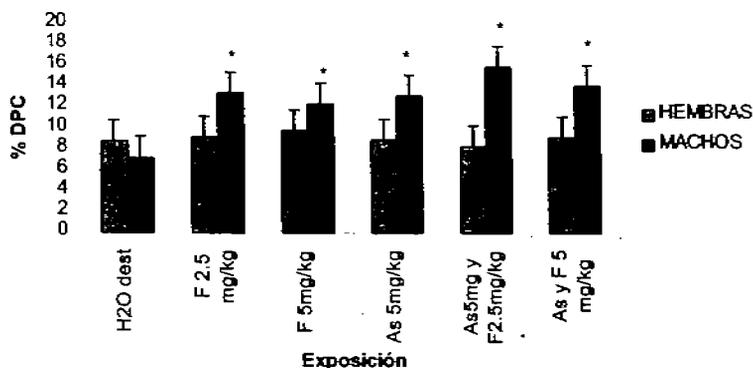
En el presente trabajo observamos que esta capacidad también fue significativa en el hígado de ratones machos y de hembras expuestos durante 9 días al arsénico y flúor observando diferencias en la susceptibilidad a la exposición de los agentes tóxicos en cada grupo de tratamiento. (Gráfica 1 y 2).

Los resultados sugieren una menor capacidad de los agentes en estudio por inducir la formación de los aductos ADN-proteínas en las hembras de todos los tratamientos, con excepción en el que se administró conjuntamente el As y F 5mg/Kg. (Gráfica 1 y 6) Mientras que para los machos la máxima inducción de DPC se encontró en los tratamientos conjuntos de As 5 mg/kg y F 2.5 mg/kg de peso. Estos resultados sugieren diferencias de género en la susceptibilidad *in vivo* al daño celular medido como DPC en el hígado de ratones BALB/c.



**Gráfica 1.** Inducción de Aductos ADN-proteína en hígado de ratón

En el caso del riñón la proporción de DPC formados fue significativamente diferente respecto al control solo en los ratones machos expuestos a los diferentes tratamientos. Esto se puede observar en la gráfica número 2 y en la tabla 10 en donde la mayor inducción de aductos por efecto del flúor se presenta con la concentración de 2.5mg/kg. Mientras que para las hembras no existieron diferencias significativas respecto al control en ninguno de los tratamientos cuando se cuantificó la proporción de DPC en riñón (tabla 9).



**Gráfica 2.** Inducción de Aductos ADN-proteína en riñón de ratón

Uno de los mecanismos de daño celular propuesto asociado al efecto inducido a proteínas y ADN de manera directa o indirecta es a través de la formación de especies reactivas de oxígeno producto del metabolismo de los tóxicos y cuya participación se asocia con fenómenos patológicos inducidos por el flúor y arsénico (Guan et al., 1998; Yamanaka et al., 2000).

Específicamente en el caso del flúor, la formación de aductos ADN-proteínas quizá esté relacionada con la gran producción de radicales súper óxido reportada por (Rzeuski et al; 1998) quien observó que también se inducía la inhibición de superóxido dismutasa (SOD) a concentraciones elevadas del halógeno. Esta inhibición puede generar un decremento en la protección celular contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la biotransformación del agente.

Evidencias que apoyan lo anterior muestran que en personas que viven en áreas endémicas de fluorosis la generación de radicales libres producto del metabolismo de flúor promueve una disminución en la actividad de SOD y glutatión peroxidasa, correlacionando este evento con la presencia de lipoperoxidación de lípidos de membrana (Guan et al; 1998).

En el caso del As estudios previos muestran la capacidad inductora del arsenito *in vitro* e *in vivo* en la formación de DPCs. Los mecanismos relacionados con esta capacidad pudieran estar relacionados con los efectos tóxicos inducidos por el As III en los que se presenta una inhibición de enzimas que contienen el grupo sulfhidrilo y cuya integridad es muy importante para su actividad. Se sabe que los compuestos arsenicales trivalentes reaccionan fácilmente *in vitro* con moléculas que contienen el grupo tiol como por ejemplo el GSH y la cisteína (Scout et al, 1993; Delnomdedieu, et. al 1994b). El arsenito tiene una alta afinidad por los ditioles más que con los monotioles, debido a que en los primeros, se favorece en alto grado, la transferencia de electrones al GSH durante el metabolismo.

Por otro lado existen evidencias que señalan que el MMA<sup>III</sup> y DMA<sup>III</sup>, producto del metabolismo del As<sup>III</sup> son capaces de unirse fuertemente a proteínas. (Delnomdedieu et al, 1993).

Las bases nucleotídicas contenidas en el DNA son blanco de los agentes inductores de aductos ADN-proteínas, en parte por la susceptibilidad a interaccionar con los radicales libres. Para algunos agentes carcinógenos como el cromo se sabe que existen bases nucleotídicas como la guanina y citosina capaces de mediar la formación de aductos ADN-

proteínas de las proteínas involucradas destacan las histonas y citoqueratinas entre otras proteínas (Tsapakos et al., 1983; Wedrychowsky et al., 1986).

En el caso del As un mecanismo de acción relevante que pudiera estar asociado a la inducción de DPC puede estar favorecido por la facilidad de los grupos fosfato a ser sustituidos por el As (arsenolisis) ( ATSDR, 1990).

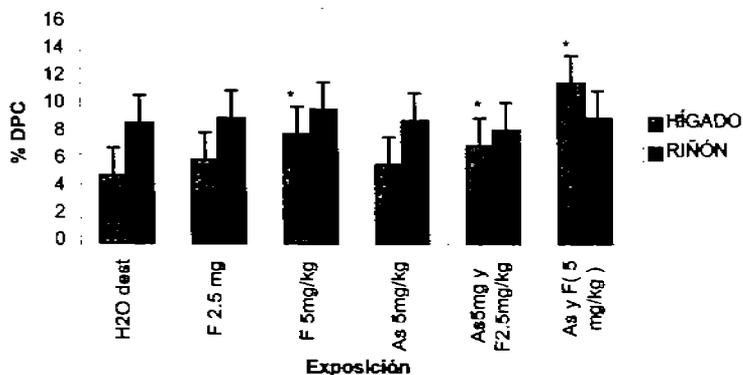
Sobre la susceptibilidad al daño inducido por agentes tóxicos específicamente en órganos y tejidos no existe información al respecto. En este trabajo la inducción de aductos fue diferente en cada órgano analizado como se observa en la gráfica 3 y 4. Si comparamos la inducción de DPC en los órganos estudiados, podemos relacionar que el efecto tanto del arsénico como del flúor dependen al parecer de la capacidad metabólica del órgano blanco, la dosis administrada y probablemente del tiempo de exposición en los órganos. En el caso del hígado su principal función es la de metabolizar a los agentes en estudio para convertirlos en formas excretables vía renal. Aunque se ha reportado que en el caso del arsénico la (As-metiltransferasa) se encuentra en diversos órganos entre ellos el riñón, sugiriéndonos que pueden existir metabolitos en otros órganos y tejidos. (Goering 1999). Los metabolitos pueden acumularse en cualquiera de los 2 órganos dependiendo del tiempo de exposición lo que pudiera favorecer en diferente medida la inducción de DPC. En este caso, la inducción de DPC en el riñón por F fue significativamente mayor que el control en todos los tratamientos para los machos no así para las hembras.

Cuando se analizó la diferencia en la formación de DPC observamos diferencia significativa respecto al género y en la combinación de arsénico y flúor, se ha propuesto que el tiempo de exposición y grado de exposición son variables importantes a considerar. En la exposición a As, diversas poblaciones modifican su capacidad metabólica en respuesta a los niveles hormonales, por lo que la generación de especies reactivas capaces de inducir la formación de DPC en hembras y machos es diferente.

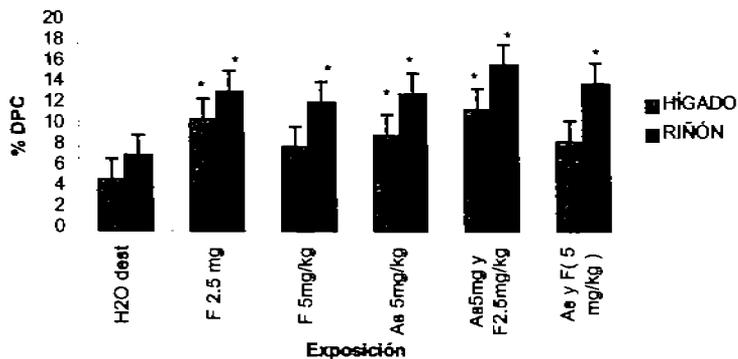
En este trabajo el tiempo y el grado de exposición fue el mismo, por lo que las diferencias observadas pueden estar influenciadas por el estado hormonal de los ratones tratados.

Estas diferencias se ven influenciadas incluso por diferencias génicas que permiten una mayor capacidad metabólica en diferentes grupos o etnias (Smith et al; 2000; Aposhian 1997 y 1999). Al momento, no se tienen datos consistentes que refieran una variación en relación a la ingestión, dieta y edad de los sujetos de estudio que puedan influenciar la

distribución de los metabolitos y con ello el metabolismo del As (Loffredo et al; 2002). Pero sí se ha asociado una elevada exposición a este elemento, con un incremento en la tasa de excreción de las formas metiladas predominando DMA en comparación con MMA. (Loffredo, 2002; Vahter y Concha2002).

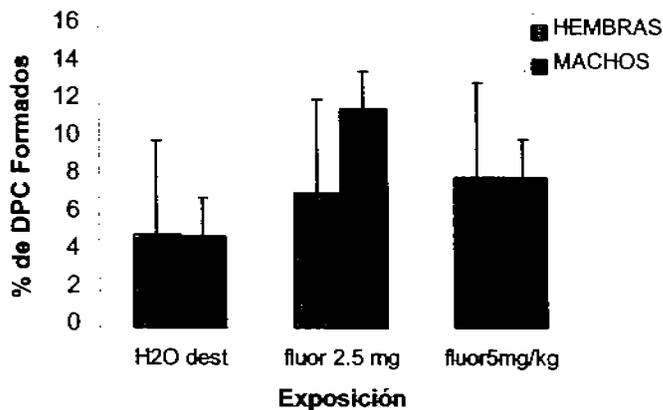


Grafica 3. DPC en hígado y riñón de ratones hembra.



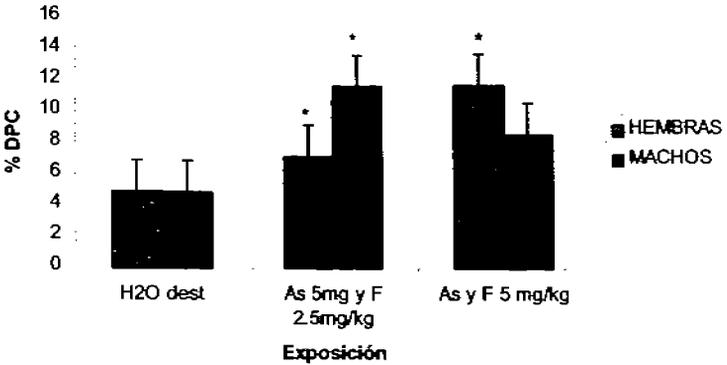
Grafica 4. DPC en hígado y riñón en ratones machos.

Por otra parte podemos comentar que en este trabajo, la inducción de las lesiones puso en marcha mecanismos antioxidantes celulares para hacer frente al daño celular observado permitiendo una reducción en la proporción de DPC durante las exposiciones a la máxima concentración evaluada de flúor (5 mg/kg) observando este efecto en ambos grupos de experimentación (hembras y machos) lo anterior lo podemos apreciar específicamente en la siguiente gráfica:

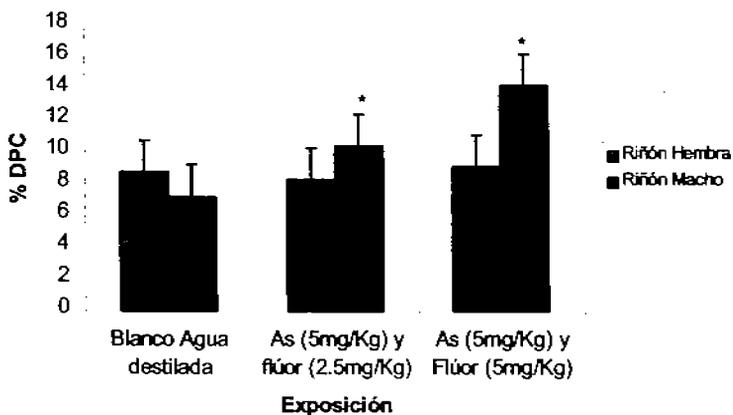


**Gráfica 5.** Inducción de DPCs en hígado de ratones hembras y machos por efecto del Flúor.

En el caso de las exposiciones conjuntas y después de cuantificar los DPC en el hígado de ratones hembras y machos, es notorio el incremento de la proporción de DPC, aunque en los machos, la cantidad de DPC no incrementa en relación a la dosis de los elementos administrados de forma conjunta (Gráfica 6 y 7). Esto se puede deber a que la administración de los agentes en forma conjunta, genera un efecto de cooperatividad hacia la formación de aductos ADN-Proteína. Este mismo efecto se observa en riñón, principalmente para ratones macho.



**Gráfica 6.** Inducción de DPC por efecto del arsénico y flúor en forma conjunta en hígado de ratón hembra y macho



**Gráfica 7.** Inducción de DPC por efecto del arsénico y flúor en forma conjunta en riñón de ratón hembra y macho

Finalmente, cabe mencionar que durante el tiempo de exposición y bajo las condiciones de trabajo, se observó una situación de estrés y agresividad en forma progresiva de los ratones principalmente los tratados con flúor a una dosis de 2.5 mg /kg. Al respecto, se sabe que en exposiciones a flúor existe una relación con el daño neurodegenerativo debido a que el halógeno puede acumularse en el cerebro, lo que nos sugiere que probablemente se estaba generando cierto daño al Sistema Nervioso Central (SNC.). Algunos reportes señalan que la acumulación de fluoruro en regiones importantes del cerebro como el hipocampo en ratas, correlaciona con los niveles de F contenidos en el agua de consumo de estos animales. (Mullenix et al., 1996).

## TABLAS

**Tabla 7.** Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en hígado de ratón hembra (ANOVA  $p < 0.05$ ;  $F=10.02$ )

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>% DPC</b>	<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>
<i>Blanco Agua destilada</i>	<b>4.95</b>	<b>1.61</b>
<i>As (5mg/Kg) y flúor (2.5mg/Kg)</i>	<b>7.15*</b>	<b>2.85</b>
<i>As (5mg/Kg) y Flúor (5mg/Kg)</i>	<b>11.72*</b>	<b>3.36</b>
<i>Flúor (2.5mg/Kg)</i>	<b>6.10</b>	<b>2.32</b>
<i>Flúor (5mg/Kg)</i>	<b>7.99*</b>	<b>1.67</b>
<i>Arsénico (5 mg/Kg)</i>	<b>5.78</b>	<b>2.22</b>

\*Estadísticamente significativo

**Tabla 8.** Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en hígado de ratón macho.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>%DPC</b>	<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>
<i>Blanco Agua destilada</i>	<b>4.95</b>	<b>0.97</b>
<i>As (5mg/Kg) y flúor (2.5mg/Kg)</i>	<b>11.67*</b>	<b>5.44</b>
<i>As (5mg/Kg) y Flúor (5mg/Kg)</i>	<b>8.57</b>	<b>3.28</b>
<i>Flúor( 2.5mg/Kg)</i>	<b>10.66*</b>	<b>2.59</b>
<i>Flúor ( 5mg/Kg)</i>	<b>8.02</b>	<b>6.91</b>
<i>Arsénico (5 mg/Kg)</i>	<b>9.14*</b>	<b>3.50</b>

\*Estadísticamente significativo , (ANOVA  $p < 0.05$ ;  $F = 3.06$ ).

**Tabla 9.** Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en riñón de ratón hembra.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>% DPC (PROMEDIOS)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>
<i>Blanco Agua destilada</i>	<b>8.77</b>	<b>0.51</b>
<i>As (5mg/Kg) y flúor (2.5mg/Kg)</i>	<b>8.28</b>	<b>0.88</b>
<i>As (5mg/Kg) y Flúor (5mg/Kg)</i>	<b>9.13</b>	<b>1.80</b>
<i>Flúor( 2.5mg/Kg)</i>	<b>9.14</b>	<b>1.23</b>
<i>Flúor ( 5mg/Kg)</i>	<b>9.77</b>	<b>2.58</b>
<i>Arsénico (5 mg/Kg)</i>	<b>8.95</b>	<b>2.31</b>

\*Estadísticamente significativo, (ANOVA  $p < 0.05$ ;  $F = 0.82$ )

**Tabla 10.** Promedios de la inducción de aductos ADN-proteína en riñón de ratón macho.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>% DPC (PROMEDIOS)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>
<i>Blanco Agua destilada</i>	<b>7.21</b>	<b>2.67</b>
<i>As (5mg/Kg) y flúor (2.5mg/Kg)</i>	<b>10.41 *</b>	<b>8.12</b>
<i>As (5mg/Kg) y Flúor (5mg/Kg)</i>	<b>14.22</b>	<b>5.11</b>
<i>Flúor( 2.5mg/Kg)</i>	<b>13.35 *</b>	<b>5.41</b>
<i>Flúor ( 5mg/Kg)</i>	<b>12.32 *</b>	<b>5.41</b>
<i>Arsénico (5 mg/Kg)</i>	<b>13.12 *</b>	<b>4.44</b>

(ANOVA  $p < 0.05$ ;  $F = 2.72$ )

\*Estadísticamente significativo

## CONCLUSIONES

- 1.- El arsénico tiene la capacidad de inducir la formación de aductos ADN-Proteína en hígado y riñón de ratones machos BALB/c, a una concentración de 5.0 mg/kg.
- 2.- El flúor a una concentración de 2.5 mg/Kg y de 5.0 mg/kg tiene la capacidad de inducir en hígado de ratón BALB/c aductos ADN-Proteína, siendo la concentración de 2.5 mg/kg la que tiene un mayor efecto inductor.
- 3.-El flúor presentó bajo las condiciones experimentales empleadas una mayor capacidad inductora de DPCs en riñón que en hígado de ratones BALB/c machos.
- 4.- La administración en forma conjunta del arsénico y flúor presentan un efecto de cooperatividad para la formación de aductos en el hígado para ratones hembras y riñón para ratones machos.
- 5.-Los ratones machos presentan una mayor susceptibilidad a la formación de DPC al administrar en forma conjunta e individual los elementos en estudio.

## PERSPECTIVAS

Si tomamos en cuenta los hallazgos encontrados con respecto a la capacidad inductora de entrecruzamientos ADN-proteína por efecto de flúor y arsénico y la poca información que hay sobre el significado biológico de este daño por efectos combinados. Los aductos ADN-proteínas se han propuesto se consideren biomarcadores de efecto en zonas endémicas de nuestro país, en las que se presentan manifestaciones de toxicidad por ambos elementos. Sin embargo, es importante conocer los mecanismos biológicos involucrados en su formación, sus características, los aminoácidos y bases involucradas lo que permitiría caracterizar este tipo de daño celular.

Además es importante dilucidar las consecuencias que pudieran tener los aductos ADN-proteína ya que se puede comprometer fenómenos celulares indispensables en el organismo como la duplicación, transcripción y reparación del ADN al interrumpir la secuencia normal de la doble hélice de nucleótidos además de afectar considerablemente la función y estructura de proteínas que se unen fuertemente al ADN durante la formación de estos aductos y que se han visto asociados con la generación de ciertos padecimientos en el humano, tal es el caso del cáncer de mama (Wang y cols., 2002).

Considero que de acuerdo a los hallazgos en este trabajo sería necesario desarrollar estrategias para conocer el proceso por el cual se generan y se procesan este tipo de lesiones, para asociarlas a marcadores de riesgo carcinógeno como son aberraciones cromosómicas, los micronúcleos entre otros.

Sabemos que el estudio de la capacidad inductora de DPC por agentes xenobióticos después de una exposición así como el conocer algunas características relacionadas con su naturaleza, son importantes en virtud de que los conocimientos al respecto son limitados.

Además de que reconocemos que el estudio de la capacidad inductora de DPC *in vitro* e *in vivo* por agentes xenobióticos tras su exposición así como elucidación de algunas características relacionadas con su naturaleza, son investigaciones importantes, en virtud de que los conocimientos al respecto son limitados.

## REFERENCIAS

- Aposhian H.V., 1989, Biochemical Toxicology of Arsenic In: Hodgson, E., Bend, J. R., Philpot, R.M., (Ed.), Reviews in Biochemical Toxicology Esvier, New York. P.p. 265-299.
- Arteaga S, 2003, "Estudio de la capacidad inductora in vivo de aductos AND- proteínas por efecto del Arsénico"., Tesis de licenciatura QFB.,Lab. Toxicología Célular, FESC 1 UNAM.p.p 38-58
- ATSDR (Agency for toxic Substances and disease Registry). 1999, Toxicological profile for fluorides, Hidrogen Fluoride and Fluorine;U.S. Public Health Service. Atlanta.
- Berg, N.A. 1985, Poly (ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. Radiat. Res. 101, 4-15.
- Byron W R, Bierbower G W, Brouwer J B 1967, Patological changes in rats and dogs from two-year feeding of sodium arsenite or sodium arsenate. Toxicol. Appl. Pharmacol. 10:132-147.
- Calderon J, Machado Blenda, Diaz Barriga. 2000, Influencia of flúoride Exposure on Reaction Time and Visuospacial Organization in childre. Epidemiology, , 11, (4). Suplemento 153
- Capary, W.J., Myhr, B., Bowers., L., McGregor, D., Riach, C., Brown, A., 1987, Mutagenic activity of fluorides in mouse lymphoma cells. Mut. Res. 187,165-180
- Casanova M, 1994, DNA-protein crosslinks and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. Fundam. Appl. Toxicol. 23:525-536.
- Castro B.V., 2003, "Inducción de aductos ADN-proteínas en rebanadas de hígado de ratón por efecto del Arsénico" Tesis de licenciatura QFB, Lab. Toxicología Celular FESC 1 UNAM
- Cebrian, M.E., Albores, A., Aguilar, M., Blakely, E., 1983. Choronic arsenic poisoning in the north of Mexico. Human. Toxicol. 2, 121-133.
- Cooper C, Wickham Cac, Barker D Jr, Jacobsem SJ, Water fluoridation and hip fracture. JAMA 1991;266:513-514
- Costa M., Zhitkovich A. and Toniolo P 1993, DNA-protein cross-links produce in Welders: Molecular implications. Cancer Research. 53:460-463

- Costa, Max, Zhitkovich Anatoly and Toniolo Paolo 1993, DNA-protein Crosslink in Welders: Molecular Implications; Reserch. No. 653, pp 460-463.
- Counts J.L., and Goodman J.I. 1995, Alterations in DNA methylations may play a variety of roles in carcinogenesis Cells. 86:13-15.
- Crane, R:K., Lipmann, R., 1953. The effect of arsenate on aerobic phosphorylation. J. Biol. Chem. 201, 235-243
- Chen C J, Chen C W, Wu M M, Kuo T L, 1992, Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. Brit. J. Cancer 66:888-892
- Kram D; Edward L. Schneider. 1978, The effects of high and low fluoride diets on the frequencies of sister chromatid exchanges. Mutation Research 5751-55
- Del Razo. L.M., Corona J.C., Albore V.G., Cebrian M.E., Environmental Pollution, 1993 80:91
- Delnomddieu, M., Basti, M:M., Stiblo, M., Otvos, J. D., Thomas, D:J., 1994a. Complexation of arsenic species in rabbit erythrocytes. Chem. Res. Toxicol. 7, 621-627.
- Delnomdedieu M., Bast M.M., Otvos J. D., Thomas D.J., 1993. Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: a model of interaction. Chem. Res. Toxicol. 6, 598-602
- Demos L. L., Kazda H., Cicuttini FM., 2001, Water fluoridation, Osteoporosis, fractures- recent developments. Aust Dent J; 46: 80-87.
- Dixon, H:B:F., 1997. The biochemical action of arsonic acids especially as phosphate analogues. Adv. Inorg. Chem 44, 191-227.
- Duxbury AJ, Leach FN, Duxbury JT, 1992, Acute fluoride toxicity. Br Dent J;153:64-66
- Eastmann RP, Allison NB Pashley DH, . 1981, Histologic and scanning study of gastric mucosa following fluoride application. J Dent Res;60:502(596 abs).
- Eguchi N., Kuroda K., Endo G., 1997. Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 141-145.
- EHC (Environmental Health Criteria). 1981. Environmental Health Criteria 19, World Health Organization, Geneva. p.p. 13-24
- Ekstrand J, Koch G. 1981, Pharmacokinetics of fluoride gels in children and adults. Caries Res;15:213-220.
- Endo G., Kuroda K., Okamoto A., Hiriguchi S., 1992. Dimethylarsenic acid induces tetraploids in chinese hamster cells. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48, 131-137.

- EPA (Environmental Protection Agency). 1988, Special Report on ingested inorganic arsenic. S Cancer, Nutritional Essentiality. July EPA Report#EPA 1625/3-87/013,Risk Assessment Forum, Washington, D.C.
- EPA, 1988 Special Report on Ingested Inorganic Arsenic. Skin Cancer, Nutritional Essentiality, US Environmental Protection Agency, EPA/625/3-87/-13.
- ERG, 1997. Report on the Expert Panel on Arsenic Carcinogenicity: Review and Workshop, Eastern Research Group, Inc., Lexington, MA.
- Escárcega R. L., 2004, "Estudio de los efectos tóxicos de arsénico y flúor sobre la formación de aductos ADN-proteínas en el sistema de cultivos de cortes de hígado de ratón BALB/c". Tesis de licenciatura QFB, lab Toxicología Celular FESC 1 UNAM
- Farley Jr, Wrgendal JE, Smith L. 1987 Fluoride therapy for osteoporosis: characterization of the eskeletal response by serial measurements of serum alkaline phosphatase activity. *Metabolism*;36:211-218.
- Fluorine and Fluorides, Environmental Health Criteria 36, IPCS International Programme on Chemical Safety, WHO, 1984. The WHO guideline values for fluoride indrinking water were reevaluated in 1996, whithout change, and the issue is currently under further review.
- Friberg L, Nordberg G, Vouk V B. 1979, Handbook on the toxicology of metals (Eds.). Esevier/North-Holland, Amsterdam, pp 239-313
- Geofrey Nochimson, MD, Consulting staff, Department of Emergency Medicine, Sentara Hamptom General Hospital
- Gresser, M:J., 1981. ADP-arsenato. *J. Biol. Chem.* 256, 5981-5983.
- Groering P.L.,Aposhian H.V., Mass M.J., Cebrian M.,1999, The enigma of arsenic carsinogenesis: Role of metabolism. *Toxicological Sciences* 49:5-14
- Grube, K., Kuper J.H., Burcke A. 1991, Direct stimulation of poly (ADP-ribosa) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers. *Anal. Biochem.* 193, 236-239.
- Guan, ZZ, Wang YN, Xiao KQ, Dai DY, Chen. 1998 Influence of chronic fluorosis on membrana lipids in rat brain. *Neurotoxicol. Teratol*, 20(5): 537-542.
- H Onishi. Arsenic in : K: H: Wedepohl 1969 (Ed). *Handbook of Geochemistry.* Springer-Verlag. New York. Vol.II-2 Chapter 33.

- Hayaashi, N., Tutsui, T., 1993. Cell cycle dependence of cytotoxicity and clastogenicity induced by treatment of synchronized human diploid fibroblast with sodium fluoride. *Mut. Res.* 290, 293-302
- Hedlund LR, Gallagher JC. 1989 Increased incidence of hip fracture in osteoporotic women treated with sodium fluoride. *J Bone Min Res*;4:223-225.
- Helgeland, K., Leirsker, J., 1976. pH and citotoxicity of fluoride in an animal cell culture system. *Scand. J. Dent. Res.* 84, 37-45.
- Hescot P., 2003. "El Flúor", 3er Congreso Latinoamericano . Buenos Aires , Argentina.
- Hindmarsh JT., R:F- Mc Curdy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci* 23, 1986, 315
- Hirano, S., Ando M., 1997. Fluoride mediates apoptosis in osteosarcoma UMR 106 and its cytotoxicity depends on th pH *Arch. Toxicol.* 72, 52-58
- Holland, R J., 1980. Cytotoxicity of fluoride. *Acta Odontol. Sacand.* 38, 69-79
- Hu, Y., Su, L., Snow, E. T., 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* 408, 203-218.
- Hughes Michael F. 1994. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133(2002)1-16
- Hughes, M. F. , Del Razo, L M., and Kenyon, E. M. 2000. Dose- dependent effects on tissue distribution and metabolism of dimethylarsinic acid in th mouse after intravenous administration. *Toxicology* 143, 155-166
- Hunter, J and Karin M. 1992. The of transcription by phosphorylation cell. 70: 375-387.
- Jha A.N., Nodit M., Nilsson R., Natarajan A. T., 1992. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat. Res.* 284, 215-221
- Kawaguchi, K. , Oku N., Rin , K Yamaka, K., and Okada, S 1996, Dimethylarsenics reveal DNA damage induce by superoxide anion radical. *Biol. Pharm. Bull.* 19,551-553
- Kenney, L:J., Kaplan, J.H., 1988. Arsenate substitutes for phosphate in th human red cell sodium pump and anion exchanger. *J. Biol. Chem.* 263, 7954-7960.
- Kochhar, T:S., Howard, W., Hoffman, S., Brammer-Carleton, L., 1996 . Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chorosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cell *Toxicol. Lett.* 84, 37-42.
- Koplín M., 2001, *Toxicology*. The University of Arizona.

- Lagunas , R., 1980. Sugar-arsenate esters: thermodynamics and biochemical behavior. Arch. Biochem. Biophys. 205, 67-75.
- Lee T.C., Huang R.Y., Jan K.Y., 1985b. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity , clastogenicity and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. Mut. Res. 148, 83-89.
- Lee, T.C., Tanaka, N., Lamb, P.W., Gilmer, T.M., Barrett, J.C., 1988. Induction of gene amplification by arsenic. Science 241, 79-81
- Lee-Feldstein, A., 1983. Arsenic and respiratory cancer in human: follow-up of copper smelter employees in Montana. J. Natl. Cancer Inst. 70, 601-609.
- Lee-Feldstein, A., 1986. Cumulative exposure to arsenic and its relationship to respiratory cancer among copper smelter employees. J. Occup. Med. 28, 296-302.
- Libanati C., Lau W., Baylink D. Fluoride therapy for osteoporosis. In Osteoporosis. In Marcus R., Feldman D., Lindsay R. 1996 San Diego, Academic Press 1259-1278.
- Lin, S., Cullen, W R., Thomas, D.J., 1999. Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. Chem. Res. Toxicol. 12, 924-930.
- Lindsay R. Fluoride and bone- quantity vs. quality. 1990 N. Engl J Med;322:845-846.
- Liu J., Kaddis Ka M.B., Liu Y Q.W., Waalkes M.P., 2001, Stress related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. Toxicol. Sci. 61: 314-320.
- Loffredo C. A., Aposhian, V.A., Cebrian, E.M., Yamauchi, H., Silbergeld, K. E., 2003, Variability in human metabolism of arsenic. Environ. Res. 92: 85-91.
- Mandal, B.K., Kazuo T. Suzuki Arsenic round the world: a review, 2002, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Talanta 58 201-235
- Mass M.J and Wang ,1997, Arsenic alters methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: A model for a mechanism of carcinogenesis . Mutat. Res. 386, 263-277.
- Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas , D.J., Kligerman, A.D., 2001, Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. Chem. Res. Toxicol. 14, 355-361.
- Messer H.H., Ophaug RH; Influence of gastric acidity on fluoride absorption in rats. 1993, J Dent Res, 72 (3): 619-622.

- Minko Irina G y cols, 2001, Incision of DNA-protein cross-links by UVrABC nuclease suggest a potential repair pathway involving nucleotide excision repair PNAS. 99:1905-1909.
- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C: L., 1997, Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat Res.* 386,279-290
- Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ, Neurotoxicity of sodium fluoride in rats, *Neurotoxicology Teratology*, 1995 March, 17(2):169-177
- Navgi S:M., Vaishnavi C., Singh H., 1994, Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates, in: J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*: John Wiley and Sons. Inc. New York. p.p.55-91.
- Never, B. and Werner, D. 1985, Screening of isolated DNA for sequences released from anchorage sites in nuclear matrix *J. Mol. Biol.* 181:15-25.
- Nkano, M., Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R., and Fukushima, S , 1992. Preferential increase of heterochromatin in venular endothelium of lung in mice after administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics. *Carcinogenesis* 13, 391-393
- NRC, 1999. *Arsenic in Drinking Water*, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
- NRC, 2001. *Arsenic in Drinking Water, 2001 Update*, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
- Ochi, T., Nakajima, F., Sakurai, T., Kaise T., and Oya-Ohta, Y, 1996, Dimethylarsinic acid causes apoptosis in HL-60 cells via interaction with glutathione. *Arch.* 70, 815-821
- Okui T., Fujiwara Y., 1986. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the comutagenic effect in V79 chinese hamster cell. *Mutat Res.* 172, 69-76
- Oya-Ohta, Y., Kaise, T., and Ochi, T, 1996, Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblast by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. *Mutat. Res.* 357, 123-129
- Position of the American Dietetic Association: 2001, The impact of fluoride on health. *J Am Diet Assoc*; 10: 126 -132.

- Priago J.F. 2002, Control biológico de la exposición a contaminantes químicos en higiene industrial. Documento del Instituto de Seguridad e Higiene en el trabajo Revista No. 18, pp.4-15.
- Que Hee S:S. Biological Monitoring en : Di Nardi S:R. 1972, The occupational Environment. Its evaluation and control. Fairfax, Virginia, Ed. AIHA Press,1997.
- Raie RM., 1996 Ecotoxicol. Environ. Safety 35:248.
- Ramirez, P;Del Razo, L M;Gutierrez-Ruiz M C and Gonsebatt, M.E, 2000,Arsenite induces DNA-Protein crosslinks and citokeratin expression en the in the WRL-68 human hepatic cell line. Carcinogenesis, vol. 21 no. 4 pp. 701-706,
- Redd JD, Smy Jr. 1980 The effects of sodiu fluoride on gastric acid and electrolyte output in the amaesthetized cat. J Physiol;301:39-48.
- Resch H, Libatani C, Farley SM , 1993, Evidence that fluoride therapy increases trabecular bone density in a peripheral skeletal site. J.Clin. Endoc. Metab.;76:1622-1624.
- Rin, K., Kawaguchi, K., Yamanaka, K., Tezuka, M., Oky N and Okada S, 1995, DNA-strand breaks induced by dimethylarsinic acid, a metabgolite of inorganic arsenics, are strongly enhanced by superoxide anion radicals. Biol. Pharm. Bull 18, 45-48
- Riordan P. J. 1992, Dental fluorosis and fluoride exposure from various sorces. J Dent Res;71:612(774 abs).
- Roosman T.G., Stone D., Molins M., Troll W., 1980. Absence of arsenite mutagenicity in E. Coli and Chinese hamster cells. Environ. Mutagen. 2, 307-314.
- Rosen Barry. 2002, Biochemistry of Arsenic Detoxification. FEBS Letters. 120. 209-219.
- Rubenstein Lk, Avent MA. 1987, Frecuency of indeseirable side effect following professionalley applied topical fluoride. J Dent Child;54:245-247.
- Rzeuski R.D., Chulubek and Machoy Z, 1998, Interactions Between Fluoride and Biological Free Radical Reactions Fluoride. 31 (1), pp. 43-45
- Navgi S.M., C. Vaishnavi et al. Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates in : J.O
- Sakurai, T., Kaise, T., and Kavlock, R.J. 1998, Inorganic and methylated arsenic compouds induce cell death in murine macrophage via different mechanism. Chem. Res.Toxicol. 11, 273-283
- Smith H. A., Arroyo, A. P., Mazumder, D. N., Kosnett. M.J., Hernandez, A.L., Breesis, M., Smith, M.M., Moore, L.E., 2000, Arsenic-induced skin lesions among A tacameno people in

northern Chile despite good nutrition and centuries of exposure. *Environ. Health. Perspect* 108:618-620.

- Styblo, M., Serves S. V., Cullen W.R., *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10:27.
- Tang, S. *Acta Sci. Circumstantione*, 1987 7:245
- Tezuka. M., Hanioka K., Yamanaka K., Okada S., 1993. Gene damage induced in human alveolar type II (L-132) cells by exposure to dimethylarsenic acid. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 191, 1198-1183.
- Tsutsui, T., Suzuki, N., Ohmori, M., Maizumi, H., 1984. Cytotoxicity, chromosome aberrations and unscheduled DNA synthesis in cultured human diploid fibroblast induced by sodium fluoride. *Mut. Res.*, 139, 193-198
- Vahter, M., Marafante, E., and Dencker, L. 1984, Tissue distributin and retention of As-dimethylarsinic acid in mice and rat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 259-264.
- Vega L., M. Styblo. R. Patterson W. Cullen c. Wang. D. *Germolec.* 2001, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172:225
- Wedrychowsky, A., Schimdt, W.N., Hnilica, L.S. 1986, DNA-Protein crosslinking by heavy metals in Novikoff hematoma *Arch. Biochem. Biophys.* 251:397-402
- Werfel u., Largen V.A., Erickhoff L., 1998 Elevated DNA single-strand breakage frecuencias in lymphocytes of welders exponed to chromium and niguél, *Carcinogenesis.* Vol. 19, No.3 p.p. 413-418.
- Wetxet W.E., *Fluorosis dental por administración repetida de fluoruros* 1991, *Quinteessence* (ed. Esp.); 4(5): 267-271.
- Whitacres R.W., Cos. Pearse, *Arsenic and the Enviroment*, *Mineral Industries Bulletin.* Colorado, School of Mines, p.1
- Whitford GM, *The phisiologycal and toxicological characteristics of fluoride.* 1990, *J Dent Res* 69 (Spec Iss):539-549
- Whitford GM, Pashley DH. Dirksen TR. 1982, Gastric acidity and plasma fluoride levels., *J Dent Res*; 61(Sp Iss):29(abs 1017).
- Whitford GM, Pashley DH. 1984, Fluoride absortion: the influence of gastric acidity *Calcif Tissue Int*;36:302-307.

- Wiencke, J.K., Yager J.W., 1991, Specificity of arsenite in potentiating cytogenetic damage induced by the DNA crosslinking agent diepoxybutane. *Environmental Mol. Mutagen.* 19, :195-200.
- Wiley and Sons, 1994 *Arsenic in the environment Part II: Human Health and Ecosystem Effects* John Inc. New York (Ed), pp.55-91
- Wright John., 2003. *Environmental Chemistry.*
- Wyatt. C. Fiambres C, Romo L, Méndez O Grijalva L 1998, Incidence of heavy metal contamination in water supplies in northern Mexico. *Environ. Res.* 76:114-119.
- Yamanaka, Hoshino, M., Okamoto, M., Sawamura, R., Hasegawa, A., Okada, S., 1990. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for major part likely due to its peroxy radical. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168-58-64.
- Yamanaka, K., Hasegawa, A., Sawamura, R., Okada, S., 1989, Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem. Biophys. Res.-. Commun.* 165, 43-50.
- Yamanaka, K., Hayashi, H., Kato, K Hasegawa, A., Oku N., and Okada, S, 1997, DNA single-strand breaks in L-132 cells resulting from inhibition of repair polymerization shortly after exposure to dimethylarsinic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 20, 163-167.
- Yamanaka, K., Okada, S., 1994. Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radical. *Environ. Health Perspect.* 102, 37-40.
- Yiamouyianmis. D. Burk. Fluoridation an Cancer age-dependence of cancer mortality related to artificial fluoridation , fluoride 10(1977)102-124.
- Yujian Zheng, Jiayao Wu JackC. 2002, The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicology Letters* 13377-82.
- Zheng Y, Wu. J.Wang. G., 2002, The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicology Letters* 13377-82
- Zhitkovich A, Quienvryn G., 2000, Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occur through spontaneous hydrolysis and active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis*, Col. 21 No.8 p.p.1573-1580.
- Zhitkovich, A., Costa, M., 1992, A simple sensitive assay to detect DNA-protein crosslink in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis*, 13,1485-1489

## ***Direcciones electronicas***

(<http://www.sos-arsenic.net/espanol/as-estandar.html>)

( <http://www.prodigyweb.net.mx>

( <http://www.gineconet.com>).

([http://www.sdpt.net.fluoruro\\_en\\_el\\_agua.htm](http://www.sdpt.net.fluoruro_en_el_agua.htm))

(<http://www.monografias.com> )

<http://www.ensayistas.org/critica/ecologia/diccionario/b.htm>

[www.invdes.com.mx/antteriores/ Septiembre 1999/htrn/alzheim.html](http://www.invdes.com.mx/antteriores/Septiembre1999/htrn/alzheim.html)