



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“POLIMORFISMOS DE GSTM1 Y GSTT1 RELACIONADOS CON
LA FRECUENCIA DE DAÑO CELULAR POR EXPOSICIÓN A
CONTAMINANTES AMBIENTALES EN LA POBLACIÓN DE
TLAXCALA Y PUEBLA, MÉXICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Johny César Ponce Canchihuamán

DIRECTORA DE TESIS: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a la Cooperación Técnica Belga, por el apoyo financiero otorgado para mi formación con lo cual me ha permitido realizar una más de mis metas en mi vida profesional y personal.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Regina Montero, Dra. Sandra Gómez y Dr. Rafael Camacho; así, como a los miembros del jurado para la obtención del grado: Dra. Sara Frías, Dra. Regina Montero, Dra. Sandra Gómez, Dra. Patricia Ramos y Dr. Rafael Camacho. Gracias por compartir sus conocimientos y por los valiosos aportes para la tesis.

A todos mis familiares que de alguna u otra manera me apoyaron a realizar esta nueva etapa de mi formación profesional y personal. Gracias por todo.

A la Dra. Regina Montero. Gracias por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo.

Al Técnico Académico Luís Serrano por su apoyo en la evaluación de daño celular y ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

Al Biol. Antonio Araujo por su apoyo en las técnicas moleculares del presente trabajo.

A mis amigos del posgrado y laboratorio, por su apoyo para el presente trabajo y por todos los momentos compartidos durante estos dos años.

A los pobladores de las comunidades aledañas al río Atoyac, quienes con su participación permitieron que se desarrolle el presente trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de ser parte de la historia presente.

A mis padres amados:

Victoria y Carlos, por estar siempre conmigo en los momentos difíciles, así como por el gran amor, comprensión, cariño y buenos ejemplos que siempre recibo.

Gracias por todo el apoyo, consejos y por influir determinantemente en mi vida.

A mis hermanos tan queridos:

Juana, Mangloria, Agripino, María, Oscar, Roberto y Percy. Gracias por estar siempre al pendiente de mi sendero, por sus rezos y deseos. Por su apoyo en la realización de mis metas y porque siempre están atentos a lo que yo realizo en mi vida.

A mis cuñadas y muy especialmente a mis ahijados, sobrinos y nietos, quienes siempre son un aliciente para seguir adelante.

A mis tíos y primos, por el apoyo que me brindan.

A mis queridos amigos y compañeros de laboratorio, por su agradable compañía y apoyo.

A mis grandes amigos y confidentes: quienes siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, que siempre me estimularon a seguir adelante. Gracias por la oportunidad de tener su amistad.

A todas las personas que me olvidé mencionar.

TABLA DE CONTENIDOS.	Página
◆ Resumen	1
◆ Introducción	5
◆ Marco teórico	
◇ Biomarcadores	7
◇ Metabolismo	8
◇ La enzima Glutación S-transferasa (GST)	9
◇ Polimorfismo de la Glutación S-transferasa (GST)	11
◇ Sistema de Micronúcleos	15
◆ Antecedentes	21
◆ Objetivos	28
◆ Materiales y Métodos	
◇ Diseño de Investigación	29
◇ Muestra	29
◇ Instrumentos	31
◇ Trabajo de campo	36
◇ Limitaciones	38
◇ Aspectos Éticos y Estadísticos	38
◆ Resultados	40
◇ Perfil de la población, hábitos y estado de salud	40
◇ Antecedentes de cáncer en la familia	42
◇ Manejo del agua	43

◇ Actividad y posible exposición a los productos químicos	44
◇ Datos de los donadores de sangre	47
◇ Variables predictoras para parámetros de genotoxicidad	48
◇ Biomarcador de daño celular respecto a la actividad y región	51
◇ Polimorfismos y biomarcador de daño celular	51
◆ Discusión	53
◆ Conclusiones	67
◆ Propuestas	68
◆ Referencias Bibliográficas	69

RESUMEN:

Introducción: El cambio de uso de los campos agrícolas a las actividades industriales ha creado áreas donde se compite por las fuentes de agua; lo que genera áreas contaminadas que conllevan a un problema de salud pública, repercutiendo negativamente en las poblaciones, particularmente en las mujeres embarazadas y los niños. Las fuentes de agua como los ríos Atoyac y Xochiac presentan compuestos orgánicos volátiles como cloroformo, cloruro de metileno y tolueno, producto de las descargas industriales. Estos compuestos dañan la salud y no son considerados en la normatividad ambiental de México. Por lo anterior, el estudio evalúa los riesgos a la salud de la población en zonas aledañas a estos ríos. Asimismo, determina los polimorfismos de las enzimas glutatión S-transferasa mu1 (GSTM1) y theta1 (GSTT1) y su relación con la frecuencia de daño celular en linfocitos de sangre periférica.

Metodología: El estudio fue transversal de corte prospectivo. Incluyó personas de las comunidades en la zona limítrofe de Tlaxcala y Puebla de acuerdo a criterios de inclusión predeterminados. En la primera etapa, se identificaron los riesgos a la salud mediante una encuesta epidemiológico ambiental que investiga la historia ocupacional y familiar, antecedentes de cáncer y hábitos personales; y se entrevistó a una muestra no probabilística en 11 comunidades. En la segunda etapa, se tomó una muestra sanguínea para determinar los polimorfismos de las enzimas GSTM1 y GSTT1, y la frecuencia de daño celular mediante el sistema de micronúcleos. Los datos se analizaron en el programa SPSS, utilizando pruebas de correlación, regresión y ANOVA con una $p < 0.05$.

Resultados: Se encontraron tres clases de riesgos a la salud: la exposición ocupacional a productos químicos tóxicos y carcinógenos en la industria petroquímica, lavanderías y en la agricultura; la exposición ambiental a los compuestos orgánicos volátiles provenientes de las descargas industriales que llegan a los ríos Atoyac y Xochiac y al sistema de alcantarillado; y por último, el estilo de vida individual (fumar, beber y un índice de masa corporal elevado).

Los evaluados de las regiones 1 y 2 presentaron la mayor frecuencia de células con 1 micronúcleo (MN), con más de 1 MN y con 1 gemación nuclear (CHB); y los hombres que viven en la región 2 presentaron las frecuencias más altas de puentes nucleoplásmicos (NPB). El 57% y el 9.5% de los evaluados presentaron los polimorfismos de GSTM1 nulo y de GSTT1 nulo respectivamente. Las personas con polimorfismo de GSTT1 nulo mostraron asociación con la frecuencia total de MN, con las células con 1 MN y las NPB.

Conclusiones: El daño genotóxico se distribuyó de manera diferente en las regiones estudiadas, siendo las más afectadas aquéllas que estaban cerca a los ríos Atoyac y Xochiac, lo cual indicaría un efecto probable a la exposición de los contaminantes llevados por estos ríos que cruzan a través de la zona de estudio.

Palabras claves: Contaminación ambiental, polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, daño celular, micronúcleos.

ABSTRACT

Introduction: The change in the use of agricultural fields to industrial activities has created areas that are competing for the water sources; this generates polluted areas that lead to a problem of public health, rebounding negatively in the populations, particularly in the pregnant women and the children. The sources of water as the rivers Atoyac and Xochiac show volatile organic compound as chloroform, methylene chloride and toluene, product of the industrial discharges. These compounds damage the health and they are not considered in the environmental normativity of Mexico. For the therefore, this study evaluates the risks to the population's health in areas close to these rivers. Also, it determines the polymorphisms of the enzymes glutathione S-transferase mu1 (GSTM1) and theta1 (GSTT1) and their relationship with the frequency of cellular damage in peripheral blood lymphocytes.

Methodology: The study was cross-sectional of prospective court. It included people of the communities in the bordering area of Tlaxcala and Puebla according to predetermined inclusion approaches. In a first stage, the risks were identified for the population's health by means of an environmental epidemiology survey that research the occupational and family history, cancer antecedents and personal habits, and interviewed to a sample non probabilistic in 11 communities. In the second stage, took a blood sample to determine the polymorphisms of the enzymes GSTM1 and GSTT1 and the frequency of cellular damage by the micronucleus assay. The data were analyzed in the program SPSS, using correlation, regression and ANOVA tests with a $p < 0.05$.

Results: Three classes of risks to the health were determined: the occupational exposure to toxic and carcinogen chemical products of the petrochemical industry, laundries and the agriculture; the environmental exposure to the volatile organic compounds of the industrial discharges that arrived at the rivers Atoyac and Xochiac and the sewer system; and finally, the individual lifestyle (smoking, drinking and high body mass index).

People evaluated from the regions 1 and 2 presented the highest frequency of cells with 1 micronucleus (MN), with more than 1 MN and with 1 chromatin bud (CHB); and the men living in the region 2 presented the highest frequencies of nucleoplasmic bridges (NPB). The 57% and 9.5% of those evaluated presented polymorphisms of null GSTM1 and null GSTT1 respectively. People with polymorphisms of null GSTT1 showed association with the total frequency of MN, and cells with 1 MN and NPB.

Conclusions: The genotoxic damage were distributed in a different way within the studied regions, being the most affected those ones that were closer to the rivers Atoyac and Xochiac, that could indicate a probable effect to the exposure of the pollutants present in these rivers that cross through the area of study.

Key words: Environmental pollution, Polymorphisms of GSTM1 and GSTT1, cellular damage, micronucleus.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

En el devenir del desarrollo tecnológico e industrial, el ser humano ha logrado satisfacer muchas necesidades básicas y no básicas para su vida; permitiéndole gozar de una vida más confortable. Sin embargo, muchos aspectos de este desarrollo repercuten negativamente –a largo plazo- en su propia salud y la de las comunidades. Una de las consecuencias negativas del desarrollo en los tiempos modernos la constituye la contaminación ambiental, un problema muy relevante a tener en cuenta porque afecta la calidad de vida de la población en general, especialmente la salud de grupos vulnerables como son las mujeres embarazadas, los niños y adultos mayores (Bruce y col, 2000; Srám, 1999).

La contaminación ambiental se considera actualmente un problema de Salud Pública. Diversos autores (Albalak y col, 1999; Woodruff y col, 1997) reportan la existencia de evidencia consistente entre la contaminación del aire y patologías del aparato respiratorio como son: la obstrucción pulmonar crónica y la infección respiratoria aguda en niños, siendo esta última, una de las más importantes causas de muerte en niños menores de 5 años en países en desarrollo (Bruce y col, 2000).

Por otra parte, estudios nacionales e internacionales señalan que la contaminación ambiental se ha incrementado a través de los años con especial impacto en países en desarrollo cuya población no se encuentra lo suficientemente sensibilizada sobre las consecuencias que esta contaminación puede ocasionar en la salud presente y futura. Varios aspectos del bienestar humano son influenciados por el ambiente, y muchas enfermedades

se pueden iniciar, promover, sostener, o estimular por factores ambientales. Por esta razón, las interacciones de la gente con su ambiente son un componente importante de la Salud Pública (Moeller, 2005).

En la mayoría de las naciones industrializadas, se están empezando a tomar medidas preventivas para disminuir los problemas de salud debido a la contaminación ambiental; sin embargo, a pesar de ello, en los EUA el 8% de la población sufre de bronquitis crónica, enfisema, asma a causa de la contaminación (Moeller, 2005).

La presente investigación describirá los riesgos por la exposición a contaminantes químicos como el cloroformo, cloruro de metileno, entre otros, en los pobladores de las comunidades aledañas al río Atoyac en Tlaxcala y Puebla. Además, se estudiarán los riesgos a la salud por dichos contaminantes y su probable asociación con la frecuencia de daño celular por el sistema de micronúcleos; así, como la relación entre los polimorfismos de las enzimas GSTM1 y GSTT1 con el daño celular.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

Los efectos negativos en la salud como producto de la exposición a un factor ambiental pueden expresarse inmediatamente o tardar años en manifestarse. De allí, la relevancia de identificar el problema antes de la aparición de los síntomas dado que los individuos estarán expuestos por largos años antes de que se manifieste el daño. En estos casos es importante evaluar los biomarcadores.

2. 1. Biomarcadores

Son indicadores biológicos que miden la magnitud de una alteración producida por la exposición a sustancias tóxicas, la cual dependerá de la naturaleza del compuesto y de la dosis de exposición (Klaassen, 1996).

En estudios epidemiológicos son importantes los biomarcadores, porque pueden ser usados como indicadores internos de exposición ambiental y pueden reflejar efectos adversos tempranos, como daño o muerte celular (Smith y col, 1993).

Los biomarcadores son una herramienta útil para evaluar el riesgo potencial de las diferentes exposiciones ambientales. Según Albertini y col (1996) se pueden clasificar en:

A. Indicadores de exposición

Se obtienen midiendo la concentración de una sustancia tóxica o sus metabolitos, estos pueden estar solos o unidos a ADN (Ácido Desoxirribonucleico, siglas en inglés: DNA),

ARN (Ácido Ribonucleico, siglas en inglés: RNA), proteínas o receptores en fluidos o tejidos corporales y productos de excreción. Entre ellos están los aductos de DNA, aductos de hemoglobina; que directamente señalan la presencia de la sustancia xenobiótica (sustancias químicas que no tienen utilidad metabólica y pueden ser tóxicos) y su interacción con una molécula crítica.

B. Indicadores de efecto

Permiten evaluar el efecto biológico como resultante de exposición. Es cualquier cambio cuali o cuantitativo predictivo de daño a la salud y que resulta de la exposición a un agente exógeno. Entre ellos, están las aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, etc.

C. Indicadores de susceptibilidad

Son los que señalan una limitación adquirida o inherente de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica. Indican incremento del riesgo en cualquier etapa del progreso de una enfermedad. Por ejemplo, se encuentran los polimorfismos metabólicos de origen genético relacionados a las familias de enzimas como citocromo P450, glutatión transferasas, entre otros.

2.2. Metabolismo

Las enzimas implicadas en el metabolismo y desintoxicación de los compuestos xenobióticos se clasifican en enzimas de fase I o de fase II. Como resultado de las diversas reacciones de oxidación catalizadas por las enzimas de la fase I, muchos productos son

transformados en intermediarios de naturaleza electrofílica, muy reactivos, capaces de atacar rápidamente a moléculas celulares nucleofílicas como proteínas y ácidos nucleicos (Fig. 1).

Existen varios sistemas de desintoxicación y eliminación que participan en la protección frente a estos agentes tóxicos, uno de los más eficientes en la eliminación de electrófilos es el del glutatión reducido (GSH) y la glutatión S-transferasa (GST) (Hayashi y col, 1992).

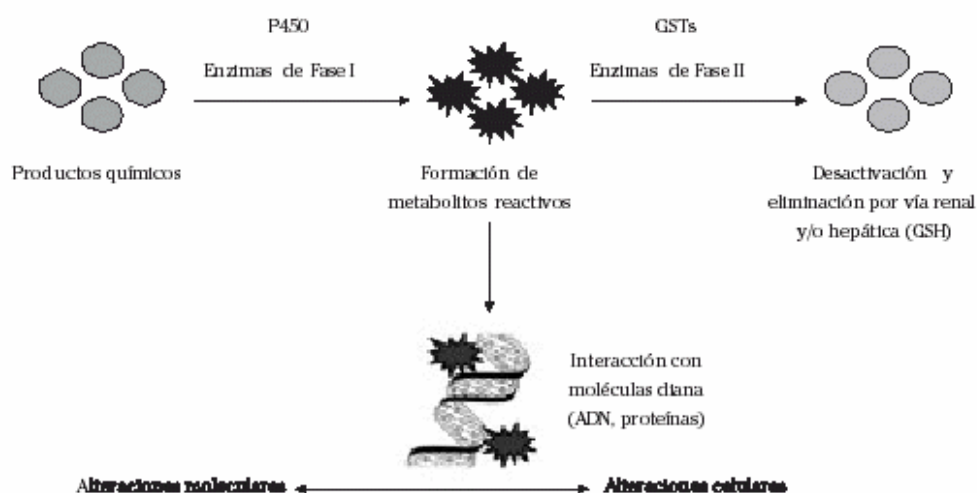


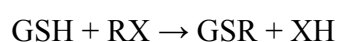
Fig 1. Metabolismo de Fase I y II (Tomado de Zalacain, 2005).

2.3. La enzima Glutatión S-transferasa (GST)

Las principales familias involucradas en el metabolismo de cancerígenos son la Citocromo P450 (CYP450) y la glutatión S-transferasa (GST) (González y col, 2004). La GST, se encarga de la desintoxicación de cancerígenos en la fase II del metabolismo, es una superfamilia de enzimas multifuncionales diméricas que conjugan el azufre de la cisteína

del glutatión reducido (GSH: glutamil-cisteína-glicina) con centros electrófilos de compuestos orgánicos hidrofóbicos que pueden ser provistos por un átomo de carbono, nitrógeno o azufre. Estos conjugados se hacen más solubles facilitando su eliminación de las células (Sheehan y col, 2001).

La reacción general que cataliza la enzima GST es:



Esta reacción es una de las primeras etapas de la vía del ácido mercaptúrico, en la cual los xenobióticos son inactivados y eliminados del organismo (Habing y col, 1974).

Las GSTs han sido descritas como vitales para el metabolismo efectivo de desintoxicación de electrófilos en una gran variedad de organismos (Hayes y Pulford, 1995). Además, estas enzimas pueden desintoxicar compuestos producidos endógenamente producto del metabolismo de Fase I; y también, pueden activar algunos compuestos como los dihalometanos (Marsh y col, 2004).

La enzima se une con alta afinidad a esteroides, bilirrubina, grupo hemo, carcinógenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y numerosos aniones orgánicos. Para lograr esto, la enzima presenta diversas isoformas, las cuales poseen el mismo peso molecular, con diferencias en su estructura primaria y por lo tanto, modificaciones en la estructura secundaria y terciaria, por lo que existen isoformas con distinta habilidad para metabolizar un sustrato en particular.

En la familia de las GSTs de mamíferos se tienen las de tipo de membrana; y también están las citosólicas y dentro de ellas son cuatro las clases principales, de interés en los humanos, denominadas alfa (GSTA), mu (GSTM), pi (GSTP) y theta (GSTT). Todas están compuestas de dos subunidades de aproximadamente 23 a 28.5 kDa. Adicionalmente, se han descrito variedades dentro de cada tipo de GSTs en GSTA (GSTA1 y GSTA2), en GSTM (GSTM1, M2, M3, M4 y M5), en GSTT (GSTT1 y GSTT2) y en GSTP (GSTPa y GSTPb) que son las más estudiadas.

2.4. Los polimorfismos genéticos de GSTs

Los polimorfismos genéticos son variantes de genes individuales que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren una frecuencia del 1% o más en la población tras múltiples generaciones.

Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan pueden ser silenciosos o proporcionar ventajas a los individuos que los poseen (Guttmacher y Collins, 2002); aunque, también es posible que influyan en el riesgo de padecer una enfermedad, denominados variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad, particularmente como consecuencia de la exposición a xenobióticos (Porta, 2003). Un ejemplo son las variantes nulas (anulan la función) que se presentan en genes que codifican enzimas glutatión S-transferasas (GSTM1 y GSTT1). Los fumadores y portadores del polimorfismo nulo podrían tener un riesgo aumentado de padecer cáncer de pulmón o de vejiga, posiblemente por ser incapaces de metabolizar los carcinógenos del tabaco (McWilliams y col, 1995; Sorensen y col, 2004; Hung y col, 2004; Falck y col, 1999);

aunque, estos hallazgos no siempre son consistentes (Benhamou y col, 2002).

Generalmente, los polimorfismos genéticos se consideran indicadores de susceptibilidad individual, particularmente aquellas que dan lugar a diferencias en el metabolismo o en la reparación del DNA, porque modulan la respuesta individual usando distintos mecanismos en la activación y desintoxicación ante la exposición a carcinógenos genotóxicos (Pavanello y Clonfero, 2000). En otras ocasiones, probablemente la mayoría de los casos, los cambios son silenciosos y no tienen repercusiones funcionales.

Sólo por medio de estudios moleculares específicos se puede poner de manifiesto si los polimorfismos son funcionales, y mediante los estudios epidemiológicos, que son fundamentales, se puede valorar si hay efectos en la salud de la población (Guttmacher y Collins, 2002; Caporaso, 2002; Tabor y col, 2002). Los polimorfismos, propiamente, pueden darse en cualquier región de un gen como se muestra en la figura 2.

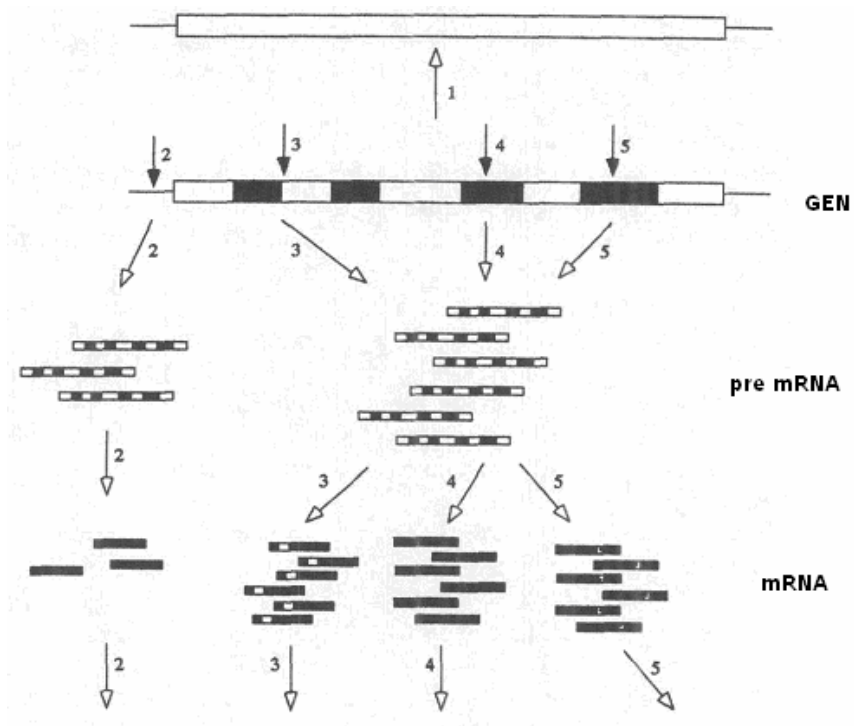


Fig 2. Mecanismos moleculares de polimorfismos de enzimas de biotransformación (Tomado de Wormhoudt, 1999). Deleción completa del gen (1), causa ausencia completa de la proteína. Mutación del promotor (2), causa menor proteína. Mutación del límite del exón-intrón (3), causa una proteína incompleta o inactiva. Mutación en una zona no crítica del exón (4), causa una proteína con actividad alterada. Mutación en una zona crítica para la actividad enzimática (5), causa una proteína sin actividad.

En la familia de las GSTs se han descrito polimorfismos en las clases GSTM1, GSTT1 y GSTP1, quienes participan en la conjugación del glutatión reducido (GSH) con varias especies reactivas, como son los epóxidos y algunos sustratos clorados.

Las GSTs, están implicadas en la desintoxicación de numerosos metabolitos carcinógenos. El polimorfismo nulo de GSTM1 resulta en una menor capacidad para desintoxicar algunos carcinógenos presentes en el humo de tabaco, y el GSTT1 nulo se traduce en baja tasa de

metabolismo para el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Sreelekha y col, 2001) dando por resultado que el individuo portador de estos polimorfismos sea más susceptible a los efectos carcinogénicos de estos compuestos (Wiencke y col, 1995). En la GSTP1 se da el cambio del aminoácido isoleucina por la valina, generando la GSTPb mutante, alterando la actividad específica y la afinidad para sustratos electrófilos y se reporta asociación con el cáncer testicular y de vejiga (Harries y col, 1997).

En la clase mu (GSTM), el gen GSTM1 es objeto de una frecuente delección que lo inactiva; los homocigotos para esta delección carecen de actividad enzimática GSTM1 (genotipo nulo). Aproximadamente, el 50% de los sujetos de raza blanca y de los japoneses, y un 30% de los de raza negra tienen genotipo GSTM1 nulo (Seidegard y col, 1990; Lin y col, 1994; Kihara y col, 1995; Chen y col, 1996). La importancia de la ausencia de esta actividad enzimática radica en que la enzima GSTM1 conjuga con el glutatión reducido, y con ello inactiva al epóxido de benzo(a)pireno resultante de la acción de la enzima CYP1A1 sobre el benzo(a)pireno del humo del tabaco, así como a otros carcinógenos (Ketterer y col, 1992). Además, la enzima GSTM1 puede generar metabolitos tóxicos a partir de otros productos (Guengerich, 1994).

La clase theta de la superfamilia de la glutatión S-transferasa también presenta un polimorfismo que induce un genotipo nulo en aproximadamente 35% de la población (Warholm y col, 1995; Chen y col, 1996).

2.5. Sistema de Micronúcleos (MN)

En la división celular el material genético (DNA) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede generarse de manera errónea debido a alteraciones durante la replicación y posterior segregación cromosómica y a roturas cromosómicas (por ejemplo debido al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas) produciéndose pérdida de material cromosómico conllevando a que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando ocurre esto, el material genético que se separa queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, originando un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente al microscopio óptico (Fenech y col, 1999).

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez por Countryman y Heddle (1976), cuyo objetivo era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. En 1985, Fenech y Morley, consiguieron frenar el proceso de la división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, mediante el bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) con citocalasina-B (Cit-B). Así, la formación de MN en la anafase mitótica se muestra en el bloqueo con Cit-B y la consecuente obtención de células binucleadas, sin el cual se observarían células mononucleadas con pérdida cromosómica (Fig. 3).

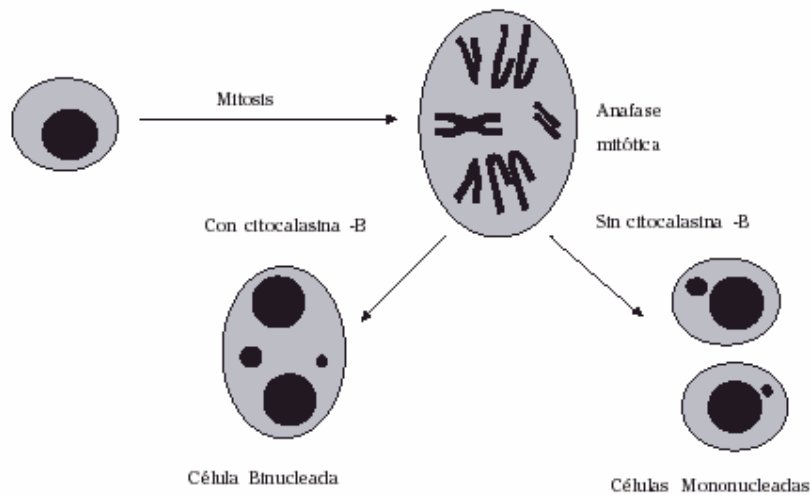


Fig 3. Formación de Micronúcleos (Tomado de Fenech, 1999).

La citocalasina-B es una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesarios para la partición celular en la telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas bloqueando la primera división debido al tiempo de cultivo (Fenech, 1993; Fenech, 2000).

Desde entonces, el sistema de MN se ha validado en numerosos estudios y está considerado como un biomarcador efectivo de daño en el DNA. Para la validación se creó un programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: HUman MicroNucleus Project), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo (<http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/>). El principal objetivo consistió en identificar

las fuentes y niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos, comparar las distintas técnicas utilizadas para definir un protocolo estándar y realizar así un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados e incluso intentar establecer una asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades como el cáncer (Fenech y col, 1999; Bonassi y col, 2001). Su utilidad fue validada con más de 100 compuestos químicos genotóxicos y carcinogénicos, usando diversos sistemas biológicos como: hepatocitos, linfocitos, mielo y eritoblastos humanos y animales tanto *in vivo* como *in vitro* (Smith y col, 1993; Heddle y col, 1991).

Simultáneamente al desarrollo de la técnica con citocalasina-B (Cit-B) se generó otra opción para determinar MN en células proliferantes utilizando Bromodeoxiuridina (BrdU), análogo de timidina, y una tinción específica con anticuerpos anti-BrdU-DNA. La BrdU es tóxica al igual que la Cit-B, pero puede emplearse una concentración muy baja para detectar a las células que la incorporaron. Esta técnica permite evaluar los mismos parámetros que se determinan con el método de Cit-B (Montero y col, 1997, 2003; Norppa y col, 1993).

A. Criterios de evaluación de MN

Se han descrito criterios para que el recuento de MN se realice de manera confiable y objetiva (Fenech, 2003; Muller y col, 1993): los MN se parecen al núcleo principal pero son más pequeños, contienen DNA o da tinción DNA-positiva, son redondos a ovals con bordes bien definidos, están en el mismo plano focal que el núcleo principal, el tamaño depende del tipo celular estudiado o agente aplicado para generarlo, y no es mayor de 1/3

del diámetro del núcleo principal. Los criterios para la evaluación de los MNs se detallan en forma resumida en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios para evaluación de Micronúcleos (Tomado de Fenech, 2003).
El diámetro oscila entre 1/16 - 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal
No refractarios
Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior
Forma similar a los núcleos de las células binucleadas
No conectados con ninguno de los núcleos de las células binucleadas
Pueden tocar los núcleos de las células binucleadas pero no solaparse con ellos.

En un mismo cultivo celular se pueden observar células con gemaciones nucleares y células con puente nucleoplásmico, que también son indicadores de daño genotóxico, también, la figura apoptótica y la necrosis, las cuales son indicadores de daño citotóxico (Fenech y col, 2002). Todos los mencionados forman parte del sistema de micronúcleos (Fig. 4).

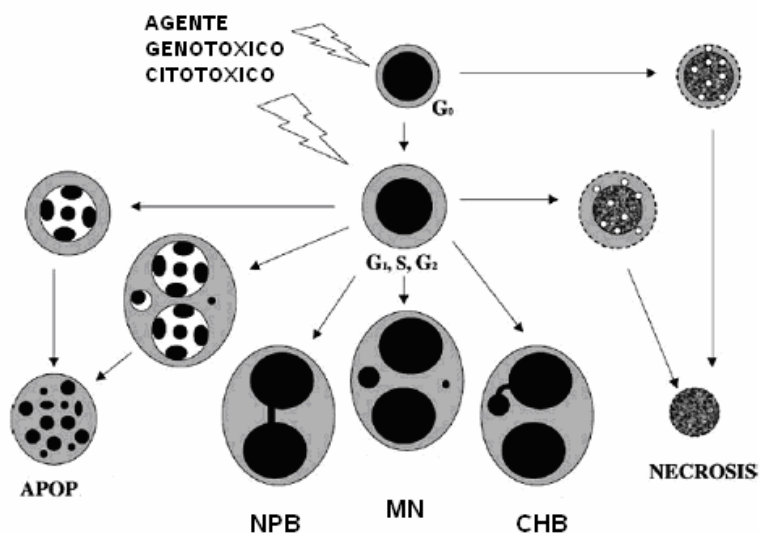


Fig 4. Sistema de Micronúcleos (Tomado de Fenech, 2003). APOP: Figura apoptótica; NPB: Célula con puente nucleoplásmico; MN: Micronúcleos; CHB: Gemación nuclear; Necrosis.

Las células con puente nucleoplásmico (NPB), proveen una medida del cambio cromosómico que no sería evaluado sólo por MN. Se asume que los NPB ocurren cuando los centrómeros de cromosomas o cromátidas dicéntricos se van a los polos opuestos de la célula en la anafase; por ende las NPB también son biomarcadores de daño genotóxico.

Las gemaciones nucleares (CHB) son otro tipo de daño genotóxico y se forman en la fase S del ciclo celular. Se expresan por exposición genotóxica y se presentaría simultáneamente a la presencia de MN.

Por otro lado, se debe tomar en cuenta las características de células en vía de apoptosis y necrosis para considerarlas en el recuento. Las células en vía de apoptosis se caracterizan por presentar cromatina condensada, en etapas tempranas de apoptosis puede manifestarse como cromatina marginal y más tarde, conforme avanza el proceso apoptótico, culmina en la fragmentación del material nuclear, quedando disperso en el citoplasma reflejándose en una tinción más oscura que la habitual. En los fenómenos necróticos, las células muestran citoplasmas pálidos por la presencia de vacuolas, daño evidente en la membrana citoplasmática con núcleos intactos en etapas tempranas de necrosis; en cambio las células en estados avanzados evidencian pérdida del citoplasma y daño irregular en la membrana nuclear con sólo una parte de la estructura nuclear intacta (Fenech, 2002).

La prueba de micronúcleos es ampliamente utilizada para evaluar daño genotóxico *in vivo* o *in vitro*, y la información obtenida puede relacionarse con mecanismos de acción implicados en pasos importantes de los procesos carcinogénicos. El daño primario en

genotoxicidad es el rompimiento cromosómico, el cual se analiza fácilmente en la forma de micronúcleos (MN). Alternativamente, un micronúcleo puede formarse de cromosomas perdidos durante la anafase debido a las alteraciones en el huso mitótico o en el cinetocoro; este evento produciría células con monosomias o con cromosomas adicionales en cualquier par cromosómico (Aardema y col, 1998).

El daño secundario a las rupturas cromosómicas pueden ser: amplificación génica, traslocaciones cromosómicas, inversiones y la inducción de apoptosis (Fenech, 2002). Este daño en el núcleo en interfase produce células anormales analizables al microscopio como: gemación nuclear (CHB), puentes nucleoplásmicos (NPB) y figuras apoptóticas (AF). En particular, los puentes nucleoplásmicos son de interés ya que se han relacionado con la pérdida de estabilidad genómica (McClintock, 1941).

CAPITULO III. ANTECEDENTES

Existen estudios realizados en los poblados de Tlaxcala y Puebla que demuestran que la contaminación ambiental se viene incrementando a través de los años, con especial daño en las comunidades cercanas a los centros industriales próximos al río Atoyac, en cuya población se estarían presentando problemas en la salud, como aumento en púrpuras trombocitopénicas, leucemias, anemias, entre otras; aunque todavía no ha quedado suficientemente esclarecida cuales serían los efectos que los contaminantes de la zona podrían ocasionar en la salud presente y futura (Centro “Fray Julián Garcés”, 2004).

La contaminación del río Atoyac y los canales de riego que se consideraron en el estudio se produce por el empleo de blanqueadores y colorantes, entre otros; que provienen de las industrias inmersas en la zona. Los pobladores de la zona refieren que en el ambiente se perciben olores penetrantes, y los canales de riego presentan cambio de color en el agua (Centro “Fray Julián Garcés”, 2004).

En la zona limítrofe de Puebla y Tlaxcala, donde se llevó acabo el estudio se detectó una situación compleja de exposición química por la transición de la actividad rural a una industrialización intensa, donde la competencia por el consumo del agua conllevó al deterioro de este recurso, debido principalmente, a la contaminación química que pone en riesgo la salud de varias comunidades. El cloroformo, cloruro de metileno, índigo, anilina y tolueno (Navarro y col, 2004) son algunos de los contaminantes encontrados en los ríos

Atoyac y Xochiac, mezclados con otros contaminantes como aceites y grasas sumado, a la materia orgánica originada en los hogares (Tabla 2).

Tabla 2. Productos tóxicos químicos orgánicos volátiles encontrados en los ríos Atoyac y Xochiac (Navarro y col, 2004).			
Sustancia Química	Características	Es un carcinógeno humano?	Niveles encontrados en los ríos
Cloruro de Metileno	No natural. Disolvente industrial, para remover pinturas y limpiar metales. Se evapora fácilmente en el aire y permanece durante 127 días. Produce mutaciones génicas e intercambio de cromátidas hermanas (ATSDR, 1997).	Grupo 2A, IARC	28.7 µg/l (20.36 – 40.96)
Cloroformo	Es usado en la producción de otros compuestos y puede formarse en el tratamiento del agua con cloro. Se evapora fácilmente en el aire y permanece por mucho tiempo. También alcanza el agua subterránea. Produce mutaciones génicas e intercambio de cromátidas hermanas (ATSDR, 1997).	Grupo 2A, IARC	11.5 µg/l (6.58 – 13.94)
Tolueno	Forma parte de la mezcla de aceite y gasolina. Ampliamente utilizado en la producción de pinturas, lacas, adhesivos y caucho. También alcanza el agua subterránea. Es clastogénico (ATSDR, 2001).	Grupo 3, IARC	13 µg/l (5.02 – 21.6)
Indigo	Polvo irritante de la piel, ojos y membranas mucosas. Por descomposición simple puede generarse anilina y ácido pícrico (ATSDR-MMG, 2005).	Grupo 3, IARC (Anilina se considera en el grupo 3, IARC)	Los niveles de Índigo no se determinaron, pero es visible en las riveras del río y en el agua (similar para anilina)

La principal preocupación por la presencia de los contaminantes encontrados en los ríos que se muestran en la tabla 2, es que son fácilmente evaporables y persisten en el ambiente alcanzando áreas habitadas cerca del río o a través de las tuberías de los sistemas de alcantarillado. Las quejas sobre los olores y el aire irritante que afectan los ojos, garganta y causan dolores de cabeza en los habitantes, son una constante entre la gente que vive en las comunidades; de hecho, las emanaciones son muy intensas e irritantes en los lugares donde se dan las descargas industriales en los ríos y sobre todo porque persisten en el aire; esto sucede en varios puntos a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac (Figura 5).

Las comunidades están distribuidas en un área de 50 hectáreas en medio del cual fluye el río Atoyac y son: Tepetitla, Villalta, San Mateo Ayecac, San Rafael Tenanyecac, Santiago Michac, Santa Justina Ecatepec, San Lucas Atoyatenco, Santa María Moyotzingo, San Baltazar Temaxcalac, Santa Ana Xalmimilulco y San Francisco Tepeyacac (Fig. 5).

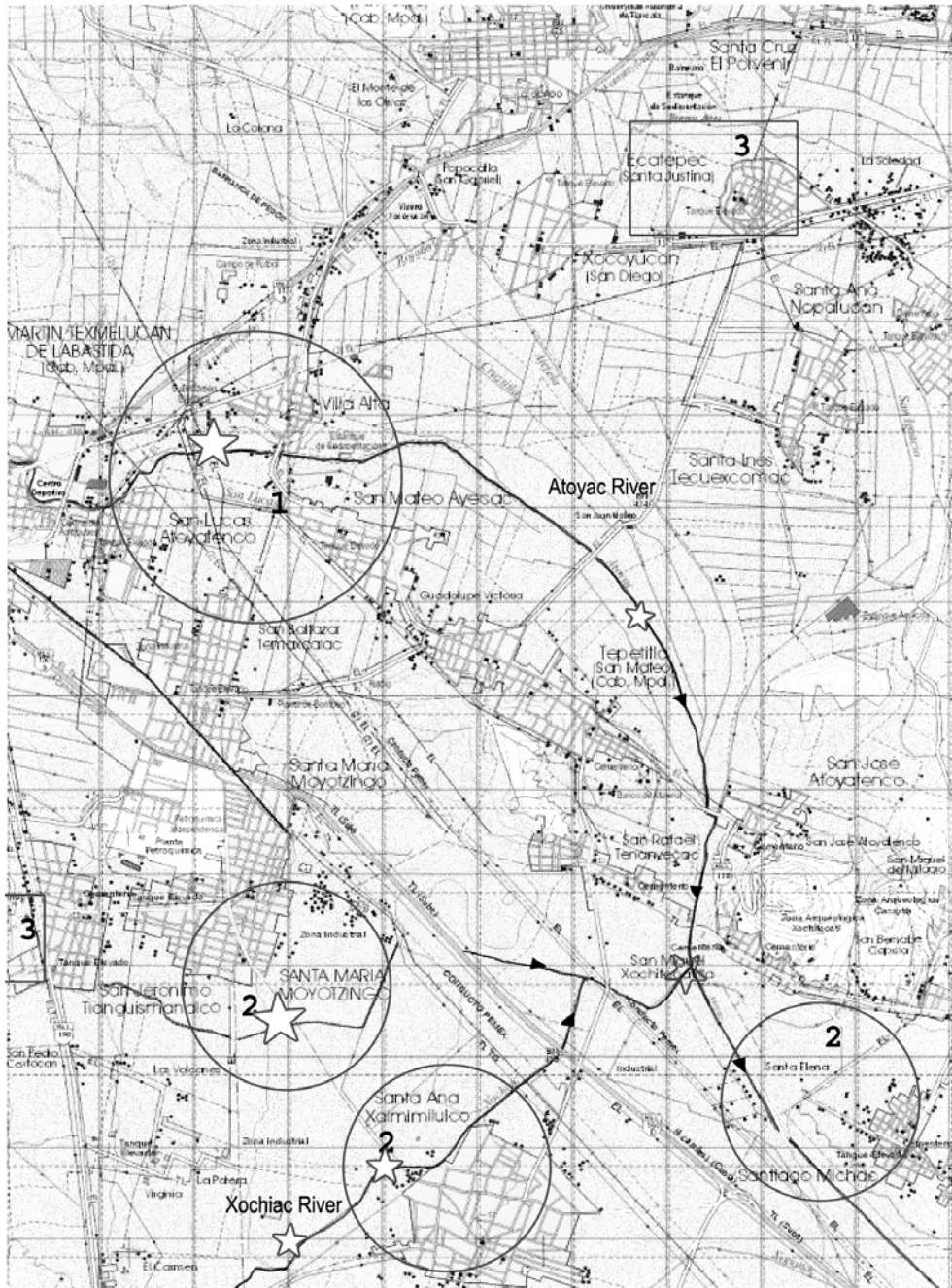


Fig. 5. Mapa de la zona de estudio. Comprende alrededor de 50 hectáreas. Las líneas gruesas representan el curso de los ríos Atoyac (Cruza la región 1 y hacia el sur la región 2) y Xochiac (Cruza la región 2). Las flechas indican el curso del flujo de los ríos. Las estrellas blancas más grandes representan descargas de la planta petroquímica, las estrellas más pequeñas muestran descargas de la industria textil y la estrella vacía denota la intersección de los ríos de Atoyac y de Xochiac. La región 3 está distante de las descargas.

Por otro lado, simultáneamente la misma población que vive en esas comunidades trabaja en las industrias de la zona, incluyendo una planta petroquímica y numerosas manufacturas de mezclilla. Las condiciones laborales también contribuyen a los riesgos a la salud, particularmente en la industria textil, donde los trabajadores son expuestos al polvo del algodón, al calor y vapores de numerosas sustancias tóxicas debido a que no cuentan con equipo de protección o ventilación adecuadas; ellos están en contacto con blanqueadores clorados, hidróxido de sodio, índigo y anilina, algunos de los cuales son clastogénicos. La anilina, está relacionada con la anemia hemolítica (ATSDR-ToxFAQs™, 2002; Rannug y col, 1992; Jongen WM, 1982; ATSDR-MMG, 2005; Bornhard y Herbold, 2005). Las condiciones de trabajo en la planta petroquímica son diferentes: el personal cuenta con equipo de protección y atención médica; sin embargo, los productos tóxicos químicos que se tratan en la planta provocan vapores y compuestos tóxicos que causan ocasionalmente malestar; el metanol se produce, mientras que el tolueno y benceno (carcinogénico, clasificación del grupo 1 IARC) (ATSDR-ToxFAQs™, 2005; NIOSH, 2005; ATSDR, 2001) se utilizan en la planta, como lo reportan los trabajadores.

Los agricultores de la zona de estudio emplean pesticidas en los campos, de los cuales los más peligrosos son el Paraquat y el 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético), ambos clastogénicos; el primero considerado como carcinógeno del grupo 1, clasificación de la IARC (CDC, 2003; EPA 2,4-D, 2006). Los pesticidas se usan de manera estacional, una o dos veces al año, y para protegerse usan guantes y botas pero no mascarillas. Además, aumenta el riesgo en los agricultores por la exposición al sol y a las aguas contaminadas de los canales de riego que provienen de los ríos Atoyac y Xochiac.

Entre los contaminantes reportados en la zona de estudio; también, se encontró dihalometanos: diclorometano (CH_2Cl_2) y dibromometano (CH_2Br_2), los cuales según estudios previos en presencia de la enzima glutatión S-transferasa theta 1 (GSTT1) forman aductos para los cuatro nucleósidos del DNA (Marsh y col, 2004), lo cual hace suponer que los portadores de la enzima GSTT1 serían más susceptibles a sufrir daño por los dihalometanos.

En el estudio de cohorte retrospectivo de Vinceti y col (2004), realizado en consumidores de agua potable que contenía trihalometanos se reportó incremento de riesgo de cáncer. El agua que consumieron los evaluados contenía alta concentración de cloroformo y trihalometanos. Las tasas de mortalidad de todos los cánceres estaban incrementadas en los varones a 1.2 (CI del 95%) y para las mujeres a 1.1 (CI del 95%). Estas tasas se refieren a la mortalidad por cáncer de estómago, de hígado, de pulmón, de próstata y de vejiga en varones; y del estómago, páncreas, pecho, ovario y leucemia en mujeres. Se encontró una asociación entre la exposición al trihalometano y el riesgo creciente de cáncer en algunos sitios; sin embargo, las estimaciones estadísticas son imprecisas, debido al número limitado de las muertes por cáncer en un sitio específico y a que no se aplicó un control para los hábitos de vida de las personas estudiadas, como el fumar.

La frecuencia del polimorfismo para GSTT1 en México no se había determinado, aunque un estudio en un grupo de mexicanos realizado en EUA reveló una frecuencia de 9.7% del genotipo GSTT1 nulo (Nelson y col, 1995). En un estudio realizado en la Ciudad de México se encontró que la frecuencia de GSTM1 nulo fue del 38% (Montero y col, 2003).

En otro llevado a cabo en la región carbonífera del Estado de Coahuila se reportó que la frecuencia de dicho polimorfismo llega hasta el 42.5% (Montero, comunicación personal). Estos reportes indican que es importante la fracción de la población que sería susceptible a los efectos deletéreos debidos a la exposición a productos tóxicos ambientales.

La tendencia de cambio de uso del suelo agrícola a una actividad industrial es de suma relevancia en la vigilancia sanitaria relacionada con los efectos que ocasionaría la contaminación ambiental en las poblaciones que habitan esas zonas, como es el caso de la zona limítrofe de Tlaxcala y Puebla donde se estableció un corredor industrial alrededor de los campos de cultivo de hortalizas.

Por otro lado, gracias a la colaboración de los pobladores de la zona mencionada, quienes radican en esa región desde hace varias generaciones, el estudio se llevó a cabo con el fin de evidenciar lo que está ocurriendo en una población como la evaluada por vivir cerca de las industrias, las cuales contribuirían al deterioro ambiental del aire, agua y suelos.

Adicionalmente, al existir pocos antecedentes de este tipo de contaminación realizados en México, los resultados de este estudio sirven como línea base referencial a futuras investigaciones en esta área. Además, se pone de relevancia el tema de la contaminación ambiental y la importancia del uso de biomarcadores de efecto temprano como son los micronúcleos, y el de susceptibilidad como son los polimorfismos metabólicos, para la estimación de riesgos a la salud en poblaciones agrícola-industriales como las de Tlaxcala y Puebla en México.

CAPITULO IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 generan en la población mayor susceptibilidad a los efectos genotóxicos de los contaminantes químicos evaluados por la frecuencia de daño celular en el sistema de micronúcleos.

OBJETIVOS:

Objetivo General

Relacionar los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 con la frecuencia de daño celular por exposición a contaminantes ambientales en la población de la zona limítrofe de Tlaxcala y Puebla, México.

Objetivos Específicos

- Determinar los genotipos para las enzimas GSTM1 y GSTT1 en la población evaluada.
- Determinar la frecuencia de micronúcleos, gemaciones nucleares, células con puente nucleoplásmico y figuras apoptóticas en linfocitos de sangre periférica en la población evaluada.
- Correlacionar los resultados del estudio de la presencia de contaminantes ambientales en el área evaluada con los biomarcadores.
- Correlacionar los resultados de los hábitos de vida con los biomarcadores.

CAPITULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló con un diseño transversal de corte prospectivo; el cual consistió en evaluar si los polimorfismos de las enzimas GSTM1 y GSTT1 generan en la población de estudio mayor susceptibilidad a los efectos genotóxicos de los contaminantes químicos evaluada por la frecuencia de daño celular en el sistema de micronúcleos.

La población de estudio estuvo constituido por los pobladores de las zonas aledañas al corredor industrial Quetzalcoatl, localizada en la región limítrofe de Tlaxcala y Puebla en México.

5.1. La muestra

En la primera como en la segunda etapa del estudio se incluyeron a los pobladores de la zona estudiada que aceptaron participar previa carta de consentimiento informado. Fue de tipo no probabilística (no aleatoria).

Para la segunda etapa se seleccionó entre la gente encuestada a donadores que cumplieron con los criterios de inclusión que se describen adelante y que habían firmado la carta de consentimiento para participar en el biomonitoreo de daño celular en linfocitos de sangre periférica. Se agrupó en tres categorías de ocupación: amas de casa, estudiantes, profesores y empleados en el comercio, que fueron considerados los menos expuestos (grupo 1); agricultores (grupo 2); trabajadores expuestos ocupacionalmente a productos tóxicos

químicos en las industrias (grupo 3) tales como la planta petroquímica, las lavanderías de mezclilla, y otras industrias que producen adhesivos, pinturas, y partes de automóviles.

Adicionalmente, se consideró un grupo de referencia (para la técnica de laboratorio empleado) en el que se incluyeron residentes de la Ciudad de México conformado principalmente por estudiantes y trabajadores administrativos de la UNAM con similar nivel socioeconómico, comparable al grupo ocupacional 1 del estudio. Esto, porque la gente menos expuesta a las sustancias; aunque, tuvieran una frecuencia más baja de daño genotóxico, existía la posibilidad de que en ellas estaría incrementado el daño genotóxico debido al ambiente.

5.2. Criterios de inclusión y exclusión para evaluar daño celular

Criterios de Inclusión:

- Residentes de manera continua no menor a un año en la zona estudiada.
- Tener entre 18 y 87 años en la actualidad.
- Aceptar participar en el estudio voluntariamente.

Criterios de Exclusión:

- Tener infección por parásitos.
- Presentar cáncer u otra enfermedad degenerativa (diabetes, entre otras).
- Tener antecedente de familiares con cáncer
- Haber estado expuesto a radiación el último mes, previo al estudio.

5.3. Instrumentos

A. Cuestionario Epidemiológico Ambiental (CEA)

Se diseñó y validó un cuestionario para identificar el riesgo potencial para la salud en la zona de estudio, y se aplicó a una muestra no probabilística en 11 comunidades donde se reportaron problemas de salud. Se incluyó en el cuestionario tópicos de salud general, historia ocupacional, antecedentes familiares de cáncer y diabetes, así como hábitos personales de dieta, consumo de tabaco y alcohol. Se registró el peso y la estatura para estimar el índice de masa corporal. También, se consideraron preguntas sobre olores, aspecto del agua y la opinión general del ambiente.

Para aplicar el cuestionario, previamente fue capacitado el personal que participó en el estudio. La investigación incluyó a 11 comunidades aledañas a los ríos Atoyac y Xochiac en la zona limítrofe de Tlaxcala y Puebla.

B. Muestra sanguínea

Las muestras de sangre fueron colectadas en jeringas Sarstedt (México); con heparina para cultivos de linfocitos y otra con EDTA para extracción de DNA; en un volumen de 3 ml para ambos casos. Se asignaron códigos a cada juego de jeringas y tubos de cultivo para cada individuo evaluado, de acuerdo al proceso de la toma de muestra sanguínea. La muestra fue almacenada en crioviales NUNC (Dinamarca).

Una persona tomaba nota de la identificación de la muestra y la clave de códigos. La sangre con heparina se conservó en un ambiente fresco durante el transporte al laboratorio para el

cultivo de linfocitos. La muestra con EDTA se mantuvo en una hielera (- 4 °C) y se transportó vía terrestre, con un tiempo entre la toma y el arribo al laboratorio de 4 a 6 horas. Las muestras con EDTA fueron separadas en dos alícuotas y almacenadas en nitrógeno líquido (- 196 °C), las cuales fueron usadas para la extracción del DNA. Las muestras de sangre se colectaron en tres visitas a la zona de estudio. Las muestras de sangre de los donadores de la Ciudad de México se tomaron, codificaron y analizaron durante el mismo tiempo del proceso de las otras muestras.

b.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA de cada muestra sanguínea se utilizó el “kit de BIO-RAD AquaPure Genomic” y se siguió el método de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluyendo el tratamiento de RNasa.

b.2. Determinación de los genotipos de GSTM1 y GSTT1

Se tomó la muestra sanguínea con EDTA para determinar los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1. Para GSTM1 se usó el método descrito por Hirvonen y col (1993) y para GSTT1 se empleó el método descrito por Bell y Pittman (2000).

Genotipo GSTM1. Se usaron los oligonucleótidos para amplificar los exones 4 y 5 del gen GSTM1, con un oligonucleótido específico para GSTM4 el cual siempre está presente, como testigo para la reacción de amplificación. Las secuencias fueron: GSTM1FW y GSTM4FW, 5'- CGC CAT CTT GTG CTA CAT TGC CCG; GSTM4RV, 5'- ATC TTC TCC TCT TCT GTC TC; y GSTM1REV, 5'- TTC TGG ATT GTA GCA GAT CA. Se

realizó PCR, en 20 µl de reacción como sigue: 3 minutos a 94°C y 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 45 seg, y 72°C por 45 seg y para finalizar 2 minutos a 72°C. El fragmento de GSTM4 es de 158 pb (pares de bases) y el de GSTM1 de 231 pb.

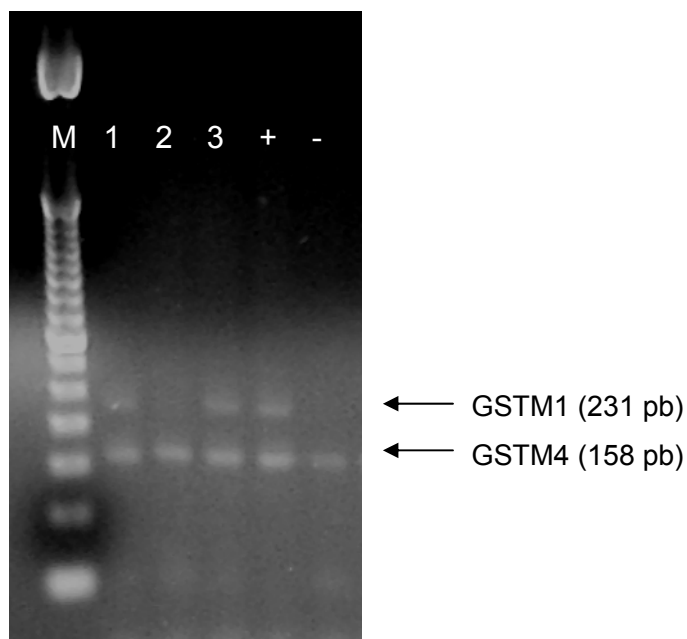


Fig 6. Gel de agarosa para GSTM1. Carriles 1 y 3, muestran las bandas de GSTM1 (231 pb) y GSTM4 (158 pb) en los portadores del gen GSTM1; 2, muestra sólo la banda de GSTM4 en ausencia del gen GSTM1. Carriles de control positivo (+) y negativo (-) de la amplificación para el gen GSTM1. Marcador de peso molecular de 50 pb (M).

Genotipo GSTT1. Se usaron los oligonucleótidos para amplificar el gen de GSTT1, con uno específico, del gen de beta globina el cual sirvió de testigo de la amplificación. Las secuencias empleadas fueron: GSTT1FW, 5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC; GSTT1RV, 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA; y BGFV, 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC y BGRV, 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC. La reacción se realizó

PCR, en 20 µl de reacción como sigue: 4 minutos a 94°C y 30 ciclos por 20 seg, 62°C por 30 seg, y 72°C por 45 seg y para finalizar 4 minutos a 72°C. El fragmento de GSTT1 es de 480 pb y el de beta globina de 270 pb.

Posteriormente los genotipos fueron evaluados por electrofóresis en gel de agarosa al 1.5%. Se documentó cada genotipo con el Programa Kodak Digital Science ID (Fig. 6 y 7).

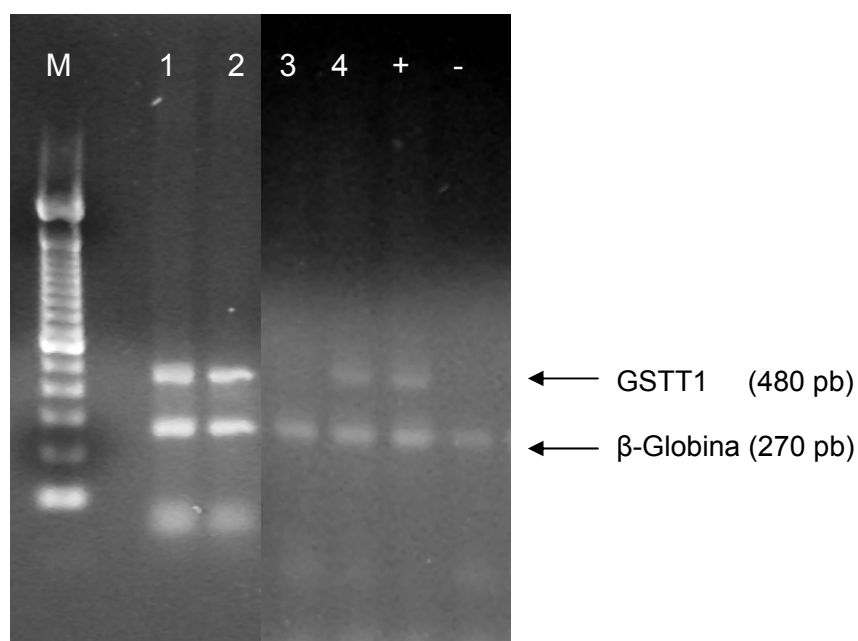


Fig 7. Gel de agarosa para GSTT1. Carriles 1, 2 y 4, muestran las bandas de GSTT1 (480 pb) y beta-globina (270 pb) en los portadores del gen GSTT1; 3, muestra sólo la banda de beta-globina en ausencia del gen GSTT1. Carriles de control positivo (+) y negativo (-) de la amplificación para el gen GSTT1. Marcador de peso molecular de 100 pb (M).

b.3. Evaluación de daño celular en linfocitos de sangre periférica

Se prepararon 3 cultivos de la sangre entera heparinizada de cada donador para evaluar el sistema de micronúcleos después de 48 horas de incubación. Se utilizó la incorporación de la Bromodesoxiuridina (BrdU) (Sigma, México) para marcar las células que proliferaron en el cultivo, según el método de inmunohistoquímica reportado por Serrano y Montero (2001). Se estimó un índice de marcaje como testigo de la proliferación de cultivos; el cual se calculó considerando el número de células inmunoteñidas contadas en 2000 células evaluadas en las láminas teñidas con anti-BrdU-DAB (anti-Bromodesoxiuridina-diaminobenzidina) y contrateñidas con Giemsa. Finalmente, se analizó el daño citogenético, que incluyó la evaluación de micronúcleos (MN), así como las gemaciones nucleares (CHB) y los puentes nucleoplásmicos (NPB).

Se registraron, por separado, el número de células con más de 1 MN (> 1 MN) o más de 1 CHB (> 1 CHB). Además, las figuras apoptóticas (AF) que miden la toxicidad de la célula (Gregus, 2003) también fueron evaluados (Fig. 8). Se evaluaron 2 cultivos por cada donador y se contaron 2000 células por cada cultivo en un microscopio de alta resolución (1000X). Las frecuencias para cada biomarcador fueron calculadas de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\text{Frecuencia X} = (\text{N}^\circ \text{ de X encontradas} / 4000) \times 1000$$

donde X es equivalente a: MN, CHB, NPB o AF.

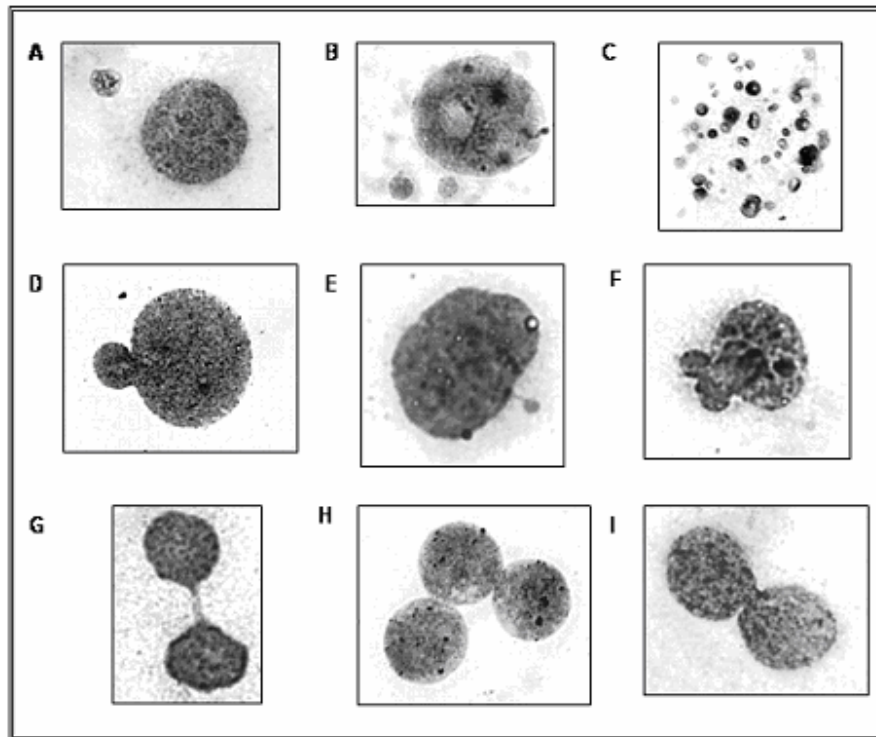


Fig. 8. Sistema de Micronúcleos (1000X). A) Micronúcleos; B) Célula con 2 micronúcleos; C) Figura apoptótica; D y E) Gemación nuclear; F) Célula con múltiples gemaciones; G) Célula con puente nucleoplásmico; H) Puentes nucleoplásmicos en célula trinucleada; I) Puente nucleoplásmico.

5.4. Trabajo de campo:

A. Primera etapa

Se aplicó un cuestionario a todos los pobladores que aceptaron participar en el estudio. Se buscó identificar los factores que podrían representar una fuente de riesgo para la salud con base en sus características sociodemográficas.

B. Segunda etapa

Se envió una carta de invitación personal a cada participante seleccionado, para que donen una muestra de sangre; especificando el lugar y hora del muestreo. Solamente fueron incluidos en el estudio quienes cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron donar 6 ml de sangre. Luego, se procedió a la toma de la muestra sanguínea de cada participante con el fin de determinar el daño celular. Toda la información se mantuvo en anonimato y sólo se trabajó con códigos asignados a cada uno de los participantes.

Para un mejor análisis de los datos, se agrupó a los participantes de acuerdo a las comunidades de procedencia en 3 regiones dentro de la zona de estudio: La región 1 fue constituida por las comunidades situadas en las riberas del río Atoyac, donde la planta petroquímica elimina sus descargas al ambiente. La región 2 está abajo del curso de este río, después de que atraviesa una segunda descarga de una industria de lavandería de mezclilla; dos de las comunidades de la región 2 están próximas a 3 sitios de descarga por la planta petroquímica y otras lavanderías de mezclilla (Xalmimilulco y Moyotzingo) y la tercera comunidad esta situada debajo de la confluencia de los ríos Atoyac y Xochiac (Michac) (Fig. 5).

La región 3 se consideró como testigo de la zona de estudio y estuvo constituida por 2 comunidades por donde ninguno de los ríos fluye y sus sistemas de aguas residuales no están conectados al sistema de alcantarillado de las otras comunidades (Fig. 5). Adicionalmente, se consideró un grupo como referente de laboratorio en caso de que la contaminación ambiental ejerciera un efecto sobre la población; que incluyó, muestras de

donadores que viven en la Ciudad de México, seleccionados bajo los mismos criterios para los individuos del área de estudio. Todos los evaluados nacieron en México, al igual que los padres, los abuelos y los bisabuelos.

Finalmente, se procesaron y analizaron los datos obtenidos en ambas etapas del estudio para concluir con el informe final.

5.5. Limitaciones

- No se aplicó aleatoriedad en la selección de los participantes, por lo que los resultados obtenidos no son extrapolables a la población de la zona.
- No se determinó la exposición directa a los contaminantes ambientales en los entrevistados por su residencia en una de las comunidades evaluadas debido a que durante el estudio se ignoraba el tipo de contaminantes en esa zona. Adicionalmente, en la actualidad se desconoce los biomarcadores específicos para las sustancias químicas reportadas en el análisis de la calidad de aguas (Navarro y col, 2004). Asimismo, no se tiene conocimiento sobre la calidad de aire y de suelo en la zona estudiada.

5.6. Aspectos Éticos

Previamente tanto para la primera como para la segunda etapa del presente trabajo, se obtuvo el consentimiento formal de todos los participantes (Formato de Consentimiento

Informado escrito y firmado), quienes fueron informados de los objetivos, procedimientos, riesgos y beneficios que conllevó el estudio.

5.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados con el Programa SPSS versión 10.0. Inicialmente se hizo el análisis descriptivo con frecuencias, así como medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo al tipo de variable. La prueba de normalidad mostró que los datos no tenían distribución normal por lo que, se empleó la transformación logarítmica para el análisis multivariado de la prueba de regresión con todos los datos, incluyendo a los referentes fuera de la zona estudiada.

Las variables incluidas fueron: Las regiones evaluadas (4 categorías); actividad ocupacional (3 categorías); género, fumar, beber, polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 (2 categorías cada uno); edad e IMC (como variables continuas). Las interacciones sugeridas por los resultados con cada parámetro de genotoxicidad (sistema de MN) fueron analizadas en nuevos modelos. Los datos obtenidos fueron usados para analizar las diferencias debido a los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1. Se empleó las pruebas de correlación, regresión, t y análisis de varianza considerando para todas ellas una $p < 0,05$ para ser estadísticamente significativo.

CAPITULO VI. RESULTADOS

El cuestionario empleado buscó explorar los factores que podrían representar una fuente de riesgo para la salud. Se dividió en 4 áreas: características individuales, dieta y hábitos; estado de salud y antecedentes familiares de cáncer; situación ocupacional y el uso del agua potable. Se entrevistaron a 350 personas, de las cuales 45 no fueron considerados para el primer análisis, porque eran niños y adolescentes que no trabajan (17). Por lo tanto, el análisis se basó en 305 cuestionarios, y los resultados se muestran a continuación.

6.1. Características sociodemográficas

A. Perfil de la población, hábitos y estado de salud

Fueron 152 varones y 153 mujeres los entrevistados. El rango de edad fue de 17 a 86 años, con una media de 42.6; el peso estuvo entre 23 a 120 kilogramos; la estatura entre 1.4 a 1.9 m y el índice de masa corporal entre 17.9 a 41.3 (Tabla 3).

a.1. Fumar y beber

El 23.7% de los encuestados fueron fumadores, consumiendo 1 a 10 cigarrillos al día. El 26% admitió beber alcohol con frecuencia, sin embargo, no dijeron cuántos vasos consumían por semana. Solamente 4 individuos (1.3%) declararon utilizar drogas (Tabla 3).

a.2. Hábitos dietéticos y el índice de masa corporal

El maíz y otros vegetales se producen en los campos de las comunidades evaluadas y son consumidos por sus residentes; aunque una mayor parte se transporta a las ciudades de Tlaxcala, Puebla y México. En las granjas, hay también animales como cerdos, vacas y aves de corral, de modo que huevos, carne y leche y sus derivados también son producidos y consumidos por los habitantes de la zona de estudio. No obstante, el 11% de los encuestados dijeron que no consumen esos productos.

El índice de masa corporal (IMC) es una medida de la grasa del cuerpo basada en la estatura y el peso aplicado a los adultos. Este factor es importante en toxicología puesto que gran cantidad de productos tóxicos son altamente lipofílicos, los que se distribuyen y concentran en grasas del cuerpo; este almacenamiento baja la concentración en los órganos blanco; no obstante, esto es peligroso para quienes presentan un IMC alto debido a que al perder rápidamente la grasa corporal aumenta repentinamente el compuesto tóxico en su sangre (Rozman y Klaassen, 2003). Los valores del IMC entre 18.5 y 24.9 están en el rango de normalidad; los valores debajo de 18.5 indican que la persona es de bajo peso y los valores de 25 a 29.9 que se tiene sobre peso (National Heart, Lung and Blood Institute), mayores valores son considerados como obesidad. Los datos muestran que el 1% presenta bajo de peso y el 50% tiene sobrepeso. Las personas obesas fueron un 10% de los evaluados. Un análisis entre el IMC y la edad reveló que correlacionan positivamente ($p < 0.05$).

a.3. Problemas crónicos de salud

El 57.7% de los evaluados dijeron que sufren algún padecimiento crónico (Tabla 3); de ellos el 47% fueron hombres. La gastritis y los problemas digestivos fueron los de mayor frecuencia, seguido por la ansiedad y la presión alta; al igual que las alergias de la piel y las enfermedades vasculares.

Se buscó asociación entre los padecimientos crónicos descritos y la ocupación, encontrándose que están distribuidas uniformemente entre los 9 grupos ocupacionales que fueron reconocidos (véase la actividad y la posible exposición a los productos químicos). Sin embargo, las alergias de la piel fueron las más frecuentes entre trabajadores en la industria, en la agricultura y las lavanderías (18-27%) comparados con las amas de casa y los empleados de oficina (10-14%); aunque, no se encontró diferencia significativa.

B. Antecedentes de cáncer en la familia

Se reportaron 11 individuos (3%) con casos de cáncer en uno de los padres (5), en ambos padres (1), de un abuelo (3) y de un hermano (2) (tabla 3). Esas personas no estaban relacionadas el uno con el otro.

b.1. Niños con cáncer o problemas hematológicos

Cuatro personas reportaron tener niños con leucemia (1.3%), 1 con linfoma de no-Hodgkin (0.3%) y 1 nieto con cáncer hepático (0.3%) (Tabla 3). Seis personas reportaron niños con anemia trombocitopénica (2%). Solamente un niño con cáncer fue relacionado con las personas que dijeron tener antecedentes de cáncer en la familia. Los casos de anemia

trombocitopénica fueron distribuidos en San Baltazar Temaxcalac, Villalta y San Mateo Ayecac, dos en cada uno. La ocupación de los padres no fue determinada eficientemente, debido a que en la mayoría de los casos el informante era la madre.

C. Manejo del agua

El 89% de los encuestados obtiene el agua para uso doméstico de un pozo comunitario, a través de una tubería. El 10% emplea el agua de un pozo doméstico y 1 persona contestó que a veces obtenían el agua del río. Los pozos domésticos son utilizados con mayor frecuencia en Santa Ana Xalmimilulco (36% de los evaluados) (Tabla 3). Los envases para almacenar el agua potable son comunes en el área; 41.7% de las personas declararon usar envases viejos, y de estos el 72% no sabía su origen (Tabla 3). De los que conocían la procedencia de estos envases antes de emplearlo como almacén de agua, dijeron que contenían aceite, lubricantes, desinfectantes o que pertenecieron a las industrias de cerámica, adhesivas y de papel; esta clase de envases se usa con mayor frecuencia en San Baltazar Temaxcalac, Santa Ana Xalmimilulco y San Francisco Tepeyacac.

El 65% de los evaluados emplea el agua potable en la preparación de alimentos y para beber, pero no el 35%. El 57% de los entrevistados no emplea ningún método para purificar el agua, el 23% desinfecta con cloro o yodo, el 18% hierve el agua antes de preparar los alimentos y solamente el 2% filtra el agua (Tabla 3).

Tabla 3. Datos Sociodemográficos de la población de estudio.			
	Hombre	Mujer	Total
Donadores (n)	152	153	305
Edad: media±d.s. (rango)	44.9±16.2 (19-86)	40.4±13.8 (19-83)	42.5±14.8 (19-86)
Índice de Masa Corporal: media±d.s. (rango)	26.1±3.9 (18.7-41.3)	26.3±4.0 (17.9 -40.2)	26.1±3.8 (17.9-41.3)
Hábitos			
Fumadores (%)	70 (22.90 %)	2 (0.70 %)	72 (23.70 %)
Cigarros/día:	(1-10)	(1-2)	(1-10)
Bebedores* (%)	75 (24.60 %)	4 (1.40 %)	79 (26.00 %)
Enfermedades crónicas**			
Gastritis (%)	23.6	15.0	38.6
Problemas digestivos (%)	22.3	24.8	47.1
Alergias de la piel (%)	14.4	16.9	40.3
Presión alta (%)	12.5	20.9	40.4
Ansiedad (%)	8.6	15.6	24.2
Diabetes (%)	5.2	3.3	8.5
Antecedentes Familiares de cáncer (n)	Localización		11
Padres (n)	Piel, estomago, hígado		4
Madres (n)	Piel, útero		2
Abuela (n)	Hueso, estomago		3
Hermana (n)	Útero		1
Hermano (n)	Leucemia		1
Manejo del agua			
Pozo comunitario (%)			89
Pozo domiciliario (%)			10
Rio (%)			1

*Los bebedores reclutados no declararon la cantidad de licor ingerido por día o semana.

**Más frecuentes

D. Actividad y posible exposición a los productos químicos

Se distinguieron nueve categorías de ocupación: A) en la casa; B) empleados en comercio, educación y estudiantes; C) industrias con o sin productos químicos tóxicos, D) trabajadores ambulantes; E) costureras; F) agricultores; G) industria donde se manipulan los productos químicos tóxicos (talleres de mecánica, carpintería, cerrajería y fontanería; H) industria de lavandería.

Una mayor proporción de A y F contestó el cuestionario (31 y el 21%, respectivamente). A, B y C son actividades que no implican una exposición intensa a los productos químicos. En D fueron incluidos los conductores de taxi y camiones, vendedores ambulantes y trabajadores de construcción, que están expuestos a la luz solar, y a la contaminación de vehículos de motor en las calles. En E fueron incluidos los trabajadores que están en contacto con la pelusa de las telas, mezclilla u otro, y posiblemente sustancias sintéticas. Los agricultores (F) están expuestos a los pesticidas, varios de los cuales se enumeran como restringidos según el Catálogo de Plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004), como Tamarón, Gramoxone, Cuproquat, y 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético). Estos pesticidas contienen metamidofos (organofosforado que interfiere con la transmisión neuronal), paraquat (neumotóxico) y 2,4-D (disruptor endócrino) (EPA, 2002; NIOSH, 2005; CDC, 2003; EPA, 2006). Los trabajadores en G están expuestos a diversos productos tóxicos químicos como el tolueno, vapores ácidos, grasa de automóviles y pinturas. Finalmente, los trabajadores en las lavanderías (H) están en contacto con blanqueadores clorados, detergentes y los tintes de índigo y anilina, además a la exposición del calor intenso de los calentadores utilizados en el lavado y blanqueado.

Las personas de los grupos de E a G consideran su equipo de protección deficiente, debido a que aun respiraban y sentían los productos químicos; ningún equipo se utiliza para protegerse del calor y la pelusa.

Tabla 4. Aspectos en el ambiente percibidos como contaminación por los habitantes de las Comunidades.											
Percepción del ambiente	Comunidad										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Olores irritantes	X	X	X				X	X	X	X	X
Olores agroquímicos	X	X			X						X
Olores fétidos		X	X	X	X	X	X	X	X		X
Olor a kerosén quemado		X		X			X	X	X		
Quemado de basura	X						X			X	X
Olor causante de náuseas y dolor de cabeza		X							X		
Las lavanderías	X		X	X						X	
Cambio de color en ríos	X	X	X	X	X	X	X		X	X	
Deshechos tóxicos		X							X	X	
Campos afectados			X	X				X	X		
Polvo							X		X	X	
Uso de agua de río para riego			X		X	X					
Estanque de oxidación		X				X					

1. Tepetitla, 2. Villalta, 3. San Mateo Ayecac, 4. San Rafael Tenanyecac, 5. Santiago Michac, 6. Santa Justina Ecatepec, 7. San Lucas Atoyatenco, 8. Santa Maria Moyotzingo, 9. San Baltazar Temascalac, 10. Santa Ana Xalmimilulco, 11. San Francisco Tepeyacac

Tabla 5. Riesgos a la salud identificados.	
Ocupacional	Exposición ocupacional a los productos tóxicos químicos y carcinogénicos por no contar con equipo de protección adecuado. Se ignora la norma para la seguridad y la salud en el ambiente de trabajo donde se manipulan, producen o almacenan los productos químicos peligrosos, en varias de las industrias y en numerosas manufacturas pequeñas. Otro peligro para la salud podría constituir la pelusa de las telas, algodón así como las fibras sintéticas, usadas en las industrias textiles.
Ambiental	Exposición ambiental en las comunidades cercanas a los ríos Atoyac y Xochiac debido a la presencia de contaminantes en los ríos, alcantarillados y canales de riego. La ruta de exposición más frecuente: la aérea. Las normas para el control de contaminantes de descargas en aguas nacionales o en el alcantarillado público no son cumplidas por varias de las industrias y numerosas manufacturas pequeñas. Algunos de los contaminantes no están reguladas en las normas, particularmente las que se refieren al índigo y colorantes de anilina, los blanqueadores clorados y los productos de las reacciones químicas que pueden ocurrir en cada descarga.
Intrínsecos al individuo	Índice de masa corporal elevado. Fumadores y también bebedores. Probable deficiencia de la ingesta de nutrientes, particularmente Vitamina B ₁₂ .

6.2. Evaluación de Biomarcadores de susceptibilidad y de efecto

Para evaluar los biomarcadores de susceptibilidad y de efecto, se solicitó una muestra sanguínea a los entrevistados, previa hoja de consentimiento firmado. Se reunió a 105 donadores en la zona de estudio y como control de laboratorio a 21 sujetos de la Ciudad de México. Los resultados se muestran a continuación.

A. Datos sociodemográficos de donadores de sangre

El rango de edad estuvo entre 19 a 83 años. Las variables consideradas para el análisis se resumen en la tabla 6; las medias, desviaciones estándar y el rango describen a los donadores del área y también a los referentes (testigos de laboratorio) (Tabla 6).

Tabla 6. Datos sociodemográficos de donadores de sangre para evaluar daño celular.			
	Hombre	Mujer	Total
Donadores (n)	48	57	105
Edad: media±d.s. (rango)	44.9±14.2 (19-80)	39.7±13.8 (19-83)	42.1±13.7 (19-83)
Índice de Masa Corporal: media±d.s. (rango)	26.1±3.7 (18.3-33.3)	25.5±3.5 (17.9-35.6)	25.8±3.4 (17.9-35.6)
Fumadores (%)	35.4	5.3	19
Cigarros/día: media±d.s. (rango)	4.4±3.8 (1-10)	4.0±5.2 (1-10)	4.2±4.9 (1-10)
Bebedores* (%)	27.1	8.8	17
Actividad grupo 1 (n)	12	32	44
Actividad grupo 2 (n)	24	4	28
Actividad grupo 3 (n)	25	8	33
Región 1 (n)	24	21	45
Región 2 (n)	15	22	37
Región 3 (n)	9	14	23
Grupo Referente (n)	9	12	21
Edad: media±d.s. (rango)	26±5.12	29.8±10.3	27.8±11.3 (21-50)
Índice de Masa Corporal: Media±d.s. (rango)	24.9±1.73	21.8±3.58	23.3±2.5 (17.6-28.4)
Fumadores (%)	22	25	23.8
Cigarros/día: media±d.s. (rango)	1.67±4.64	3.25±10	3.0±8.0 (1-20)
Bebedores* (%)	66.6	58.3	61.9

*Los bebedores no declararon la cantidad de licor ingerido por día o semana.

B. Variables predictoras para cada parámetro de genotoxicidad

Las variables que se muestran en la tabla 6, fueron empleadas en el análisis multivariado de la regresión para determinar los predictores para cada uno de los biomarcadores evaluados en la prueba de micronúcleos. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 7. Se realizaron tres análisis: uno solamente con los datos de los donadores de la zona de estudio, otra sólo con los datos de los referentes y el tercero con todos los datos juntos (de estudio y referente).

La región y la actividad socioeconómica no fueron utilizadas en el análisis del grupo referente, debido a que eran similares. Según este análisis, no se encontró ningún factor predictor en el grupo referente, por lo que no se presentan en la tabla 7.

En el grupo que vive en la zona de estudio, las células con más de 1 micronúcleo (MN) fueron significativamente mayores en las mujeres y en los fumadores. La frecuencia total de MN fue más alta en las personas con un IMC bajo y con el genotipo GSTT1 nulo. Las células con más de 1 célula con gemación nuclear (CHB) fueron más frecuentes entre los no fumadores y hombres, mientras que los puentes nucleoplásmicos (NPB) estaban incrementados entre los hombres que viven en la región 2 y en los no fumadores (Tabla 7).

Al utilizar toda la base de datos las variables predictoras se comportaban levemente diferentes (Tabla 7); las células con 1 MN fueron más frecuentes en las regiones 1 y 2; igual sucedió para las células con más de 1 MN que se encontraron con mayor frecuencia entre los donadores de las regiones 1 y 2. Los individuos con GSTT1 nulos mostraron relación con la frecuencia total de MN y con las células con 1 MN. La frecuencia total del MN también se encontró relacionada con un IMC más bajo y con el incremento de la edad.

Las células con 1 CHB fueron más frecuentes entre las personas que viven en las regiones 1 y 2, mientras que la frecuencia total de CHB fue más alta en personas que no beben. Finalmente, para las células NPB la frecuencia más alta se presentó entre los hombres que viven en la región 2 y entre los no fumadores (Tabla 7). No se encontró ninguna variable predictoras para las figuras apoptóticas. Este parámetro está relacionado con la citotoxicidad

y junto con la necrosis y el índice de proliferación podrían dar información sobre un efecto tóxico adicional de los contaminantes. Sin embargo, dada las condiciones de nuestros cultivos no fue posible detectar esta clase de efecto, debido a que no se encontró ninguna variación en la cantidad de apoptosis y las células necróticas no fueron observadas, probablemente por el tratamiento hipotónico usado en la cosecha; además, la proliferación de cultivos estaba en el rango normal del índice de marcaje (85 a 95%).

Tabla 7. Variables predictoras para cada parámetro de genotoxicidad.				
Biomarcador	Grupos de Tlaxcala		Grupos de Tlaxcala y Referente	
	Predictor	P	Predictor	p
1 MN	Ninguno		Región 1 y 2	0.007
			GSTT1 nulo	0.04
				0.003*
> 1 MN	Fumador	0.03	Región 1 y 2	0.03*
	Mujer	0.04		
		0.05*		
Total MN	IMC bajo	0.05	Región 1 y 2	0.001
	GSTT1 nulo	0.03	GSTT1 nulo	0.02
		0.02*	IMC bajo	0.02
			Edad	0.04
				0.0001*
1 CHB	Ninguno		Región 1 y 2	0.02*
> 1 CHB	No fumador	0.03	Ninguno	
	Hombre	0.03		
		0.03*		
Total CHB	Ninguno		No bebedor	0.01*
NPB	Hombre	0.001	Hombre	0.001
	Región 2	0.004	Región 2	0.004
	No fumador	0.01	No fumador	0.012
		0.001*		0.001*

*P, valor del modelo.

C. Biomarcador de daño celular en relación a la actividad y las regiones estudiadas

La media geométrica y desviación estándar de cada biomarcador, según las regiones y actividades se muestran en la tabla 8. Las frecuencias para todos los biomarcadores en los 3 grupos de actividad ocupacional son similares. Las regiones 1 y 2 son predictoras para 1 MN, al igual que para la frecuencia total de MN y para 1 CHB; sin embargo, solamente la región 2 es predictora para NPB.

Biomarcador	Grupo de Actividad			Regiones			Referente
	1	2	3	1	2	3	
<i>(%)†</i>							
<i>1 MN</i>	1.70±1.05	1.86±0.85	1.83±1.09	1.81±1.07*	1.87±0.99*	1.35±0.90	0.97±0.67
<i>> 1 MN</i>	0.56±0.26	0.51±0.24	0.45±0.07	0.52±0.12	0.55±0.31	0.33±0.00	0.00
<i>Total MN</i>	1.86±1.11	1.87±1.07	1.88±1.15	1.96±1.15*	1.91±1.07*	1.51±0.99	0.97±0.67
<i>1 CHB</i>	2.23±1.60	1.72±1.19	2.05±1.33	2.29±1.50*	2.11±1.64*	1.51±0.73	1.35±1.03
<i>> 1 CHB</i>	0.68±0.52	0.87±1.05	0.97±0.74	0.70±0.47	0.96±0.97	0.50±0.0	0.63±0.25
<i>Total CHB</i>	2.42±1.68	2.11±1.71	2.20±1.66	2.46±1.75	2.38±1.86	1.74±0.70	1.47±1.12
<i>NPB</i>	0.92±0.78	1.5±1.37	0.75±0.28	0.57±0.22	1.52±1.20*	0.58±0.12	0.05±0.0
<i>APOP</i>	0.65±0.37	0.57±0.39	0.68±0.46	0.77±0.44	0.51±0.26	0.5±0.0	0.5±0.0

*Se encontraron como predictores en el análisis multivariado de regresión y posterior análisis por ANOVA en los que fueron significativamente diferentes entre las regiones, $p < 0.05$.

†Media geométrica y desviación estándar. Frecuencia por cada 1000 células.

D. Polimorfismos y biomarcador de daño celular

La frecuencia del polimorfismo de GSTM1 nulo se presentó en el 57% de los evaluados, mientras que el de GSTT1 nulo se encontró en el 9.5%. No se reportó ningún efecto sobre

las frecuencias de los biomarcadores de daño celular en relación al polimorfismo de GSTM1 nulo, mientras que para el de GSTT1 nulo se muestra asociación con las frecuencias de las células con 1 MN, con la frecuencia total de MN y las de NPB (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencia del Biomarcador de daño celular en relación a los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1.						
Biomarcador	G S T M 1			G S T T 1		
(%)*	Presente	Nulo	P	Presente	Nulo	P
<i>IMN</i>	1.54±0.84	1.77±1.23	0.94	1.56±0.97	2.30±1.09	0.04
<i>>IMN</i>	0.57±0.31	0.51±0.06	0.81	0.52±0.25	0.57±0.15	0.67
<i>Total MN</i>	1.65±0.95	1.87±1.28	0.89	1.64±1.05	2.62±1.20	0.02
<i>ICHB</i>	1.99±1.38	1.94±1.51	0.76	1.94±1.45	2.11±1.21	0.48
<i>>ICHB</i>	0.84±0.73	0.5±0.0	0.25	0.76±0.66	0.71±0.36	0.84
<i>Total CHB</i>	2.26±1.66	2.06±1.56	0.37	2.14±1.64	2.34±1.48	0.52
<i>NPB</i>	1.13±1.20	0.82±0.70	0.68	0.82±0.80	2.25±1.5	0.03
<i>APOP</i>	0.65±0.43	0.60±0.19	0.93	0.64±0.37	0.5±0.0	0.88

*Frecuencias presentadas en la forma de media geométrica y desviación estándar.

CAPITULO VII. DISCUSIÓN

Una situación compleja se encontró en la región estudiada, donde varios factores están en juego. Llama nuestra atención las condiciones y los riesgos en el lugar de trabajo en diversas industrias, particularmente en las lavanderías de mezclilla y en la planta petroquímica donde se manipulan productos químicos como acrilonitrilo, benceno, metanol, tolueno y muchas otras desde 1990. Aunque, los trabajadores utilizan equipo protector para evitar la exposición manifestaron que los vapores y los olores siempre están presentes incluso en zonas fuera del área de producción. Lamentablemente, no se logro hacer un estudio con los empleados de la planta petroquímica.

Los trabajadores en las lavanderías también describieron una situación peligrosa en los locales, los que no cuentan con buena ventilación donde el calor de las calderas, combinado con la acumulación de vapores de los blanqueadores y de los suavizadores de la tela, tales como hipoclorito del sodio y peróxido de hidrógeno, dan lugar a una atmósfera irritante que afecta las vías aéreas superiores, ojos y piel, y en el caso del peróxido de hidrógeno, que también puede irritar los pulmones (ATSDR-ToxFAQs, 2002; ATSDR-ToxFAQs, 2002). Estos trabajadores utilizan equipo protector solamente para la piel. Un peligro adicional se plantea a las costureras que trabajan al lado de las áreas donde emplean los blanqueadores y en zonas donde se genera calor; adicionado a la pelusa de las telas (fibras diminutas que irritan continuamente las vías aéreas superiores y eventualmente también pueden producir daño pulmonar). Se reportó, en los cuestionarios dos casos de problemas bronquiales y de faringe por la exposición continua a la pelusa de telas durante 3 años en una planta textil.

Otro peligro ocupacional se encontró en los campos agrícolas. Los agricultores utilizan varios pesticidas restringidos de manera muy irregular: algunos los emplean diariamente, otros una vez o dos veces al año. No usan ningún equipo especial para aplicar los pesticidas, excepto las botas y algunas veces guantes. Con respecto a la ropa, usan la misma diariamente en la casa y el campo, que consiste en pantalones de mezclilla, camisa larga de algodón, zapatos o botas con suela gruesa y sombrero. Mientras trabajan ellos no usan guantes debido al calor, por lo que la exposición cutánea a los contaminantes en el agua es muy probable. La exposición al sol es intensa, aunque solamente se reportó un caso de cáncer de piel, en un hombre de más de 60 años de edad. Los agricultores son las personas que pasan más tiempo cerca de los canales de riego y los ríos que están contaminados con las descargas industriales; ellos respiran los vapores de los compuestos orgánicos volátiles contenidos en esas descargas y que están inmersos en el aire; además, están las áreas donde todavía utilizan el río para regar sus campos, dándose directamente la exposición cutánea a través de sus manos y por ende una exposición más intensa a los compuestos orgánicos volátiles.

De las situaciones ocupacionales expuestas, la principal vía de exposición es la inhalación de productos tóxicos químicos y en menor grado, el contacto cutáneo y la ingestión de partículas adheridas a los labios. Es importante notar que la mayoría de los productos químicos reportados por los encuestados están considerados en la Norma Mexicana para Condiciones de Seguridad e Higiene en el Lugar de Trabajo. Sin embargo, aquellos usados en las lavanderías de mezclilla como blanqueadores clorados y tintes de índigo no están considerados; y según lo reportado, están expuestos a altas concentraciones de los vapores

de ambas sustancias. El índigo se degrada en otros productos tóxicos y esto ocurre también en el ambiente (Thompson Gale). Interesantemente, el cloroformo y cloruro de metileno no fueron reportados por los entrevistados; con respecto al cloroformo, este podría formarse en el río después de que se descarguen los blanqueadores clorados, mientras que el cloruro de metileno se emplea en la industria de adhesivos y de pintura, una de las cuales está presente en la zona.

Actualmente, el río Atoyac es un vertedero donde la gente arroja su basura. Algunos agricultores todavía utilizan el agua para sus cultivos, pero ninguno de ellos emplea esta agua para sus animales o para uso doméstico. Por lo tanto, a pesar de la presencia de esos contaminantes, la mayoría de la gente que vive en las comunidades del área no estaría en contacto directo con el agua, ya que el río ha dejado de ser un lugar de recreación. Sin embargo, numerosos contaminantes de origen químico son volátiles y constantemente emergen del río como olores irritantes. Las comunidades más afectadas, según la percepción del ambiente que tienen los habitantes, serían Villalta, San Baltazar Temaxcalac, Santa Ana Xalmimilulco y San Francisco Tepeyacac. Los residentes de Santa Ana se quejan principalmente de las lavanderías, mientras que las otras comunidades se refieren a las industrias en general. Una percepción generalizada son los olores en los ríos Atoyac y Xochiac que van de fétido a irritante, causando náuseas y dolor de cabeza en los habitantes de San Baltazar y Villalta (Tabla 4).

El corredor industrial Quetzalcoatl está situado en San Baltazar Temaxcalac; donde hay fábricas de textiles, metalúrgicas y partes de automóviles, junto con una fábrica que elabora

productos químicos aromáticos para la industria alimenticia. El corredor Ixtlacuixtla cuenta con una planta de producción de adhesivos y otra manufacturera de piezas eléctricas de automóviles; este corredor está cerca de la comunidad de Villalta. En el corredor industrial Huejotzingo hay dos industrias textiles; Santa Ana Xalmimilulco está próxima a estas industrias. San Baltazar y Santa María Moyotzingo son las comunidades más próximas al complejo petroquímico que iniciaron la industrialización de esta zona hortícola en la década de 1960. La construcción de corredores industriales; sin embargo, es más reciente; llegaron al lugar durante la década de 1990.

Tanto en los riesgos ocupacionales como en los ambientales la principal vía de exposición a los productos químicos es probablemente por inhalación de compuestos orgánicos volátiles provenientes de los ríos contaminados o de la quema de basura, así como de hidrocarburos aromáticos policíclicos resultantes de la combustión del kerosén en una planta de tratamiento de agua. Sin embargo, hay excepciones que deberían prevenirse debido a que los niños pueden caer por accidente al río y sufrir severas erupciones en la piel, o personas que declararon usar esta agua para limpieza doméstica. Una lista de los productos tóxicos químicos detectados en el agua se muestra en la tabla 2. Ningunos de los productos enumerados se acumulan en la cadena alimenticia, aunque algunos de ellos podrían alcanzar el agua subterránea, como el 2,4-D, o acumularse en los sedimentos, como la anilina.

El fumar es un hábito frecuente así como el beber. Sin embargo, la gente se mostró renuente a declarar que tan intensos son esos hábitos. El fumar representa un riesgo para la

salud de contraer cáncer de pulmón, de garganta y hepático, así como desarrollar enfermedades coronarias (ATSDR. Cáncer, 2002). El bebedor frecuente (sin necesidad de llegar al alcoholismo) contribuye al riesgo de desarrollar cáncer. Los individuos que beben demasiado o abusan de las drogas, no se alimentan bien y no cuidan adecuadamente su salud, aumentan el riesgo de cáncer. De hecho, los bebedores en exceso tienen 3 veces más probabilidad de desarrollar cáncer de hígado que los no bebedores y 4 veces más de desarrollar cáncer de esófago (Ridolfo y Stevenson, 2001).

Un riesgo de cáncer, ha sido también documentado referente al IMC, debido a que se conoce que el tejido graso es almacén de numerosos productos químicos lipofílicos. Encontramos una media del IMC de 25.9, considerada como exceso de peso, y alrededor del 20% de los entrevistados son obesos (IMC mayor de 30). Por otro lado, solamente 3 personas (1%) fueron de bajo peso en el estudio. Los productos químicos lipofílicos también son un riesgo para las mujeres embarazadas, debido a que pueden cruzar la placenta o eliminarse por la leche materna. Dependiendo de la etapa del embarazo, la exposición del feto podría dar lugar a defectos del nacimiento o a la muerte. Si la madre se expone durante la lactancia, su leche puede concentrar ciertos contaminantes, aumentando la exposición a su hijo (Rozman y Klaassen, 2003).

La dieta en el área es variada, consiste principalmente de vegetales producidos en sus campos; estos se consumen principalmente en sopas o frituras. La ingesta de leche y sus productos también es común. La carne roja y el pollo se comen con menos frecuencia y los suplementos, como las vitaminas, no se utilizan. Esto, junto con la frecuencia de gastritis y

desórdenes digestivos hace pensar en la posibilidad de que podría haber una deficiencia de consumo y/o de la absorción de la vitamina B₁₂ en estas personas (Hugh y Wickramasinghe, 1996). La vitamina B₁₂ es importante en la síntesis de 5,10-metilentetrahidrofolato el cual es crucial en la formación de dTMP para la síntesis de DNA. Una deficiencia crónica se relaciona con anemia perniciosa y desórdenes neurológicos. A nivel genético, una deficiencia causa la sustitución del uracilo por timina en el DNA durante la síntesis, contribuyendo a la inestabilidad del DNA (Hugo y Wickramasinghe, 1996). Futuros estudios podrían abordar la posibilidad de evaluar la deficiencia de estos nutrientes en los pobladores de la región.

Se identificaron numerosos elementos que podrían contribuir al deterioro de la salud en la zona de estudio (Tabla 5). Probablemente tal situación contribuiría al incremento de la incidencia de anemia trombocitopénica y de leucemia, debido a la exposición ocupacional y/o ambiental; esto porque según reportes del sector salud de la zona el 2003 se registraron 30 casos de estas enfermedades en las comunidades aledañas al río Atoyac y 31 casos en los trabajadores de la Petroquímica; el 2004 se registraron 45 casos en comunidades diferentes a las reportadas el 2003. Además, dan cuenta que la presencia de las enfermedades mencionadas se pueden considerar como un proceso reciente, dado que el primer caso reportado históricamente se presentó en 1987 y a partir de entonces los casos de estas enfermedades se han presentado de manera irregular en promedio con uno o dos casos por año; sin embargo, el 2000 se presentó un pico con 11 casos, principalmente de leucemia y anemia (Lara y col, 2004). Por comunicación personal, se sabe que el 2005 se habría incrementado el número de casos de las enfermedades mencionadas en la zona en

mención. Por lo que, el riesgo para la salud representado por la presencia de cloroformo, cloruro de metileno, tolueno y anilina en las descargas industriales sobre los ríos Atoyac y Xochiac y efluentes, necesita caracterizarse, midiendo los niveles que alcanzan en el aire por evaporación, dirección del viento y las fluctuaciones a lo largo del año, para determinar cómo afectarían a esas comunidades. La situación ocupacional también debería estudiarse, desde las medidas de protección como el uso de equipo y la vigilancia higiénica debido a que la norma mexicana en el tema (NOM-010-STPS, 1999) no parece estar cubierta adecuadamente en ninguna de las actividades riesgosas identificadas.

Con respecto a los hábitos personales como la dieta, fumar y beber, se podrían organizar campañas para estimular a la gente a consumir más frutas y vegetales frescos; así como cereales o vitaminas para protegerlos contra los efectos de la exposición química. Se podría conducir un estudio de intervención para establecer si esta estrategia tendría algún efecto protector de la salud de estas comunidades, particularmente en los niños y adolescentes que son considerados como los más vulnerables a situaciones ambientales como la descrita.

En cuanto al daño genotóxico se encontró que no está asociado con una probable exposición ocupacional a productos químicos; sin embargo, estuvo mejor asociado con las diferentes regiones de la zona de estudio. La mayoría de casos de leucemia se reportó en Villalta, San Baltazar y Santa María, que corresponde a la región número 1. En Santa Ana, el principal problema de salud reportado fue el asma; esta comunidad está situada en la región 2 (Fig. 5) (Lara y col, 2004). En las regiones 1 y 2 se presentaron las mayores frecuencias de MN y CHB; y en la región 2 los individuos mostraron las frecuencias más

altas de NPB. Este biomarcador refleja un daño complejo, implicando un ciclo de rompimiento cromosómico, fusión de los extremos y la formación de puentes durante la anafase; el cual fue validado como biomarcador de daño del DNA en células humanas WIL2-NS tratadas con peróxido de hidrógeno, superóxido o después de la co-incubación con neutrofilos humanos activados (Umegaki y Fenech, 2000) los cuales fueron relacionados con la producción de MN en células donde ocurrió rompimiento cromosómico con la formación de rearrreglos que conducen al NPB, y fragmentos acéntricos que conducen a MN (Fenech, 2002). El presente es un primer reporte del daño ocurrido *in vivo* en linfocitos periféricos de individuos clínicamente sanos.

Por otro lado, el CHB se ha relacionado con la expulsión del DNA amplificado de las células (Shimizu y col, 1998). Este proceso se observó en cultivos en crecimiento bajo condiciones selectivas (Toledo y col, 1992; Ma y col, 1993; Shimura y col, 1999) que inducen la amplificación de genes. Shimizu y col. (1998, 2000) mostraron que el DNA amplificado está selectivamente localizado en sitios específicos de la periferia del núcleo y eliminado vía gemación nuclear para formar MN durante la fase S del ciclo celular. La amplificación génica ocurre como respuesta a fármacos que conducen a la resistencia, y se ha documentado ampliamente en líneas celulares transformadas; además, una exposición crónica a productos tóxicos químicos también podría conllevar a la amplificación de genes específicos relacionados con su metabolismo (Prody y col, 1989). Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demostraron un incremento de estas estructuras en linfocitos periféricos normales tratados con colcemida y mitomicina-C en períodos cortos de 24 horas de tratamiento (Serrano, 2001). La cantidad incrementada de CHB y de células

con más de 1 CHB encontrado en nuestros evaluados, sugiere que el mecanismo de supervivencia celular se encuentra inducido. Los agentes presumiblemente responsables del daño reportado no se han estudiado en relación con la producción de CHB o de NPB; aunque, los compuestos clastogénicos se suponen inducen este efecto; de acuerdo con esto, el tolueno podría ser responsable de las frecuencias de CHB y NPB; así, como el cloroformo y el cloruro de metileno podrían contribuir al daño encontrado, induciendo una respuesta oxidante (Gemma y col, 2004).

Las células con más de 1 MN constituyen otro biomarcador de interés, puesto que no se encontraron en los referentes. La frecuencia más alta se presentó en las regiones 1 y 2, aunque también se detectaron en la región 3. Los agentes aneuploidogénicos pueden inducir células con más de 1 MN, alterando la segregación normal de cromosomas en las células hijas; algunos pesticidas se han reconocido como aneugénicos; sin embargo, los aneugénicos también inducirían multinucleación y arrestarían células en proliferación durante la metafase, y estos eventos no se observaron. Además, nuestros donadores no expuestos ocupacionalmente a los pesticidas mostraron células con más de 1 MN. Por otro lado, los agentes clastogénicos también pueden causar múltiples rompimientos cromosómicos que puede observarse como múltiples MN pequeños. Futuros estudios, dirigidos específicamente a la identificación de aneugénicos o clastógenos probablemente responsables de este efecto, podrían aclarar el origen de las células multi-micronucleadas.

La mayor frecuencia de daño se encontró en las regiones 1 y 2, que están cercanas al río Atoyac donde ocurren las descargas industriales y al río Xochiac, donde se dan las

descargas de las lavanderías de Mezclilla (Fig. 5); los dos ríos contaminados forman un semicírculo que rodea a las comunidades estudiadas. Los menos afectados, San Francisco Tepeyacac y Santa Justina Ecatepec (región 3), están más distantes de los ríos. Por tanto, en vista de los resultados anteriores, concluimos que el daño encontrado podría deberse a los contaminantes llevados por los ríos que cruzan a través de la zona de estudio, afectando no sólo a los expuestos de manera ocupacional, sino también a los expuestos de manera ambiental a los tóxicos químicos. Por esta razón, se planea hacer nuevos estudios orientados a establecer los riesgos a la salud para los jóvenes que nacieron cuando el deterioro ambiental comenzó, después de 1991. Puede decirse que la cantidad total de MN fue el único biomarcador que mostró incremento con la edad con un valor r de 0.3; este dato se refiere a todos los donadores incluyendo a los referentes, de la ciudad de México.

La inclusión de los datos de los donadores que viven fuera de la zona de estudio, fue útil en el sentido de que permitió identificar frecuencias crecientes de MN y de CHB, además de la frecuencia extraordinaria de NPB encontrado en la zona; a pesar de que nuestros referentes se exponen en promedio de 2-4 horas a la contaminación urbana del transporte público y otras fuentes contaminantes, ellos mostraron un nivel bajo de esta clase de daño. Estos donadores comparten la misma situación socioeconómica con los donadores de Tlaxcala, a excepción de los hábitos dietéticos, el cual probablemente se reflejó en el IMC que mostró valores en el rango normal con respecto a los donadores de la zona de estudio, donde fue más frecuente el peso excesivo y la obesidad.

Con respecto a la dieta, existe una posibilidad sumado a la contaminación ambiental en el área, un factor que contribuye a la cantidad de daño encontrado podría deberse a la deficiencia en folato y vitamina B₁₂ en la dieta de las personas evaluadas, debido al bajo consumo de carne y de suplementos alimenticios; adicionalmente, el consumo de frutas y vegetales frescos es bajo como se estableció en las entrevistas. Un nuevo biomonitoreo se esta planeando en estudiantes escolares para caracterizar este factor como riesgo en la salud.

También se evaluó la susceptibilidad individual a la exposición química debido a los polimorfismos de las enzimas GSTM1 y GSTT1. El polimorfismo GSTM1 nulo se encontró que incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas después de la exposición al tabaco específicamente a la N-nitrosamina *in vitro* (Salama y col, 1999). Varios estudios han demostrado que esta delección incrementa la susceptibilidad conferida por el alelo de CYP1A1*2C para el cáncer asociado a la exposición del PAH (Wan y col, 2002; Hirvonen y col, 1993; Lazarus y col, 1998). Se encontró que el GSTM1 nulo estaba presente con una frecuencia del 57% en este estudio; Coughlin y Hall (2002), en una revisión de este polimorfismo, notaron que la frecuencia de GSTM1 nulo se ubica en el rango del 23% hasta el 48% en poblaciones africanas, el 33% a 63% en poblaciones asiáticas, y de 39% a 62% entre europeos. No se encontró susceptibilidad aumentada al daño genotóxico encontrado en lo referente a este polimorfismo en el presente estudio; a pesar, de que un efecto oxidante era previsto debido a la exposición a COVs como se ha documentado en lo referente a la exposición al benceno (Kim y col, 2004), el cual mostraría un incremento de daño en los individuos genotípicamente nulos.

La actividad de la enzima GSTT1 se encontró que está relacionada con la activación de procarcinógenos exógenos, tales como compuestos halogenados pequeños y contribuyen a la respuesta inflamatoria de la mucosa del esófago, que es un factor de riesgo importante para el adenocarcinoma en el tracto respiratorio, posiblemente a través de la síntesis de leucotrienos. Además, GSTT1 se ha demostrado que participa en la activación de trihalometanos (como el cloroformo), constituyendo la vía de toxicidad de esta clase de compuestos (Ross y Pegram, 2004 y 2003). El genotipo de GSTT1 nulo mostró una frecuencia de 9.5% entre nuestros donadores, más baja que la reportada en poblaciones asiáticas (Yang y col, 2005), en el rango de 20 hasta 53% y más baja que el reportado en poblaciones caucásicas donde el rango fue del 16 hasta el 22% (Geisler y Olshan, 2001); esta frecuencia es similar a lo reportado por Nelson y col (1995) para un grupo de Mexicano-Americanos, de 9.7%. La presencia de la enzima GSTT1 en los individuos estudiados significaría que son susceptibles a los efectos de la exposición a trihalometanos, tales como cloroformo y probablemente, cloruro de metileno; sin embargo, el polimorfismo de GSTT1 nulo correlacionó significativamente con frecuencias crecientes de MN y de NPB, aunque solamente 10 individuos presentaron este genotipo.

Por otro lado, la cantidad y el tipo de daño genotóxico encontrado en los donadores de las comunidades, indican la acción de los agentes tóxicos en sus células y la evidencia señala al ambiente como la más probable fuente de exposición. La caracterización de esa contaminación en el aire debe hacerse en futuros estudios. Los compuestos encontrados en los ríos Atoyac y Xochiac no están normadas por las leyes mexicanas (NOM-001-

SEMARNAT, 1996; NOM-002-SEMARNAT, 1996), las cuales no contemplan la presencia del cloroformo, cloruro de metileno, tolueno, índigo y anilina en descargas a aguas nacionales ni en descargas a aguas residuales; los COVs mencionados tampoco se contemplan en la norma para los contaminantes del aire, donde estos productos tóxicos alcanzarían concentraciones importantes en el ambiente; y en el caso de cloroformo, también sus productos de descomposición como el fosgeno y el cloruro de hidrógeno (ATSDR-ToxFAQs™, 1997). Aunque, la exposición a estos compuestos químicos en el ambiente ocupacional está bien regulado (NOM-010-STPS, 1999) en los niveles de 10 - 100 ppm (excepto índigo que no se incluye en la norma), la exposición potencial en la zona es crónica, con variaciones según la frecuencia y los volúmenes de las descargas, pero permanente, llevando a altas frecuencias de daño genotóxico complejo en poblaciones con características similares a las estudiadas en la presente investigación.

Dada la tendencia en el cambio de uso del suelo en áreas naturales con agua, y dado el hecho de que México es un país con recursos muy limitados de agua dulce, la situación encontrada en Tlaxcala debe ser una advertencia de lo que puede suceder en otros sitios donde están ocurriendo las mismas transformaciones. Las determinaciones en el aire permitirán caracterizar el régimen de exposición para los habitantes del área contribuyendo al control de los contaminantes y al rescate de este ambiente.

Finalmente, un resultado que vale la pena comentar es que a pesar de que la gran mayoría de los evaluados están sensibilizados sobre el daño que podría causar a su salud la

contaminación que expelen las fábricas, la de los ríos y descargas en la zona; y en la mayoría de casos lo asocian a patologías relacionadas al sistema respiratorio, ninguno sabe como debería prevenirse del daño, más aun cuando realizan alguna actividad de riesgo como al usar pesticidas por ejemplo. Esto nos indica que la información a nivel de los pobladores sobre la contaminación ambiental y su relación con la salud es poca; incluso el de las entidades educativas y autoridades pertinentes es aún insuficiente. Lo cual evidencia la necesidad de capacitar a los profesionales de las comunidades, del sector educación, fundamentalmente para que sean promotores de la difusión de este conocimiento con fines de prevención.

En cuanto a la norma mexicana respecto al área ambiental, específicamente para el caso de los compuestos orgánicos volátiles reportados en la zona de estudio, se recomienda normar previa estandarización de los límites máximos permisibles tanto en agua como en aire con base en estudios de toxicidad, con la finalidad de regular las descargas que emiten las industrias en las zonas geográficas como el descrito en el presente estudio.

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

Se encontraron tres clases de riesgos a la salud: la exposición ocupacional a productos químicos tóxicos y carcinógenos en la industria petroquímica, lavanderías y en la agricultura; la exposición ambiental a los compuestos orgánicos volátiles provenientes de las descargas industriales que llegan a los ríos Atoyac y Xochiac y al sistema de alcantarillado. Por último, el estilo de vida individual (fumar, beber y un índice de masa corporal elevado).

Los evaluados de las regiones 1 y 2 presentaron la mayor frecuencia de células con 1 MN, con más de 1 MN y con 1 CHB; y los hombres que viven en la región 2 presentaron las frecuencias más altas de NPB.

El 57% y el 9.5% de los evaluados presentaron polimorfismos de la enzima GSTM1 nulo y de GSTT1 nulo respectivamente. Las personas con polimorfismo de GSTT1 nulo mostraron asociación con la frecuencia total de MN, con las células con 1 MN y las NPB.

El daño genotóxico se distribuyó de manera diferente en las regiones estudiadas, siendo las más afectadas aquéllos que estaban cerca a los ríos Atoyac y Xochiac, lo cual indicaría un efecto probable a la exposición a los contaminantes llevados por estos ríos que cruzan a través de la zona de estudio.

CAPITULO IX. PROPUESTAS

Caracterizar la calidad de aire del área evaluada, a fin de evidenciar los riesgos de exposición por los compuestos orgánicos volátiles reportados en el presente trabajo.

Diseñar estudios que evalúen el tipo de alimentación de los pobladores a fin de determinar los problemas asociados a la deficiencia de nutrientes como la vitamina B₁₂ en poblaciones que habitan en lugares con similar característica como la estudiada.

Establecer estudios en modelos animales para evaluar a los contaminantes como causa de daño celular, particularmente en enfermedades sanguíneas.

Realizar estudios analíticos tipo casos y controles para correlacionar las asociaciones descritas en el presente trabajo a fin de evidenciar los factores de riesgo para los problemas de salud que se reportan en la zona y establecer las medidas que puedan proteger a los pobladores que habitan en lugares con similar característica como la estudiada.

Realizar estudios de evaluación de riesgos de exposición ambiental a fin de generar información relevante para el manejo adecuado de programas de prevención de las enfermedades en los pobladores de la zona de estudio.

CAPITULO X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aardema MJ, Albertini S, Arni P, Henderson LM, Kirsch-Volders M, Mackay JM, Sarrif AM, Stringer DA and Taalman RD. *Aneuploidy: a report of an ECETOC task force*. Mutat Res. 1998, 410 (1): 3-79.
- Albalak R, Keeler GJ, Frisancho AR and Haber H. *Assessment of PM₁₀ concentrations from domestic biomass fuel combustion in two rural Bolivian highland villages*. Environ Sc Technol. 1999, 33 (15): 2505-9.
- Albertini RJ, Nicklas JA and O'Neill JP. *Future research directions for evaluation human genetic and cancer risk from environmental exposures*. Environ Health Perspect. 1996, 104 (suppl 3): 503-10.
- ATSDR. *Case Studies in Environmental Medicine. Toluene Toxicity*. February 2001. Continuing Education Coordinator, Atlanta.
- ATSDR. Fact Sheet: *Cancer*. August 2002.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/COM/cancer-fs.html>
- ATSDR-MMG. Medical Management Guidelines. *Aniline*. November 2005.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg171.html>
- ATSDR-ToxFAQs. *Hydrogen Peroxide*. April 2002.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts174.html>
- ATSDR-ToxFAQs. *Sodium hydroxide*. April 2002.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts178.html>

- ATSDR-ToxFAQs™. *Benzene*. September 2005.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts3.html>
- ATSDR-ToxFAQs™. *Chloroform*. September 1997.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts6.html>
- ATSDR-ToxFAQs™. *Hydrogen Peroxide*. April 2002.
Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts174.html>
- Bell D and Pittman G. *Genotype Analysis*. PCR Protocols in Molecular Toxicology. 2000.
- Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, Brockmoller J, Clapper ML, Daly A, Dolzan V, Ford J, Gaspari L, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kihara M, Kremers P, Le Marchand L, London SJ, Nazar-Stewart V, Onon-Kihara M, Rannug A, Romkes M, Ryberg D, Seidegard J, Shields P, Strange RC, Stucker I, To-Figueras J, Brennan P and Taioli E. *Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk*. Carcinogenesis. 2002, 23 (8): 1343-50.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Muller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A and Zijno A. *HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring*

criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. Environ Mol Mutagen. 2001, 37 (1): 31-45.

- Bornhard EM and Herbold BA. *Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats.* Crit Rev Toxicol. 2005, 35 (10): 783-835.
- Bruce NB, Perez-Padilla R and Albalak R. *Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge.* Bull World Health Organ. 2000, 78 (9): 1078-92.
- Caporaso NE. *Why have we failed to find the low penetrance genetic constituents of common cancers?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002, 11 (12): 1544-9.
- CDC. Chemical emergencies. *Facts about Paraquat.* May 2003.
Website: <http://www.bt.cdc.gov/agent/paraquat/basics/facts.asp>
- Centro "Fray Julián Garcés". *Daños a la salud por la contaminación del Río Atoyac.* Informe especial en: Segundo Informe 2004, de la toma de conciencia a la toma de posición.
- Chen CL, Liu Q and Relling MV. *Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks.* Pharmacogenetics. 1996, 6 (2): 187-91.
- CICOPLAFEST. *Catálogo de Plaguicidas.* Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Secretaría de Salud; Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales; Secretaría de Economía. México D.F., 2004.

- Coughlin S and Hall I. *Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer: a HuGE review*. Genet Med. 2002, 4 (4): 250-7.
- Countryman PI and Heddle JA. *The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes*. Mutat Res. 1976, 41 (2-3): 321-32.
- EPA. *Ground Water & Drinking Water*. Consumer Factsheet on: 2,4-D. March 2006. Website: <http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-soc/24-d.html>
- EPA. *Pesticides: Organophosphates. Metamidophos Facts*. August 2002. Website: http://www.epa.gov/REDS/factsheets/metamidophos_ired_fs.htm
- Falck GC, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L and Norppa H. *Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers*. Mutat Res. 1999, 441 (2): 225-237.
- Fenech M and Crott JW. *Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay*. Mutat Res. 2002, 504 (1-2): 131-6.
- Fenech M and Morley AA. *Measurement of micronuclei in lymphocytes*. Mutat Res. 1985, 147 (1-2): 29-36.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E and HUMAN Micronucleus project. *HUMAN project: detailed description of the scoring*

criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res. 2003, 534 (1-2): 65-75.

- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E and Bonassi S. *The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans.* Mutat Res. 1999, 428 (1-2): 271-83.
- Fenech M. *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations.* Mutat Res. 1993, 285 (1): 35-44.
- Fenech M. *The in vitro micronucleus technique.* Mutat Res. 2000, 455 (1-2): 81-95.
- Geisler SA and Olshan AF. *GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE Review.* Am J Epidemiol. 2001, 154 (2): 95-105.
- Gemma S, Testai E, Chieco P and Vittozzi L. *Bioactivation, toxicokinetics and acute effects of chloroform in Fisher 344 and Osborne Mendel male rats.* J Appl Toxicol. 2004, 24 (3): 203-10.
- González A, Ramírez V, Cuenca P y Sierra R. *Polimorfismos en los genes de desintoxicación CYP1A1, CYP2E1, GSTT1 y GSTM1 en la susceptibilidad al cáncer gástrico.* Rev Biol Trop. 2004, 52 (3): 591-600.
- Gregus Z and Klaassen C. *Mechanisms of toxicity.* In: Klaassen C and Watkins J (eds.) Casarett and Doull's Essentials of Toxicology. McGraw-Hill, USA. 2003, Pp. 21-45.

- Guengerich FP. *Metabolism and genotoxicity of dihaloalkanes*. Adv Pharmacol. 1994, 27: 211-36.
- Guttmacher AE and Collins FS. *Genomic medicine-a primer*. N Engl J Med. 2002, 347 (19): 1512-20.
- Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem. 1974, 249 (22): 7130-9.
- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC and Wolf CR. *Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer*. Carcinogenesis. 1997, 18: 641-4.
- Hayashi S, Watanabe J and Kawajiri K. *High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes*. Jpn J Cancer Res. 1992, 83 (8): 866-70.
- Hayes JD and Pulford DJ. *The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance*. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1995, 30 (6): 445-600.
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparrys P and MacGregor JT. *Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future*. Environ Mol Mutagen. 1991, 18 (4): 277-91.

- Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S and Vainio H. *The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung.* Carcinogenesis. 1993, 14 (7): 1479-81.
- Hugh-Jones NC and Wickramasinghe SN. *Macrocytosis and Macrocytic Anaemia.* In: Lectures on Haematology, 6th Edition. Blackwell Sci., U.K. 1996, Pp. 96-122.
- Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Hautefeuille A, Donato F, Gelatti U, Spaliviero M, Placidi D, Carta A, Scotto di Carlo A and Porru S. *GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population.* Int J Cancer. 2004, 110 (4): 598-604.
- Jongen WM. *Metabolic activation of promutagenic factors in synthetic indigo by mammalian microsomes.* Carcinogenesis. 1982, 3 (11): 1321-3.
- Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, Lang NP and Kadlubar FF. *The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer.* Environ Health Perspect. 1992, 98: 87-94.
- Kihara M, Noda K and Kihara M. *Distribution of GSTM1 null genotype in relation to gender, age and smoking status in Japanese lung cancer patients.* Pharmacogenetics. 1995, 5: S74-9.
- Kim SY, Choi JK, Cho YH, Chung EJ, Paek D and Chung HW. *Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms.* Pharmacogenetics. 2004, 14 (7): 453-63.

- Klaassen C. *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. 1996. Sixth edition by Curtis D. Klaassen.
- Lara A, García E y Aguilar A. *Casos médicos y estudios biológicos*. En: Morales E (ed.) *Ambiente y Derechos Humanos*. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local A.C. Tlaxcala, Tlax. 2004, Pp. 67-78.
- Lazarus P, Sheikh SN, Ren Q, Schantz SP, Stern JC, Richie JP and Park JY. *p53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use*. *Carcinogenesis*. 1998, 19: 509-14
- Lin HJ, Han CY, Bernstein DA, Hsiao W, Lin BK and Hardy S. *Ethnic distribution of the glutathione transferase mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility*. *Carcinogenesis*. 1994, 15 (5): 1077-81.
- Ma C, Martin S, Trask B and Hamlin JL. *Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells*. *Genes Dev*. 1993, 7 (4): 605–20.
- Marsh GA, Botta S, Martin MV, McCormick WA and Guengerich FP. *Formation and mass spectrometric analysis of DNA and nucleoside adducts by s-(l-acetoxymethyl) glutathione and by glutathione s-transferase mediated activation of dihalomethanes*. *Chem Res Toxicol*. 2004, 17 (1): 45-54.
- McClintock B. *The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays*. *Genetics*. 1941, 26 (2): 234-82.

- McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, Richert-Boe KE and Henner WD. *Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995, 4 (6): 589-94.
- Moeller D. *Environmental health*. Harvard University Press. 2005. Third edition.
- Montero R, Serrano L, Davila V, Segura Y, Arrieta A, Fuentes R, Abad I, Valencia L, Sierra P and Camacho R. *Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment*. *Environ Mol Mutagen*. 2003, 42 (3): 216-22.
- Montero-Montoya R, Serrano L and Ostrosky-Wegman P. *In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker*. *Mutat Res*. 1997, 391 (3): 135-41.
- Muller K, Kasper P and Muller L. *An assessment of the in vitro hepatocyte micronucleus assay*. *Mutat Res*. 1993, 292 (3): 213-24.
- National Heart, Lung and Blood Institute. *Obesity Education Initiative*.
Website: <http://nhlbisupport.com/bmi/>
- Navarro I, Flores E, Valladares R. *Estudio Ambiental*. Informe. En: Morales Eduardo (ed.) *Ambiente y Derechos Humanos*. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local A.C. Tlaxcala, Tlax. 2004, Pp. 27-59.
- Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X et al. *Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta*. *Carcinogenes*. 1995, 16 (5): 1243-45.

- NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, NIOSH Publication No. 2005-151: *Methyl alcohol*. Website: <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0397.html>
- NIOSH. Pocket Guide to Chemical Hazards, NIOSH Publication No. 2005-151: *Paraquat*. Website: <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0478.html>
- NOM-001-SEMARNAT-1996. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Website: <http://portal.semarnat.gob.mx/semarnat/portaLeyes y Normas>.
- NOM-002-SEMARNAT-1996. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Website: <http://portal.semarnat.gob.mx/semarnat/portaLeyes y Normas>.
- NOM-010-STPS-1999. Secretaría del Trabajo y Previsión Social. Subsecretaría de Previsión Social: Dirección General de Seguridad y Salud en el Trabajo. Website: <http://www.stps.gob.mx/> Marco Jurídico.
- Norppa H, Luomahaara S, Heikonen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L and Lindholm C. *Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens*. Environ Health Perspect. 1993, 101 (Suppl 3): 139-43.
- Pavanello S and Clonfero E. *Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms*. Mutat Res. 2000, 463 (3): 285-308.
- Porta M. *The genome sequence is a jazz score*. Int J Epidemiol. 2003, 32 (1): 29-31.
- Prody C, Dreyfus P, Zamir R, Zakut H and Soreq H. *De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorus insecticides*. Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86 (2): 690-4.

- Rannug U, Bramstedt H and Nilsson U. *The presence of genotoxic and bioactive components in indigo dyed fabrics-a possible health risk?*. *Mutat Res.* 1992, 282 (3): 219-25.
- Ridolfo B and Stevenson C. *The quantification of drug-caused mortality and morbidity in Australia, 1998.* Australian Institute of Health and Welfare, Canberra. 2001.
- Ross MK and Pegram RA. *Glutathione transferase theta 1-1-dependent metabolism of the water disinfection byproduct bromodichloromethane.* *Chem Res Toxicol.* 2003, 16 (2): 216-26.
- Ross MK and Pegram RA. *In vitro biotransformation and genotoxicity of the drinking water disinfection byproduct bromodichloromethane: DNA binding mediated by glutathione transferase theta 1-1.* *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004, 195 (2): 166– 81.
- Rozman K and Klaassen C. *Absorption, distribution and excretion of toxicants.* In: Klaassen C and Watkins J (eds.) *Casarett and Doull's Essentials of Toxicology.* McGraw-Hill, USA. 2003, Pp. 59-70.
- Salama SA, Abdel-Rahman SZ, Sierra-Torres CH, Hamada FA and Au WW. *Role of polymorphic GSTM1 and GSTT1 genotypes on NNK-induced genotoxicity.* *Pharmacogenetics.* 1999, 9 (6): 735-43.
- Seidegard J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG and Beattie EJ. *Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study.* *Carcinogenesis.* 1990, 11 (1): 33-6.

- Serrano-Garcia L and Montero-Montoya R. *Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events*. Environ Mol Mutagen. 2001, 38 (1): 38-45.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM and Dowd CA. *Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily*. Biochem J. 2001, 360 (Pt 1): 1-16.
- Shimizu N, Itoh N, Utiyama H and Wahl GM. *Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase*. J Cell Biol. 1998, 140 (6): 1307-20.
- Shimizu N, Shimuara T and Tanaka T. *Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei*. Mutat Res. 2000, 448 (1): 81-90.
- Shimura M, Onozuka Y, Yamaguchi T, Hatake K, Takaku F and Ishizaka Y. *Micronuclei formation with chromosome breaks and gene amplification caused by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus*. Cancer Res. 1999, 59 (10): 2259-64.
- Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Warner M, Biggs ML, Moore L and Smith MT. *Rationale for selecting exfoliated bladder cell micronuclei as potential biomarkers for arsenic genotoxicity*. J Toxicol Environ Health. 1993, 40 (2-3): 223-34.
- Sorensen M, Autrup H, Tjonneland A, Overvad K and Raaschou-Nielsen O. *Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer*. Int J Cancer. 2004, 110 (2): 219-24.

- Srám RJ. *Impact of air pollution on reproductive health*. Environ Health Perspect. 1999, 107 (11): A542-43.
- Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR and Pillai MR. *Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer*. Oral Oncol. 2001, 37 (7): 593-8.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. *Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations*. Nat Rev Genet. 2002, 3 (5): 391-7.
- Thompson Gale. *How products are made*-Vol. 6.
Website: www.madehow.com/Volume-6/Indigo.html
- Toledo F, Le Roscouet D, Buttin G and Debatisse M. *Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification*. EMBO J. 1992, 11 (7): 2665–73.
- Umegaki K and Fenech M. *Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils*. Mutagenesis. 2000, 15 (3): 261–9.
- Vinceti M, Fantuzzi G, Monici L, Cassinadri M, Predieri G and Aggazzotti G. *A retrospective cohort study of trihalomethane exposure through drinking water and cancer mortality in northern Italy*. Sci Total Environ. 2004, 330 (1-3): 47-53.
- Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, Huang W, Xia Z and Hu G. *Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning*. Environ Health Perspect. 2002, 110 (12): 1213-8.

- Warholm M, Rane A, Alexandrie AK, Monaghan G and Rannug A. *Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population*. Pharmacogenetics. 1995, 5 (2): 252-4.
- Wiencke JK, Pemble S, Ketterer B and Kelsey KT. *Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995, 4 (3): 253-9.
- Woodruff TJ, Grillo J and Schoendorf KJ. *The relationship between selected causes of postneonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States*. Environ Health Perspect. 1997, 105 (6): 608-612.
- Yang CX, Matsuo K, Wang ZM and Tajima K. *Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: a meta-analysis of the literature*. World J Gastroenterol. 2005, 11 (17): 2531-8.