



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE DAÑO AL  
ADN EN SANGRE PERIFÉRICA DE INDIVIDUOS  
EXPUESTOS A METALES EN EL AGUA DE  
BEBIDA EN LA POBLACIÓN DE HUAUTLA,  
MORELOS.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

**BIOL. PATRICIA MUSSALI GALANTE**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**

**Al apoyo recibido por en Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de becario 102684.**

**A los miembros del comité tutorial y jurado.**

**Dra. Teresa Fortoul van der Goes.**

**Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.**

**Dr. Emilio Rojas del Castillo.**

**Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**

**Dr. Héctor Mayani**

**ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO**

**..... A EFRAÍN**

**.....A HANNAH LIZETTE**

**.....AL BEBE QUE VIENE**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A LOS MIEMBROS DE MI COMITÉ TUTORAL Y JURADO...**

**A mi tutora, la Dra. Teresa Fortoul van der Goes**, por todo el apoyo recibido durante este tiempo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y darme infinitas oportunidades.

**Al Dr. Mario Altamirano Lozano** por enseñarme la técnica de aberraciones cromosómicas, por tantas explicaciones, pero sobretodo por haber motivado la realización de este proyecto.

**Al Dr. Emilio Rojas del Castillo** por una vida de enseñanzas...por ser mi gran ejemplo a seguir, por los comentarios tan valiosos que enriquecieron este trabajo, por los grandes consejos y las buenas discusiones, ¡¡GRACIAS!!!

**A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo** por su buena disposición y su paciencia, por su revisión minuciosa y excelentes comentarios al escrito del trabajo, ¡por transmitir el gusto por esta disciplina tan maravillosa!

**Al Dr. Hector Mayani** por la revisión del escrito y los comentarios enriquecedores acerca del proyecto ¡¡Muchas Gracias!!

### **A LOS MIEMBROS DE LA UAEM, ESPECIALMENTE AL CEAMISH (CENTRO DE EDUCACIÓN AMBIENTAL E INVESTIGACIÓN, SIERRA DE HUAUTLA).**

**Dr. Efraín Tovar Sánchez**, por ser el motor principal de este proyecto, por la idea original, por hacer posible el acceso a las poblaciones de estudio, por ir de puerta en puerta hasta obtener las muestras, por convencer a la gente de que diera las muestras, por regalarme su valioso tiempo para ir a TODAS las salidas de campo, por los infinitos comentarios y consejos al proyecto, por el análisis de los datos, por la revisión de la tesis, por todo el descanso robado, porque siempre tuviste una solución a todos los problemas...en fin... por compartir y hacer realidad todos y cada uno de mis caprichos académicos... **MIL GRACIAS!!!**

**A Elgar Castillo, Juan Carlos Juárez y Rolando Ramírez** por su participación en la realización del proyecto y por su ayuda en la toma de muestras. Mil Gracias.

### **A HUAUTLA Y AJUCHITLÁN, MORELOS.**

**A la enfermera Nelly y a mis donadores** porque sin ellos nada de esto existiría, a la buena disposición de los pobladores de escucharnos, permitirnos la toma de muestras y brindarnos un espacio para la realización del protocolo.

**AL LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.** Especialmente a la **Dra. Liliana Saldivar** y a la **Quim. Guadalupe Espejel** por la enorme ayuda en la medición de los metales en todas las muestras.

A la **Dra. Luz María del Razo** por su buena disposición y ayuda en la medición de arsénico en los individuos muestreados.

**Al Biol. Armando Zepeda** por la invaluable ayuda con las fotos de la tesis, por el enorme tiempo y esfuerzo dedicados a ellas y por sus continuos elogios acerca del proyecto. MIL GRACIAS!!

**A Mónica Martínez Pacheco y Edgar Reyna Rosas** por la toma de muestras de agua y sangre. Especialmente a Moni por ayudarme siempre, por ser mi fiel compañera, excelente alumna y divertida cómplice. Gracias Moni, te quiero mucho!!

**A mis compañeros del Lab...** Lauris, Patty B, Michelle, Rubén, Nayeli, Estefania, Silvia A, Carlos, Nelly, Paulina, Martha U, Maricarmen e Irene.

Quisiera agradecer de manera muy especial a mis grandes amigos que me han acompañado desde el inicio de este proyecto.....Adriana, Vero, Judith y Armando Zepeda, quienes han sido mi fortaleza durante los momentos de oscuridad e incertidumbre, así como mis cómplices durante los buenos momentos, gracias por escucharme con enorme paciencia y gran cariño. Nunca los olvidaré.

**A Irene, Paty Roa, Maricarmen, Paco, Alfonso, Maria Elena, Gerardo y el Lic. Eleodoro Guzmán** por ayudarme siempre con las necesidades técnicas.

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

**A dios... por darme la vida y salud y permitirme vivir hasta este momento, por darme una vida maravillosa y dejarme hacer lo que mas me gusta (ciencia), pero sobretodo por llenarme de bendiciones con la familia mas maravillosa que un ser pueda anhelar.**

**A mi misma... “Tu ves las cosas y preguntas ¿por qué? Pero yo sueño cosas que nunca han sido y me pregunto ¿por qué no? (Bernard Shaw).**

**A Efraín...**al complemento perfecto, inigualable, único e incondicional, al ser mas maravilloso y al hombre, persona, amigo e investigador que mas admiro en la vida. Al mejor esposo...al mejor padre. Entre mas pasa el tiempo, mas me convengo de que mi vida al lado tuyo es la felicidad completa. Gracias por mi maestría, es toda tuya. TE SUPERAMO.

**A Hannah Lizette....** Porque ni un posgrado, ni una tesis, ni mil maestrías podrían enseñarme lo verdaderamente importante de la vida, TU eres mi mayor enseñanza de esta vida y todas las demás. La luz de mi existencia, mi fiel compañera, pero sobretodo mi felicidad diaria y eterna. Eres mi mayor orgullo. TE AMO Y AMARÉ SIEMPRE liris!!

Gracias por aguantar mi ritmo, porque aunque no te acuerdes tu me acompañabas al Lab de noche...a los experimentos nocturnos, por todo el tiempo robado....Gracias pioja, TE AMO!!!!

**Al nuevo integrante...**a mi otro gran pequeño motivo de alegría y felicidad. A quien aún no conozco y sin embargo ya lo llevo en mi corazón y en todos mis pensamientos. Gracias por hacer que quiera aún mas a tu papá y a tu hermana. Te amo y amaré siempre.

**A mis padres** por darme la vida, y ser parte importante de cada uno de mis logros, los amo con todo mi corazón. **Especialmente a mi mamá,** la mejor del mundo, ser digno de admiración. Mama, sin los conocimientos y fortaleza que me has transmitido no sería quien soy. Gracias, te superamo.

**A mi abuelita Renne** por quererme tanto, eres un gran ejemplo!!!. Gracias por estar conmigo siempre y no olvidarte de mí. Te quiero muchisisisismo.

**A la familia Tovar-Sánchez** por todo el apoyo brindado, sobretodo por el cariño y la gran ayuda con Hannah. Los quiero mucho!!

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
La minería en México.....	3
Contaminación de cuerpos de agua por actividad minera.....	3
El caso de Huautla, Morelos.....	4
Metales .....	6
Cadmio... ..	6
Plomo.....	6
Cobre .....	6
Zinc .....	7
Arsénico.....	7
Metabolismo del arsénico .....	9
Exposición oral al arsénico y sus efectos en la salud: un problema de salud pública a nivel mundial .....	10
Pruebas para evaluar genotoxicidad: biomarcadores .....	11
Aberraciones cromosómicas.....	13
Aberraciones cromosómicas estructurales .....	13
Aberraciones cromosómicas como biomarcador de efecto temprano.....	15
Aberraciones cromosómicas y genotoxicidad del arsénico en poblaciones humanas.....	15
JUSTIFICACIÓN .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	18
OBJETIVOS PARTICULARES .....	18
METODOLOGÍA .....	19
Población expuesta .....	19
Población testigo.....	19
Consentimiento informado.....	20
Cuestionario .....	22
Criterios de inclusión .....	22
Toma de muestras de agua en la población testigo y expuesta .....	22
Toma de muestras de sangre periférica en la población testigo y expuestas.....	23
Medición de metales en agua y sangre periférica de la población testigo y expuesta.....	23
Cultivo de linfocitos humanos .....	24
Índice mitótico y de replicación.....	24
Aberraciones cromosómicas.....	25
Análisis de resultados .....	25

RESULTADOS.....	27
Metales en el agua de bebida de la población testigo y expuesta.....	27
Metales en sangre periférica de individuos de la población testigo y expuesta.....	28
Índice mitótico y de replicación.....	29
Aberraciones cromosómicas.....	30
Relación entre la concentración de arsénico en sangre periférica y la frecuencia de aberraciones cromosómicas.....	30
Efecto de la edad, consumo de tabaco e ingesta de alcohol sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas.....	46
DISCUSIÓN.....	47
Presencia del arsénico en el agua de bebida de Huautla, Morelos.....	47
Concentración de arsénico en sangre: ¿un biomarcador de exposición útil?.....	48
Arsénico en sangre y agua de bebida.....	48
Relación entre la concentración de arsénico en sangre periférica y la frecuencia de aberraciones cromosómicas.....	50
Índices mitóticos y de replicación.....	51
Inducción de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en individuos expuestos a arsénico mediante agua de bebida.....	53
CONCLUSIONES.....	60
LITERATURA CITADA.....	62

## RESUMEN

Mussali-Galante, P. 2008. Estudio sobre la inducción de daño al ADN en sangre periférica de individuos expuestos a metales en al agua de bebida, en la población de Huautla, Morelos. Tesis de Maestría (Biología Experimental). Universidad Nacional Autónoma de México.

La minería es una actividad de gran importancia económica en México, una de las consecuencias de esta actividad, debido a la explotación de los recursos metálicos, es la producción de grandes cantidades de residuos que han generado varios sitios contaminados a lo largo de todo el país, los cuales pueden contener elementos potencialmente tóxicos –como los metales– que logran contaminar los recursos naturales. Un ejemplo de ello se localiza en Huautla, Morelos, que es una zona minera por excelencia, donde se estima que existen alrededor de 780,000 toneladas de residuos mineros en los cuales los principales contaminantes son el plomo y el arsénico, además de otra cantidad de material no procesado rico en Pb, Cd y Mn. Estos desechos se encuentran a la intemperie y al borde de una serie de ríos que desembocan en el Río Amacuzac. Aunado a lo anterior, los pobladores de Huautla se abastecen de “agua de bebida” de un cuerpo de agua al interior de la mina “Pájaro verde”. Por lo anterior, se decidió medir la concentración de metales en el agua de la mina “Pájaro verde” y en sangre periférica de los pobladores de Huautla. Asimismo, se evaluó la frecuencia de aberraciones cromosómicas de estos mismos individuos.

Los resultados obtenidos demuestran que el agua proveniente de la mina “Pájaro Verde” en el poblado de Huautla, Morelos, esta contaminada por arsénico, que rebasa las normas mexicanas e internacionales. La concentración de arsénico total en sangre periférica de individuos expuestos corrobora esta exposición. El arsénico indujo aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos y estas se correlacionaron positiva y significativamente con la concentración de As en sangre, apoyando a este parámetro como un marcador útil de exposición interna. Finalmente, ya que las aberraciones cromosómicas son el biomarcador más aceptado para estimar riesgo en poblaciones humanas, podemos decir que la población de Huautla, Morelos, está en riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el arsénico y sobre todo cáncer, siendo éste el primer estudio que refiere contaminación por arsénico en la zona y riesgo a la salud en pobladores expuestos, un hecho que necesita de atención inmediata.

## ABSTRACT

Mining industry in Mexico is one of the most important economic activities, as a consequence of the exploitation of mineral resources, a great amount of toxic wastes have been discharged into the environment, generating a number of contaminated sites along the country which may contain potential toxic elements –mainly metals– that pollute natural resources. An example of this, is located at Huautla, Morelos, a mining district where it is estimated that there are about 780,000 tons of toxic wastes where the main contaminants are lead and arsenic, and the majority of them rich in Pb, Mn and Cd that haven't been processed or neutralized. These residues were left in open air and near lakes that disembogues at the Amacuzac river. In addition, the drinking water used by Huautla settlers comes directly from inside the mine “Pájaro Verde”. For these reasons, we decided to evaluate the presence of metal residues in drinking water, as well as the metal concentration in whole blood samples taken from Huautla settlers. Also, we measured the frequency of chromosomal aberrations from these same individuals.

Our results demonstrate that the water that comes from the mine “Pájaro Verde” in Huautla, Morelos, is contaminated with arsenic and that these concentrations are above the national and international standards. Total arsenic levels in whole blood samples from the exposed individuals corroborate this exposure. Arsenic was capable of inducing chromosomal aberrations in lymphocytes from exposed individuals and they were positively and significantly correlated with arsenic concentrations in whole blood samples, supporting the idea that total arsenic concentrations are a useful biomarker of internal exposure. Finally, as chromosomal aberrations is the most accepted technique when estimating risks of human exposures, we can conclude that Huautla settlers are at risk of developing arsenic-related diseases and cancer, being this study the first report of arsenic contamination and human health hazard in this particular region, a fact that urgently needs further evaluation.

## INTRODUCCIÓN

### LA MINERÍA EN MÉXICO

La actividad minera en México comenzó en el siglo XI con la producción de oro y cobre. En 1546 se explotan los primeros yacimientos mineros en Zacatecas y posteriormente el siglo XVIII registra la época de esplendor de la minería mexicana, lo que posiciona a México como una potencia minera. Actualmente, las 32 entidades federativas del país registran yacimientos mineros y a nivel mundial, México destaca en la producción de Oro (Au), Plata (Ag), Plomo (Pb), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Fierro (Fe). Ocupa el tercer lugar en la producción de Plata, quinto en Plomo y sexto en Molibdeno y Zinc (Mejía *et al.*, 1999; INEGI, 2004).

La minería ha llegado a convertirse en una actividad de gran importancia económica en algunos estados de nuestro país, como: Guanajuato, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo y Morelos (Mejía *et al.*, 1999).

Debido al procesamiento de los recursos minerales, se han provocado grandes cantidades de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que han generado gran cantidad de sitios contaminados a lo largo de todo el país, los cuales pueden contener elementos potencialmente tóxicos que logran contaminar los recursos naturales (Salomons, 1995).

### CONTAMINACIÓN DE CUERPOS DE AGUA POR ACTIVIDAD MINERA

Los desechos generados por esta actividad, conocidos como *colas* (tailings), relaves o jales; son creados durante los procesos de recuperación de los metales a partir de minerales metalíferos, después de moler las rocas que los contienen y mezclar las partículas que se forman con agua y pequeñas cantidades de sustancias químicas que facilitan la liberación de los metales (Vega, 1999; Marin-Guirao *et al.*, 2005).

Existen relaves que contienen elementos potencialmente tóxicos (EPT) como el arsénico, cromo, plomo y cadmio. Los EPTs provienen del drenaje de las pilas de acopio del mineral, de los desechos y también de las “aguas de mina” (Salomons, 1995; Vega 1999).

En condiciones normales de operación de jales mineros, y como consecuencia de tormentas y derrames, o bien, por un manejo inadecuado de éstos, puede ocurrir la contaminación de los cuerpos de abastecimiento de agua, con el posible deterioro de la calidad de la misma, sobre todo si los relaves tienen un pH ácido o un contenido de metales que pueden volver el agua temporal o permanentemente no apta para el

consumo. Por lo general, la afectación de los cuerpos de agua superficiales suele ser sólo local, pero en algunos casos puede alcanzar distancias alejadas varios kilómetros del lugar en el que ocurre la contaminación. También, puede producirse la contaminación de los mantos freáticos como consecuencia de las filtraciones en las presas (INEGI, 2000).

Existen reportes que indican que este tipo de contaminación tiene consecuencias en diferentes niveles de organización, afectando desde la biota hasta los individuos que habitan cerca de la zona contaminada, o bien, que utilizan los recursos contaminados para diversos fines, principalmente por la presencia de metales pesados (Vega, 1999; Marin-Guirao *et al.*, 2005).

Los metales pesados se definen como aquellos elementos que tienen una densidad mayor de 5 g/cm<sup>3</sup>. Generalmente son 12 los utilizados más comúnmente y descargados al ambiente como parte de una serie de residuos: Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn y Zn (EPA, 1997). Dos de los metales encontrados con más frecuencia en las zonas mineras del país son el arsénico y el plomo, junto con el cadmio en algunas de ellas (SEMARNAT, 2004). Actualmente, en México, se desconoce el número de sitios contaminados como consecuencia de esta actividad, pero se estima que asciende a varios miles cuyo riesgo potencial es desconocido (SEMARNAT, 2002). Un ejemplo de ello, donde se encuentran varias regiones mineras abandonadas y una gran cantidad de desechos producidos por esta actividad, lo constituye el estado de Morelos, específicamente el poblado de Huautla (SEMARNAT, 2004; 2005).

## **EL CASO DE HUAUTLA, MORELOS**

El estado de Morelos, se ha caracterizado por presentar varios distritos mineros que se han explotado por varias décadas. Las minas más comunes han sido de Ag, Pb y Zn, siendo los distritos mineros más explotados en el estado, por sus contenidos de minerales metálicos, los que se ubican en el municipio de Tlaquiltenango. Durante los siglos XVIII y XIX y hasta 1950 se explotaron 6 minas en esta región. Desde 1993 se encuentran cerradas y se localizan dentro de una zona conocida como “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” decretada como tal en 1999 (INEGI, 2004). Esta reserva protege cerca de 59,000 hectáreas de selva baja caducifolia, ecosistema que cuenta con una gran biodiversidad de flora y fauna (INEGI, 2002).

Dentro de esta zona se encuentra el poblado de Huautla, el cual presenta una riqueza natural en minerales azufrados de Pb y Ag, donde se estima que existen

alrededor de 780 mil toneladas de residuos mineros en los cuales los principales contaminantes son el plomo, arsénico, cadmio, zinc y cobre, además de otra cantidad de material no procesado rico en Pb, Cd, Mn y Zn (SEMARNAT, 2005). Existen dos jales en la zona localizados geográficamente en los 18°, 26'N y 99° 01'O, a escasos 500 m de la población, estos desechos se encuentran a la intemperie y al borde del "Arroyo Chico", el cual se junta con los arroyos *Juchitlán*, *Salitre* y *Atlipa*, para formar el "Arroyo Grande" que desemboca en el Río Amacuzac (SEMARNAT, 2005). Por lo que, la lixiviación de estos metales hacia los cuerpos de agua superficiales y subterráneos y su transporte a otras regiones, tiene una gran probabilidad de ocurrir, sobretodo durante la temporada de lluvias. En un estudio realizado por la SEMARNAT (2004, 2005) en conjunto con el Instituto Nacional de Ecología, se determinó que los jales de Huautla contenían elevadas concentraciones de plomo (hasta 3340 mg/kg) y arsénico (hasta 274 mg/kg) revasando los límites máximos permisibles propuestos por la PROFEPA para As (20 mg/kg. Suelo residencial y 40 mg/kg suelo industrial) y para Pb (200 mg/kg y suelo residencial y 1500 mg/kg suelo industrial). Así como también se encontraron concentraciones elevadas de cobre, zinc y cadmio.

Por otra parte, entre los minerales predominantes en la localidad de Huautla, se encuentran: acantita, calcita, calcocita, galena y plata, la cual, además de los minerales anteriores, se encuentra normalmente asociada con cobre, arsénico, cinabrio, cobaltita y barita (The Mineral Database, 2004). De esta manera, los altos contenidos de Pb y As encontrados en los residuos de la zona, pueden relacionarse directamente con el tipo de minerales explotados.

Otro aspecto de gran importancia y que probablemente contribuye en gran medida a la contaminación del agua por metales pesados, es que los pobladores de Huautla obtienen el "agua de consumo" o "agua de bebida" de un cuerpo de agua localizado en el interior de la mina "Pájaro Verde", la cual es entubada desde el interior de la mina hasta el depósito principal, donde el agua es clorada una o dos veces al año y del depósito es distribuida a las casas. Aproximadamente el 90% de los pobladores se abastece de esta manera (Rondán-Antuna, 2003).

Por todo lo anterior, se presume que el plomo y el arsénico podrían ser los principales contaminantes del agua en esta región, así como en menor medida el cadmio, cobre y zinc, lo cual representaría un riesgo importante para la salud de los pobladores.

## **METALES**

El impacto de los metales sobre los organismos se da principalmente por la ausencia de mecanismos eficientes para eliminarlos de los órganos blanco, y éstos se han clasificado entre los elementos más tóxicos que se conocen, por lo que su uso implica un riesgo potencial para la salud humana, así como para la mayoría de los organismos (Fortoul y Mussali-Galante, 2007).

**CADMIO:** Descubierto en 1817, este metal es un subproducto de la explotación minera de plomo y zinc y ésta es considerada como una de las principales fuentes de contaminación ambiental por cadmio. Es uno de los principales metales encontrados en suelos y agua de zonas mineras abandonadas, así como en los jales (ATSDR, 2004). Este metal ha sido reconocido como carcinógeno para humanos, por lo que se le clasifica en el grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) (IARC, 1994). Esto se debe a la relación que existe entre la exposición a cadmio inhalado y cáncer de pulmón. También existen evidencias de que la exposición oral a cadmio en modelos animales produce sarcomas y tumores prostáticos (Waalkes y Rehm, 1994). Los límites máximos permitidos (LMP) de Cd en el agua de bebida no deben exceder 0.005 µg/ml (NOM-127-SSA1-1994).

**PLOMO:** Es el metal más ubicuo y sin duda, uno de los más tóxicos, es detectado en casi todas las fases del ambiente inerte, así como en muchos organismos (Goyer, 1996). Las principales fuentes de exposición son: la dieta y desechos producidos por industrias, como la minera, por lo que es muy común encontrarlo en jales mineros y es capaz de contaminar suelos y cuerpos de agua cercanos a estas zonas. La norma mexicana NOM-127-SSA1-1994 establece que los niveles de Pb en agua de bebida no deben sobrepasar 0.01 µg/ml.

El plomo se clasifica dentro del grupo 2B, como posible carcinógeno para humanos. Se piensa que el plomo podría actuar como un agente co-mutágeno y co-carcinógeno (IARC, 1987).

**COBRE:** Este metal se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es esencial. La principal fuente de exposición es la vía oral, por lo que en 1985, la EPA

estableció el LMP de 1.3 µg/ml, en nuestro país, el LMP es de 2.0 µg/ml, (NOM-127-SSA1-1994). Este metal está relacionado con varias patologías como: cirrosis infantil, la cual es una condición que está relacionada con la ingesta de agua contaminada por cobre, lo que es muy parecida a la enfermedad de Wilson, condiciones colestásicas crónicas y desordenes genéticos del metabolismo del cobre (Goyer, 1996). Los estudios en cuanto a la carcinogenicidad del cobre arrojan evidencias acerca de que no es carcinógeno en modelos animales ni en humanos, por lo que es clasificado en el grupo D (no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos) por la IRAC (IARC, 1994). Sin embargo, en estudios *in-vitro* se reportan efectos genotóxicos del sulfuro de cobre, como: rompimientos de cadena sencilla y entrecruzamientos a dosis de 1.0 mmol/litro. En cuanto a los estudios *in-vivo* el sulfato de cobre indujo aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones albino y BALAB/c después de una exposición oral (Fahmy, 2000; ATSDR, 2004).

**ZINC:** este elemento es un metal esencial para los humanos, y su carencia resulta en severas deficiencias de salud. Por el contrario, exposiciones a concentraciones elevadas de zinc son poco comunes y solo se dan en lugares donde el suelo y agua pudieran contener elevadas concentraciones del metal debido a la presencia de yales mineros en la zona. Ejemplos de ello se localizan en: Nueva Inglaterra, El Río Missouri, Río Grande y Río Colorado, donde se han registrado concentraciones elevadas de zinc (ATSDR, 2005). La norma mexicana establece que el zinc en agua de bebida no debe sobrepasar 5 µg/ml (NOM-127-SSA1-1994).

En cuanto a los estudios de genotoxicidad, éstos indican que el zinc no es un agente mutagénico y es un débil clastógeno. Sin embargo, se han observado aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratones y ratas expuestas a Zn vía oral (Vilkina *et al.*, 1978; Kowalska-Wochna *et al.*, 1988).

**ARSÉNICO:** El arsénico ha sido y sigue siendo uno de los elementos más misteriosos y tóxicos desde la antigüedad hasta nuestros días, debido a sus tan controvertidas propiedades. Históricamente este metaloide fue conocido desde el imperio romano hasta la edad media y el renacimiento, como el “rey de los venenos”, ya sus formas minerales se conocían desde el siglo IV A.C. pero no fue hasta el año 1250 que se descubre al As por Albertus Magnus (Edelstein, 1996).

El arsénico se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza (cerca de  $5 \times 10^{-4}\%$  de la corteza terrestre). En el ambiente, este elemento se combina con oxígeno, cloro y azufre para formar compuestos inorgánicos y en animales y plantas se combina con carbono e hidrógeno para originar compuestos orgánicos (ATSDR, 2007).

Se encuentra en el quinto grupo de la tabla periódica, se presenta raramente como sólido, y principalmente en forma de sulfuros. Se dice que es un metaloide, ya que muestra propiedades metálicas y no metálicas (Brusick, 1987).

En la naturaleza se encuentra en tres estados de oxidación (-3, +3, +5) siendo el compuesto -3 el más importante debido a su abundancia (arsina). En las valencias +3 y +5 el As forma arsenitos ( $\text{As}^{+3}$ ) y arsenatos ( $\text{As}^{+5}$ ) siendo los primeros los más tóxicos (Goyer, 1986; Vahter, 1994).

El arsénico puede ser liberado al ambiente por actividades naturales y antropogénicas, dentro de las primeras podemos mencionar la actividad volcánica y la erosión de los depósitos minerales y dentro de las segundas se encuentran la actividad industrial como: plantas generadoras de energía, uso de productos para conservar madera, producción de semiconductores, utilización de pesticidas, herbicidas y por actividad y desechos mineros (Goyer, 1986; Vahter, 1994).

La exposición al metaloide puede ser por vía inhalada, dérmica y oral siendo esta última la más importante ya que el agua puede contaminarse con As, lo que se conoce como hidroarsenicismo.

El hidroarsenicismo constituye un problema grave de salud pública en el mundo y en México ya que el As puede sobrepasar los límites máximos permisibles propuestos por organizaciones internacionales ( $10 \mu\text{g/L}^{-1}$ ) (OMS, 2001; IARC, 2004; FAO, 2006; EPA, 2000; 2006) y nacionales ( $50 \mu\text{g/L}^{-1}$ ) (NOM<sup>-1</sup> 27 SSA1<sup>-1</sup>1994) ésta última se propuso en el año 2000, pero fue modificada para que en 2005 alcance el límite de  $25 \mu\text{g/L}^{-1}$ .

Un ejemplo de lo anterior se ha registrado en varios estados de nuestro país como: En los municipios de Villa de la paz y Santa María de la paz, en San Luis Potosí (Castro-Larragoitia *et al.*, 1997; Mejia *et al.*, 1999), en Zimapán, Hidalgo (CNA, 1999; Prieto-García *et al.*, 2005), en Guadalupe, Zacatecas (Iskander *et al.*, 1994), en el Distrito minero de Guanajuato (Carrillo-Chávez *et al.*, 2003; Ramos-Arroyo *et al.*, 2004), en Taxco, Guerrero (Armienta *et al.*, 2003), en El triunfo, Baja California Sur (Carrillo y Drever, 1998).

Se considera que en nuestro país existen más de dos millones de personas expuestas a este metaloide mediante el agua de bebida (OMS, 2006).

### **METABOLISMO DEL ARSENICO**

El metabolismo del arsénico ha sido ampliamente estudiado, se describen dos procesos principales involucrados: (1) reacciones de óxido-reducción que reducen el arsénico (III) a As (V) y (2) reacciones de metilación, debido a que la metilación del As facilita su excreción por la orina, es considerado como un mecanismo de desintoxicación (Gamble *et al.*, 2007), éste convierte el arsenito a ácido monometilarsonico (MMA) y ácido dimetilarsinico (DMA). Las reacciones siguientes reducen el arsenato inorgánico a arsenito, la metilación a MMA (V), reducción a MMA (III) y la metilación a DMA (V) (Aposhian *et al.*, 2000 a,b).

Este proceso es similar para todas las rutas de exposición. El organismo tiene la habilidad de metabolizar el As inorgánico a formas solubles que son más fácilmente excretadas por la orina. Se estima que aproximadamente el 75% del arsénico absorbido es eliminado por esta vía, aunque esto depende de la dosis y el tiempo de exposición. Este parece ser un mecanismo saturable que cuando sobrepasa su límite, se registra un mayor efecto tóxico por parte del As (Aposhian *et al.*, 2000 a,b).

La mayor parte del conocimiento acerca del metabolismo del arsénico proviene del estudio de los productos excretados por orina en personas expuestas. La exposición humana tanto a arsenitos como arseniatos resulta en niveles elevados de arsénico inorgánico As(+3), As(+5), DMA y MMA en la orina. Por lo anterior, la cantidad y especie de arsénico registrado en la orina de personas ocupacional o ambientalmente expuestas es considerada como un biomarcador de exposición (Aposhian *et al.*, 2000b; ATSDR, 2005).

En general, el DMA es el metabolito principal en la orina después de una exposición crónica, con niveles menores de As inorgánico (As(+3) y As(+5) y MMA). En humanos los niveles de DMA oscilan entre un 40 a un 70%, los de arsénico inorgánico de 20 a 25% y 15 a 25% de MMA (Del Razo *et al.*, 2001; Hopenhayn *et al.*, 2003b; Loffredo *et al.*, 2003).

Otros tejidos donde se pueden medir los niveles del metaloide y también han sido considerados como biomarcadores de exposición son la cantidad de As en cabello y uñas donde las concentraciones de As reflejan exposiciones pasadas (Karagas *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2001).

Poco se sabe acerca de la concentración de As en sangre periférica de individuos expuestos de manera crónica.

Los compuestos arsenicales en los humanos, son eliminados de la sangre siguiendo un patrón exponencial trifásico, la primera fase es de 1 a 2 días, la segunda de 9.5 días y la tercera de 38 días (Klassen, 1986). Aunque la vida media de los metabolitos de As en sangre como el MMA y DMA aún se desconoce, se cree que es corta ya que en modelos animales se ha visto que se elimina rápidamente (7.4 h para MMA y 5.6 h para DMA) (Gamble *et al.*, 2007).

Recientemente se ha propuesto que la concentración del metal en sangre puede ser un marcador de dosis interna muy útil en estudios de biomonitorio humano y que está directamente relacionado con el riesgo de presentar lesiones en piel (Hall *et al.*, 2006, 2007; Gamble *et al.*, 2007). La agencia para la regulación de sustancias tóxicas (ATSDR, 2006) así como Hall y colaboradores en 2006, reportan que los niveles del metal no deben exceder una concentración mayor a 50 ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica.

También, durante exposiciones crónicas y continuas, las concentraciones del metaloide en sangre se mantienen constantes por lo que puede evidenciar exposiciones pasadas y reflejar la carga de As en el individuo (Morton y Dunette, 1994; Gamble *et al.*, 2007).

## **EXPOSICIÓN ORAL A ARSÉNICO: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA A NIVEL MUNDIAL**

Se estima que alrededor de 100 millones de personas en India, Bangladesh, Vietnam, Cambodia y Nepal están expuestas a arsénico mediante el agua de bebida, la cual presenta concentraciones que rebasan 100 veces la norma establecida por las organizaciones internacionales antes mencionadas. Otros países como Argentina, China, Taiwán, Chile, Estados Unidos y México también presentan problemas por hidroarsenicismo donde los niveles rebasan la norma hasta 50 veces más (Gamble *et al.*, 2007).

Existe gran número de estudios tanto en humanos como en animales acerca de los efectos tóxicos por la exposición oral a As, generalmente en este tipo de exposiciones la fórmula química del As es desconocida, pero se presume que puede ser arsénico inorgánico en forma de arsenatos [As(+5)] y/o arsenitos [As(+3)] (ATSDR, 2005). En ambientes oxigenados se presenta como arseniatos ( $\text{AsO}_5$ ) y en condiciones reductoras se encuentra como arsenitos ( $\text{AsO}_3$ ) (Abernathy *et al.*, 1999).

Una vez en el organismo, el metaloide puede producir efectos muy variados, los cuales dependen de: la dosis ingerida, el tipo de compuesto y factores de susceptibilidad individual. A nivel sistémico se han registrado alteraciones en el sistema respiratorio, cardiovascular, endocrino, inmunológico, nervioso, reproductor, gastrointestinal, muscular y hematopoyético. A nivel de órganos se han registrado daños en hígado, pulmones, riñones y piel, entre otros (ATSDR, 2005).

Uno de los efectos más comunes de la exposición oral a arsénico son los cambios en la piel, que incluyen hiperqueratosis en las manos y palmas, acompañadas de áreas con hiperpigmentación y otras con hipopigmentación en cara, cuello y espalda. Estos efectos se han observado en la mayoría de los estudios realizados en poblaciones humanas expuestas oral y crónicamente al metaloide (Ahmad *et al.*, 1997, 1999; Ahsan *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002a; Chakraborti *et al.*, 2003 b, c; Milton *et al.*, 2004).

Otro de los efectos ampliamente relacionados con exposición al metaloide es la enfermedad conocida como “pie negro” o “blackfoot disease”. Se caracteriza por la pérdida progresiva de circulación en manos y pies, produciendo necrosis y gangrena de las extremidades. Lo anterior se ha registrado en varios lugares del mundo, pero Taiwán (área endémica de pie negro) representa el mejor ejemplo, donde el promedio de la concentración de As en agua de bebida oscila entre 0.17 a 0.80 ppm, lo que corresponde a 0.014–0.065 mg As/kg/día. Se piensa que esto sucede en exposiciones a bajas concentraciones y por periodos de tiempo prolongados (más de 5 años) (Abernathy *et al.*, 1999).

También el arsénico ha sido clasificado como teratógeno y fue el primer agente químico calificado como carcinógeno para humanos (grupo 1A) por la agencia de investigación en cáncer, (IARC, 1980). Estudios epidemiológicos arrojan suficiente evidencia indicando que la ingesta de arsénico inorgánico de manera crónica aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de piel (Lewis *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003 a, b; Freeman *et al.*, 2004). Otros tipos de cáncer relacionados con esta exposición son el de vejiga, riñón, hígado, pulmón y próstata (Moore, 2002a; Avani y Rao, 2007).

## **PRUEBAS PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD: BIOMARCADORES**

La posible utilización de biomarcadores que representan pasos tempranos o tardíos desde la exposición hasta la aparición de la enfermedad para estimar riesgo a cáncer en poblaciones humanas, ha tomado gran importancia en los últimos años, como

consecuencia de la enorme cantidad de agentes que pueden alterar el material genético y afectar la salud humana.

Los biomarcadores se definen como alteraciones celulares o bioquímicas de estructuras, funciones o procesos -producidas por xenobióticos- que pueden ser medidas en un sistema o una muestra biológica (Kendall, 2001). Kendall (2001) propone añadir a esta lista alteraciones en el comportamiento, producidas por la exposición a agentes xenobióticos, por lo que, los biomarcadores se pueden agrupar de forma general en: marcadores de efecto, de exposición y de susceptibilidad.

Varios biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad de enfermedades se han identificado y aplicado al estudio de poblaciones humanas. Estos incluyen la dosimetría molecular de dosis interna y la dosis biológicamente efectiva de exposición a una gran variedad de agentes ambientales; la caracterización de los efectos biológicos tempranos, estructuras y funciones alteradas en órganos blanco, así como lesiones preclínicas y la identificación de susceptibilidad genética o adquirida a ciertas enfermedades (Chien *et al.*, 2005; Mussali y Fortoul 2008).

De los biomarcadores antes mencionados, los de efecto han sido de los más utilizados en los últimos años.

Biomarcadores de efecto: éstos miden efectos biológicos tempranos, es decir, alteraciones celulares y bioquímicas que se presentan antes de que se manifiesten alteraciones clínicas, los cuales pueden ser: daño oxidante y capacidad antioxidante, expresión genética de moléculas proinflamatorias en linfocitos, alteraciones cromosómicas y daño al ADN en linfocitos de sangre periférica, entre otros (Chien *et al.*, 2005).

En este contexto, existen varias técnicas para medir el daño al ADN en poblaciones humanas laboral y ambientalmente expuestas a distintos agentes, dentro de ellas podemos citar las pruebas de:

- Intercambio de cromátidas hermanas o ICH: mide el intercambio de doble cadena entre dos moléculas idénticas de ADN en el mismo *loci*, lo cual no altera la estructura cromosómica (Brusick, 1987).
- Micronúcleos: evalúa la capacidad de los compuestos químicos y físicos para inducir rompimientos cromosómicos en epitelios y linfocitos de sangre periférica. Ésta es una de las técnicas más utilizadas en los últimos años debido a que no es invasiva y los resultados se obtienen en corto tiempo (Gonsebatt *et al.*, 1997).

- Electroforesis en gel de células únicas o “Ensayo cometa”: se ha propuesto como un sistema capaz de detectar distintos tipos de rompimientos al ADN, también se utiliza para inferir mecanismos de acción, dependiendo de las condiciones de pH utilizadas, por lo que ha sido de gran utilidad en los últimos años (Mussali *et al.*, 2005).

Otro de los biomarcadores más comúnmente utilizados es la prueba de Aberraciones Cromosómicas, a la cual nos enfocaremos en este estudio y se describe a continuación.

## **ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Las aberraciones cromosómicas (AC) pueden clasificarse en dos grandes grupos, “estructurales” y “numéricas”.

### **Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)**

Los cromosomas pueden sufrir rupturas espontáneas o inducidas por agentes mutagénicos. Si bien existen mecanismos de reparación que reúnen los segmentos fragmentados, en ocasiones estos mecanismos fallan y dan lugar a ACE (Savage, 2004).

Para entender el mecanismo de origen de los diferentes tipos de ACE es necesario saber en que momento del ciclo celular se produce el daño. Las alteraciones en los cromosomas durante la fase G1, o sea cuando el cromosoma aún no ha sido replicado se denominan aberraciones tipo cromosómicas. En cambio, las aberraciones cromatídicas son aquellas que se producen en cromosomas ya replicados, es decir que se encuentran en el período G2 del ciclo celular (Bryant *et al.*, 2004).

Ambas alteraciones pueden resultar en cambios simétricos o asimétricos. Los cambios simétricos son aquellos que implican un reordenamiento del material genético por diferentes mecanismos sin pérdida de información genética. Los de tipo asimétrico, implican, en general, pérdida de información genética habitualmente bajo la forma de fragmentos acéntricos (sin centrómero) (Rowley, 1998).

Las aberraciones cromosómicas y cromatídicas pueden subdividirse en discontinuidades y en reordenamientos. Estos últimos pueden a su vez ser clasificados como intracambios, o sea reordenamientos dentro de un cromosoma; o intercambios, correspondientes a reordenamientos entre dos o más cromosomas diferentes (Bryant *et al.*, 2004; Savage, 2004).

Algunos tipos de aberraciones que pueden ser cromosómicas o cromatídicas se citan a continuación:

**Deleciones:** son aquellos cambios en los que, tras la ruptura, se produce la reunión de los fragmentos pero con pérdida de un segmento cromosómico. Las deleciones pueden

ser intersticiales, cuando comprenden dos puntos de ruptura, o terminales, cuando se producen en un extremo del cromosoma e involucran un sólo punto de ruptura. Se dice que las deleciones cromatídicas (en una cromátida) generan un fragmento sencillo acéntrico (Brusick, 1987; Bryant *et al.*, 2004).

**Inversiones:** estas alteraciones estructurales suponen dos rupturas y posterior reunión del segmento roto pero de manera invertida. Si los puntos de ruptura ocurren en brazos diferentes, y la inversión involucra al centrómero, se llama pericéntrica. Si los puntos de ruptura ocurren en el mismo brazo cromosómico, y la inversión no involucra al centrómero y se llama paracéntrica. A diferencia de las deleciones y duplicaciones, las inversiones no involucran pérdida o ganancia de material genético. Alteran el arreglo de los genes pero no necesariamente alteran la cantidad o calidad de dichos genes. Por este motivo, los individuos portadores de inversiones cromosómicas no suelen estar afectados en su fenotipo (Brusick, 1987; Pfeiffer *et al.*, 2004).

**Duplicaciones:** Involucra la ruptura y reunión de pedazos de cromosomas homólogos, su acomodo en el cromosoma puede resultar en duplicaciones o “redundancias” o “ganancias” de material genético (Savage, 2004; Bryant *et al.*, 2004).

**Translocaciones:** las más frecuentes se denominan recíprocas y consisten en la ruptura de dos cromosomas no homólogos con posterior intercambio de segmentos entre ellos. Cuando los individuos son portadores de translocaciones recíprocas balanceadas suelen ser fenotípicamente normales ya que no hay ganancia ni pérdida de material genético. Sin embargo, pueden afectar la fertilidad (Rowley, 1998).

**Discontinuidades:** lesión acromática o “gap”, corresponde a una región de la cromátida que posee escasa coloración. El criterio más utilizado para definir un “gap” es: “toda lesión cuyo ancho sea menor que el de la cromátida”, y que se encuentren alineados al brazo cromosómico (Savage, 2004).

**Aberraciones cromosómicas numéricas:** pueden ser de dos tipos: **Euploidias:** aquellos individuos que presentan un juego extra aparte del juego cromosómico que ya tienen ( $2n$ ,  $3n$   $4n$  etc.), cuando la dotación cromosómica es superior a dos, se les denomina individuos poliploides. Otro tipo son las **Aneuploidias**, que se definen como cambios en el número cromosómico que sólo afectan a un o pocos pares cromosómicos, ya sea que les falte un cromosoma (hipodiploides,  $2n-1$ ) o porque les sobre un cromosoma (hiperdiploides  $2n+1$ ). Dentro de este tipo de AC encontramos a las nulisomías ( $2n-2$ ), monosomías ( $2n-1$ ) y trisomías ( $2n+1$ ) (Brusick, 1987).

## **ABERRACIONES CROMOSÓMICAS COMO BIOMARCADOR DE EFECTO TEMPRANO**

La frecuencia de AC en linfocitos de sangre periférica ha sido utilizada durante muchas décadas como un biomarcador de efecto temprano de carcinógenos genotóxicos, en exposiciones ambientales y laborales. Asumiendo que los mecanismos de formación de aberraciones cromosómicas son similares en distintos tejidos, se esperaría que el nivel de daño en los linfocitos refleje daño en otros órganos o tejidos susceptibles a desarrollar cáncer y así predecir el riesgo a esta patología (Norppa *et al.*, 2006).

La relación entre una elevada frecuencia de AC y el riesgo para desarrollar cáncer fue detectada en un estudio prospectivo de 30 años de seguimiento, por el grupo nórdico para el estudio de riesgo a la salud y daño cromosómico (NSGHRCD, 1990a,b). Otro estudio realizado por un consorcio italiano de alrededor de 10 laboratorios, concluyeron lo mismo. Asimismo, se concluyó que ningún otro marcador citogenético utilizado en linfocitos (micronúcleos e ICH) presentaba esta relación (Bonassi *et al.*, 2000).

Los resultados anteriores demuestran que las AC pueden ser un biomarcador confiable para predecir el riesgo a desarrollar cáncer, independientemente de la duración de la exposición a otros carcinógenos, por lo que aparte de ser un biomarcador de exposición también es útil para estimar riesgo de padecer cáncer (Bonassi *et al.*, 2000, 2004; Norppa *et al.*, 2006).

Una de las bases biológicas de esta observación es la elevada frecuencia de AC en pacientes con cáncer y síndromes de inestabilidad cromosómica (Bonassi *et al.*, 2000).

Otra observación que apoya lo anterior es que casi todos los agentes capaces de producir AC estructurales (clastógenos) son mutagénicos y carcinogénicos y la mayoría de los carcinógenos son también clastógenos. Los rearrreglos cromosómicos son característicos de células neoplásicas y muchos cánceres se asocian a AC específicas, lo que refleja inestabilidad cromosómica asociada a un proceso neoplásico (Cornforth, 1998).

## **ABERRACIONES CROMOSÓMICAS Y GENOTOXICIDAD DEL ARSÉNICO EN POBLACIONES HUMANAS**

Debido a que el hidroarsenismo es un problema importante de salud pública, el arsénico es uno de los metales más estudiados en cuanto a su toxicidad, por lo que

existe un gran número de reportes acerca de sus efectos genotóxicos en poblaciones humanas.

Petres *et al.* (1977), realizaron análisis cromosómicos en linfocitos de pacientes expuestos a As; en ese mismo año, Beckman *et al.* analizaron la frecuencia de AC en personas expuestas a As de manera laboral; así mismo, Norderson *et al.* (1979) estudiaron alteraciones cromosómicas en pacientes tratados con arsénico. En todos los casos anteriores se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de aberraciones cromosómicas entre los individuos expuestos al metaloide y los no expuestos.

En cuanto a las AC observadas en poblaciones expuestas al metaloide en agua de bebida, Ostrosky *et al.* (1991) compararon que la frecuencia de AC entre un grupo de individuos con niveles bajos y otro con niveles altos de exposición en México, encontrando que los porcentajes de AC son similares en ambos grupos, aunque las AC complejas fueron más frecuentes en el grupo de alta exposición. Otro estudio realizado en México, es el de Gonsebatt *et al.* (1997) en el que las AC mas frecuentes encontradas en linfocitos del grupo expuesto (408.17  $\mu\text{g/l}$ ) fueron de tipo cromatídico con respecto al control (29.88  $\mu\text{g/l}$ ) también encontraron mayor frecuencia de micronúcleos en células de epitelio urinario y bucal en el grupo expuesto. Así mismo, un estudio realizado en Finlandia, también arrojó resultados similares a los anteriores, donde observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de AC en el grupo expuesto (410  $\mu\text{g/l}$ ) (Maaki-Paakkanen *et al.*, 1998).

En Taiwán, (área endémica de “pie negro”) se observó que las personas expuestas que desarrollaron cáncer presentaron mayor frecuencia de AC de tipo cromosómico que los individuos expuestos que no presentaron la enfermedad (Liou *et al.*, 1999).

Por su parte Roy y Saha (2002) reportan elevadas frecuencias de AC en individuos expuestos al arsénico y sus metabolitos, al igual que Sciandrello *et al.* (2004) que puntualizan que la inestabilidad cromosómica de las células de individuos expuestos a As es debida a la alta frecuencia de AC que presentan.

Resultados contrarios fueron reportados por Vig *et al.* (1984) en donde no encontraron diferencias en la inducción de AC en personas expuestas (0.05mg/l) que tomaron agua con As durante 5 años.

En cuanto a los mecanismos de acción del arsénico y sus metabolitos, se sabe que éstos son capaces de inducir daño al ADN en una gran variedad de sistemas tanto *in*

*vitro* como *in vivo* (Basu *et al.*, 2001). Se ha establecido que los compuestos arsenicales inducen rompimientos de cadena sencilla de ADN, inhiben su síntesis y alteran su reparación (Yamanaka *et al.*, 1995; Hartwig *et al.*, 2003; Soto-Reyes *et al.*, 2005).

Varios estudios (Lee *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 1995; Basu *et al.*, 2001) indican que el As inorgánico produce AC numéricas y estructurales (siendo los gaps y los rompimientos sencillos los más comunes), transformación celular y amplificación génica en células de mamífero.

Se ha observado que algunos de los metabolitos del As (DMA y MMA), causan AC numéricas y alteraciones en el huso mitótico tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha visto que el arsenito causa endoreduplicación por la inhibición de la actividad de fosfatasa de algunas proteínas e hiperdiploidia por la alteración de los microtúbulos. Varios estudios comprueban el carácter aneuploidogénico y de arresto mitótico de diferentes compuestos arsenicales (Huang *et al.*, 1995, Eguchi *et al.*, 1997), siendo los compuestos de As inorgánico trivalentes más clastógenos que los compuestos pentavalentes (Nakamuro y Sayato, 1981; Basu *et al.*, 2001; Hall, 2002; Andrewes *et al.*, 2003).

Lo anterior indica que los compuestos del As pueden dañar al ADN directa e indirectamente y producir AC, ICH y MN en personas expuestas a él mediante el agua de bebida.

Asimismo, existe una relación dosis-respuesta en la inducción de AC por parte del As en poblaciones humanas, por lo que se puede decir que el metaloide induce daño genético de manera indirecta, lo que provee uno de los fundamentos biológicos para asumir una relación dosis-respuesta para cáncer en humanos ( Basu *et al.*, 2001; Au y Salama, 2005).

Estudios como el de Eguchi *et al.* (1997) y el de Basu *et al.* (2001) indican que el As facilita la transición de los tumores benignos a malignos, causando inestabilidad cromosómica como se ha notado en la progresión de los tumores, los análisis en humanos expuestos a As laboralmente, indican que éste actúa en el proceso tardío de carcinogénesis.

Es muy importante mencionar que los efectos antes mencionados, dependen de la dosis, tipo de compuesto así como del tiempo de exposición, pero un aspecto fundamental es que muchos de los efectos observados dependen de las características específicas de cada población es decir, de factores de susceptibilidad individual (factores genéticos, hábitos alimenticios, etc...) por lo que es importante estudiar a cada población ya que los efectos de la exposición pueden variar.

## JUSTIFICACIÓN

- La industria minera ha generado una gran cantidad de desechos, los cuales han contaminado muchos sitios a lo largo de todo el país, principalmente por la presencia de metales. Son varios ejemplos en los cuales los riesgos a la salud como consecuencia de la exposición humana a ellos aún no se han evaluado. Tal es el caso de la población de Huautla, Morelos, donde es probable que se encuentren diversos metales en el agua de bebida utilizada por sus habitantes. Lo cual representaría un riesgo para la salud humana.
- Datos preeliminares muestran que existen concentraciones elevadas de diferentes metales en el suelo y jales de Huautla, Morelos, (SEMARNAT, 2004, 2005) lo que podría contribuir a la contaminación del agua de bebida, sin embargo, no hay reportes acerca de posibles daños sobre la salud humana.
- Asimismo, se han reportado daños genotóxicos y efectos en la salud en residentes de otras poblaciones que se encuentran en condiciones similares a la de Huautla, Morelos por la presencia principalmente de metales en el agua de bebida.
- Por todo lo anterior, es de suma importancia realizar un estudio inicial que arroje información al respecto y que permita que la población, en caso de estar afectada, reciba la atención y la información necesarias.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Medir la concentración de metales en los diferentes depósitos de agua de la población de Huautla, Morelos y compararlos con la población testigo. Asimismo, evaluar el daño al ADN en residentes de ambas poblaciones.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Medir la concentración de los metales en el agua de bebida utilizada por los residentes de las poblaciones de Huautla, Morelos y la testigo, mediante espectrofotometría de absorción atómica.
- Medir la concentración de los metales en sangre periférica de los residentes de las poblaciones de Huautla y la testigo, mediante espectrofotometría de absorción atómica.
- Evaluar el daño al ADN en linfocitos de sangre periférica de los residentes expuestos a metales en el agua de bebida, de las poblaciones de Huautla, Morelos y la testigo, mediante aberraciones cromosómicas.
- Determinar la relación entre la concentración de los metales encontrados en sangre periférica de individuos expuestos y la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

## **METODOLOGÍA**

### **POBLACIÓN EXPUESTA**

El poblado de Huautla se localiza dentro del municipio de Tlaquiltenango, Morelos (18°37'6''N, 98°14' W) a una altura de 911 m s.n.m. Su temperatura media anual es de 18°C y su precipitación pluvial anual es de 910 mm (Fig. 1) (INEGI, 2004).

Se encuentra situado dentro de la “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla”, decretada como patrimonio de la humanidad, por la UNESCO en 2006. Su población es de 1,114 habitantes, reporta una tasa de crecimiento media anual de 0.95%, siendo el mayor porcentaje de residentes adultos de entre 20 y 50 años de edad (INEGI, 2004). El nivel socio económico de la población es bajo, la mayoría de los pobladores se dedican a la agricultura y ganadería (INEGI, 2004).

### **POBLACION TESTIGO**

El poblado de Ajuchitlán, se encuentra en el municipio de Tlaquiltenango, Morelos (18°28'N, 99°20'W). Se estableció como la población testigo del estudio ya que los afluentes de agua son totalmente independientes a los de la población expuesta. La población se abastece de tres pozos principales que se encuentran en la zona. Sin embargo, se localiza también dentro del municipio de Tlaquiltenango, dentro de la “Reserva de la biosfera Sierra de Huautla”, por lo que las condiciones geográficas y socio-económicas son muy similares a las de la población expuesta. Cuenta con 241 habitantes, de los cuales son 118 hombres y 123 mujeres. También la mayoría de los pobladores se dedican a la agricultura y ganadería (INEGI, 2004).

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM. Asimismo, el consentimiento informado se obtuvo de un formato preestablecido por este mismo comité. Se requirió por duplicado, en el cual se les informó a los participantes de los objetivos y alcances del proyecto, así como de las posibles repercusiones sobre su salud y que su participación era totalmente voluntaria.

## **CUESTIONARIO**

Se aplicó un cuestionario a cada uno de los participantes, los aspectos explorados mediante éste fueron:

- a) Datos Generales, b) Estilo de vida, c) Consumo de agua, d) Historia clínica, e) Salud de los hijos
- f) Antecedentes laborales y g) Hábitos alimenticios.

Se aplicó un total de 71 cuestionarios a los pobladores de Huautla, de donde se seleccionaron 22 participantes. Para la población testigo se aplicaron 30 cuestionarios, escogiéndose 12 individuos que cumplieran con los criterios de inclusión siguientes:

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- 1.- Ser mayor de 18 años.
- 2.- Tiempo de residencia mínimo de 10 años en el poblado de Huautla o Ajuchitlán.
- 3.- No padecer de enfermedades crónico-degenerativas.
- 4.- No haber padecido cáncer.
- 5.- No haber padecido enfermedades de tipo infeccioso 3 meses antes de la toma de muestra.
- 6.- No estar bajo ningún tratamiento farmacológico durante los días de toma de muestra.
- 7.- Participar de manera voluntaria, expresándolo por escrito.
- 8.- Contestar el cuestionario.
- 9.- No haber realizado radiografías o practicado algún examen que involucre radiación 3 meses antes de la toma de muestra.
- 10.- El agua utilizada para consumo o como “agua de bebida” debía ser proveniente de “pájaro Verde” (En el caso de Huautla) y el agua utilizada para consumo de los participantes de Ajuchitlán debía ser de uno de los tres pozos ubicados en la zona de muestreo. El consumo de agua debió ser de por lo menos 10 años.

## **TOMA DE MUESTRAS DE AGUA EN LA POBLACIÓN TESTIGO Y EXPUESTA**

Para la población testigo, se tomaron un total de 9 muestras de agua para cada pozo (tres pozos), en tres días diferentes, sumando un total de 27 muestras para cada estación (lluvias y secas).

Para la población expuesta se tomaron un total de 9 muestras de agua en el depósito y 9 muestras de agua dentro de la mina “Pájaro Verde”, en tres días diferentes, sumando un total de 18 muestras para cada estación (lluvias y secas).

Las muestras fueron colectadas según la norma establecida para la toma de muestras de agua (NOM 014-SSA1-1993), las cuales fueron recolectadas en recipientes de plástico estériles, lavados y adicionados con HNO<sub>3</sub> suprapuro. Éstas fueron transportadas en hielo al laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM, para su análisis.

### **TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA POBLACIÓN TESTIGO Y EXPUESTA**

Se tomó una muestra por punción venosa de cada uno de los individuos seleccionados para el estudio tanto de la población testigo como de la expuesta. Se tomaron 5 ml de sangre periférica para la determinación de metales en tubos vacutainer adicionados con K<sub>2</sub>EDTA y 3 ml para realización del método para aberraciones cromosómicas en tubos vacutainer adicionados con heparina. Las muestras para medición de metales fueron transportadas en hielo al laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM, para su análisis. Las muestras para aberraciones cromosómicas fueron transportadas en papel periódico, protegidas de la luz, las cuales fueron procesadas el mismo día.

### **MEDICIÓN DE METALES EN AGUA Y SANGRE PERIFÉRICA DE LA POBLACIÓN TESTIGO Y EXPUESTA**

La concentración de los metales en agua y sangre periférica se midió por espectrofotometría de absorción atómica, en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

Para la medición de plomo y cadmio se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica modelo Perkin Elmer 3100 equipado con horno de grafito HGA600. Para el zinc y cobre se usó el modelo Perkin Elmer 2380 equipado con flama. Para la determinación del arsénico total el modelo Perkin Elmer 3100 equipado con un generador de hidruros MHS-10 fue utilizado. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado para corroborar los resultados.

## **CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS**

El cultivo de linfocitos se realizó según lo propuesto por Obe *et al.* (1975), con algunas modificaciones.

Se realizaron cultivos cortos de linfocitos (4 cultivos por donador), en tubos cónicos de plástico estériles y en condiciones de esterilidad, de cada uno de los individuos muestreados. A cada cultivo se le adicionó:

- 500 µl de sangre entera
- 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma chemical Co.) adicionado previamente con fitohemaglutinina-M (Roche Diagnostics) para estimular la división celular.
- Se guardaron los tubos en estufa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, protegidos de la luz.
- A las 24h posteriores a la siembra, solo a dos tubos de cada donador se le adiciona 5-bromo-2-deoxiuridina (sigma chemical) (BRDU) (5 µg/ml de cultivo).
- Se guardan nuevamente en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, protegidos de la luz. Se dejan incubar 48 h mas y 2 h antes de completar las 72hrs de cultivo, se le adiciona colchicina (Sigma chemical) para detener a las células en metafase (4 µg/ml de cultivo).
- A los dos tubos restantes de cada donador, 2 h antes de completar las 48 h de cultivo, se le adicionan colchicina (4 µg/ml de cultivo).

## **ÍNDICE MITÓTICO Y DE REPLICACIÓN**

Después de transcurridas las 48 hrs (índice mitótico) o 72 h (índice de replicación) de cultivo; se adiciona solución hipotónica (KCL 0.075M) a los cultivos y se incuban a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente se hacen tres o más lavados con fijador (metanol-ácido-acético, 3:1).

Se arrojan los linfocitos ya fijados en las laminillas previamente lavadas y se dejan secar al aire, posteriormente se tiñen con colorante Giemsa (para aberraciones cromosómicas e índice mitótico).

Para realizar los índices de replicación, antes de la tinción con Giemsa:

Se colocan las laminillas en solución Hoechst H-33258, durante 20 min. Se incuban con solución salina citrato (SSC 2X) y se irradian con luz UV durante 20 min. Posteriormente se incuban con SSC 2X a 60 °C en baño maría. Finalmente se enjuagan, se dejan secar al aire y se tiñen con colorante Giemsa.

ÍNDICE MITÓTICO (IM): En los cultivos de 48 h. se contaron un total de 1000 células por individuo, de las cuales se sacó el porcentaje de células que en metafase y las células que se encontraban en interfase (Rojas y Valverde, 2007).

**IM= # metafases en 1000 células (%).**

ÍNDICE DE REPLICACIÓN (IR): Se contaron un total de 100 metafases por individuo, diferenciando entre aquellas células que se dividieron una, dos y tres veces, según la coloración presente en sus cromosomas (cromosomas de primera metafase: coloración uniforme, cromosomas de segunda metafase: una cromatida oscura y una clara, cromosomas de tercera metafase: cromosomas completos oscuros, claros y alternados) (Perry y Wolf, 1974). El índice de replicación se estimó de la siguiente manera:

$$\mathbf{IR= M1(1)+M2(2)+M3(3)/100.}$$

### **ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Se contaron un total de 100 metafases de cada individuo muestreado. Los criterios de inclusión para escoger las metafases analizadas fueron: a) Bien definidas, con cromosomas bien teñidos y perfectamente visibles, b) Todos los cromosomas debían estar separados uno de otro, c) El nivel de ploidía debía ser  $2n \pm 2$ , o sea de 44-48 cromosomas, d) No debía encimarse una metafase con otra. Las metafases analizadas correspondían a las de primera división mitótica.

Las aberraciones registradas fueron: fragmentos sencillos, fragmentos isocromatídicos, deleciones terminales cromatídicas y “gaps” o brechas. Las cuales se consideraron como aberraciones cromatídicas.

### **ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si existe un efecto del sitio de almacenamiento de agua (mina vs. depósito) y la estacionalidad (secas vs. lluvias) sobre la concentración de As disuelto en agua.

Posteriormente, se realizaron pruebas de *t*-student para evaluar si existe un efecto de la exposición a metales (población expuesta vs. testigo) sobre el índice mitótico e índice de replicación de los linfocitos de sangre periférica. Se realizaron los análisis sobre los datos corregidos como  $\arcseno(\%)^{1/2}$  por tratarse de datos en porcentaje (Zar, 2006).

Se hicieron pruebas de *t*-student para determinar si existe un efecto de los metales encontrados en agua y sangre de los individuos expuestos, sobre las aberraciones cromosómicas estudiadas (fragmentos sencillos, deleciones cromatídicas,

fragmentos dobles, total de las aberraciones cromatídicas con y sin gaps y el total de la aberraciones cromosómicas con y sin gaps). Se realizaron los análisis sobre los datos corregidos como  $\arcseno(\%)^{1/2}$  por tratarse de datos en porcentaje (Zar, 2006).

Se realizaron análisis de regresiones, los cuales fueron utilizados para probar la relación entre las aberraciones cromosómicas estudiadas (fragmentos sencillos, deleciones cromatídicas, fragmentos dobles, total de las aberraciones cromatídicas con y sin gaps y el total de la aberraciones cromosómicas con y sin gaps) y la concentración de As en sangre periférica de individuos de la población expuesta y del testigo. Los datos fueron transformados con logaritmos base 10 (Zar, 2006).

Finalmente, se hicieron regresiones para saber si había efecto por la ingesta de alcohol, el consumo de tabaco y la edad de los individuos de la población testigo y expuesta sobre el total de aberraciones cromosómicas con y sin gaps. Los datos fueron transformados con logaritmos base 10 (Zar, 2006).

## RESULTADOS

### METALES EN AGUA DE BEBIDA DE LA POBLACIÓN TESTIGO Y EXPUESTA

Las concentraciones obtenidas de los metales analizados en muestras de agua de bebida de ambas poblaciones, se muestra en el cuadro 1. Los resultados indican que en la población testigo ninguno de los metales analizados rebasa el límite máximo permisible (LMP) establecido por la norma mexicana NOM-127-SSA1-1994, para Pb, Cu, Zn, Cd y As. En la población expuesta sucede lo mismo, con excepción del arsénico, el cual presenta concentraciones que sobrepasan el LMP establecido por la norma mexicana antes mencionada, tanto en la mina como en el tanque de almacenamiento. Las concentraciones de As en el tanque de almacenamiento sobrepasan ocho veces más el LMP y de acuerdo a las normas internacionales (EPA, 2001, 2006; FAO, 2006; WHO, 2001), sobrepasa 19.5 veces el LMP. En la mina el metaloide presentó concentraciones nueve veces por arriba de la norma mexicana y 22.5 veces por arriba de las normas internacionales antes mencionadas.

En general, los niveles de As no variaron entre la mina y el depósito ( $F = 3.819$ , g.l. = 1,  $P > 0.05$ ), ni entre estaciones (lluvias vs. secas) ( $F = 2.637$ , g.l. = 1,  $P > 0.05$ ).

Cuadro 1. Concentraciones ( $x \pm e.e.$ ) ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los metales analizados en distintos cuerpos de agua, en ambas poblaciones. En época de lluvia y secas. Todos los LMP fueron referidos de la NOM-127-SSA1-1994

Metal	Huaulla		Ajuchitlán			LMP
	Mina	Depósito	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	
Secas						
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
As	<b>0.222±0.037</b>	<b>0.152±0.010</b>	N.D.	N.D.	N.D.	0.025
Cu	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0
Zn	0.03±0.007	0.05±0.010	0.07±0.021	0.03±0.012	0.05±0.002	5.0
Cd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.005
Lluvias						
Pb	0.007±0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
As	<b>0.232±0.003</b>	<b>0.244±0.004</b>	N.D.	N.D.	N.D.	0.025
Cu	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0
Zn	0.01±0.006	0.03±0.00	0.10±0.015	0.03±0.010	0.02±0.008	5.0
Cd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.005

N.D: No detectado, LMP: Límite máximo permisible

## METALES EN SANGRE PERIFÉRICA DE INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN TESTIGO Y EXPUESTA

La concentración de metales en sangre periférica de individuos de la población testigo y expuesta demuestran que el Pb, Zn, Cu y Cd no sobrepasan los niveles establecidos para adultos no ocupacionalmente expuestos (Majid *et al.*, 1999; NOM-199-SSA1-2000; Ramírez, 2006), Sin embargo, el As presenta niveles elevados (60  $\mu\text{g/L}$ ) en los individuos de la población expuesta, de acuerdo a lo establecido por (Smith, 2000; ATSDR 2006; Hall *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007; Gamble *et al.*, 2007) que es de 50  $\mu\text{g/L}$  (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración de metales en sangre periférica ( $\mu\text{g/l}$ ) ( $x \pm \text{e.e.}$ ) de individuos de la población testigo y expuesta.

$\mu\text{g/L}$	Pb	Cu	Zn	Cd	As
LMP	200	1000	6600	500	50
Testigo (n=12)	$71 \pm 10$	$987 \pm 32$	$6432 \pm 245$	N. D.	N. D.
Expuesto (n=22)	$60 \pm 10$	$870 \pm 30$	$6420 \pm 310$	N. D.	$60 \pm 9$

LMP= Límite Máximo Permissible, N.D= No detectable

## ÍNDICE MITÓTICO Y DE REPLICACIÓN

El promedio del IM de los individuos de la población testigo fue de ( $x \pm \text{e.e.}$ )  $4.95 \pm 0.63$  y del expuesto fue de ( $x \pm \text{e.e.}$ )  $7.44 \pm 0.58$ . Las pruebas estadísticas realizadas (*t*-student) demuestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores ( $P < 0.01$ ). Mientras que el IR registrado para la población testigo fue de  $1.37 \pm 0.05$  y para la expuesta de  $1.96 \pm 0.06$ . Las pruebas estadísticas realizadas (*t*-student) demuestran una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ). El porcentaje de metafases en primera, segunda y tercera división mitótica se muestra en la figura 2.

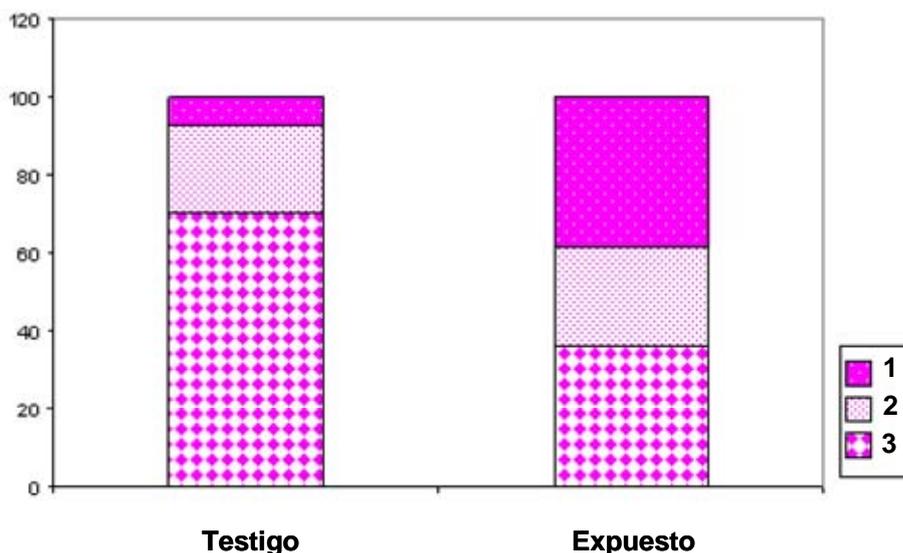


Fig. 2. Porcentaje de metafases en primera, segunda y tercera divisiones mitóticas de linfocitos de sangre periférica de ambas poblaciones estudiadas. 1C vs 1E=  $P < 0.001$ , 2C vs. 2E= ns, 3C vs. 3E=  $P < 0.001$  (*t*-student).

## **ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Se analizaron 100 metafases por individuo, de las cuales se evaluó la frecuencia de cada tipo de aberración registrada en el grupo expuesto (Huaautla, Morelos) y se comparó con el grupo testigo (Ajuchitlán, Morelos). El análisis estadístico de la frecuencia de las aberraciones cromosómicas totales se hizo con y sin “gaps” o brechas. Para realizar estos análisis se tomaron 12 individuos de la población testigo y 12 individuos de la población expuesta.

Las pruebas de *t*-student realizadas, demuestran que todas las AC analizadas (fragmentos sencillos, deleciones cromatídicas, fragmentos isocromatídicos, total de las aberraciones cromatídicas con y sin gaps y el total de células aberrantes con y sin gaps), mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo testigo y expuesto a excepción de los “gaps” o brechas (Figs. 3-6). Las aberraciones cromosómicas encontradas se muestran en las figuras 7 a 13.

## **RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN SANGRE PERIFÉRICA Y LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Se encontró una relación positiva y significativa entre la concentración de arsénico en sangre periférica y todos los parámetros de daño genético analizados, a excepción del los fragmentos sencillos. Los coeficientes de correlación (*r*) variaron de 0.58 para el porcentaje de células aberrantes sin “gaps” o brechas hasta a 0.85 para las aberraciones totales con gaps (Figs. 14-17).

Finalmente, en el cuadro 3 se muestra a manera de resumen, el promedio de las frecuencia de todas las aberraciones cromatídicas analizadas entre el grupo testigo y expuesto y los valores de las pruebas estadísticas realizadas.

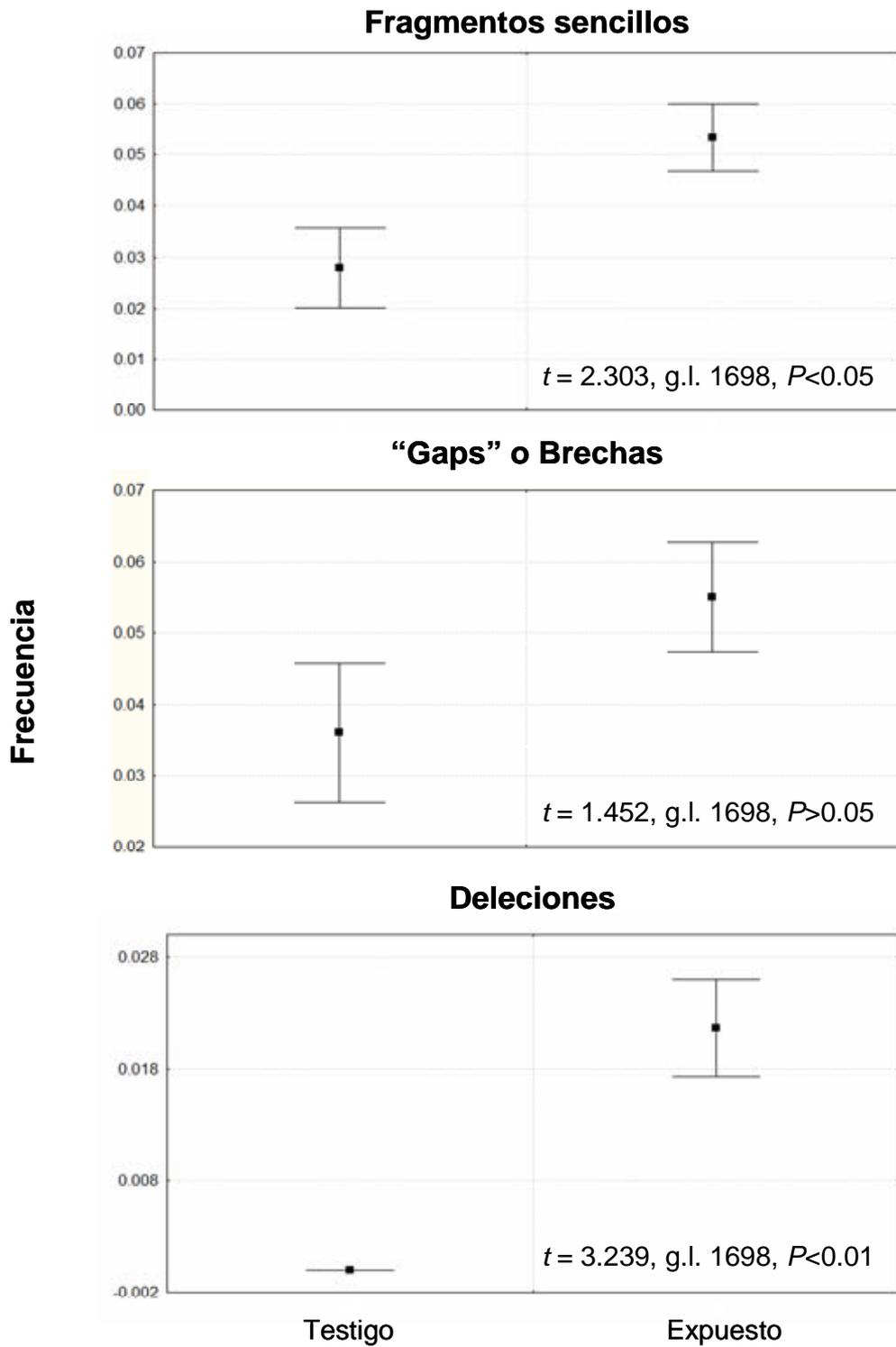


Figura 3. Frecuencia de aberraciones cromatídicas (fragmentos sencillos, “gaps” y deleciones) entre la población testigo (Ajuchitlan, Morelos) y la expuesta a arsénico en agua de bebida (Huautla, Morelos) ( $x \pm e.e.$ ).

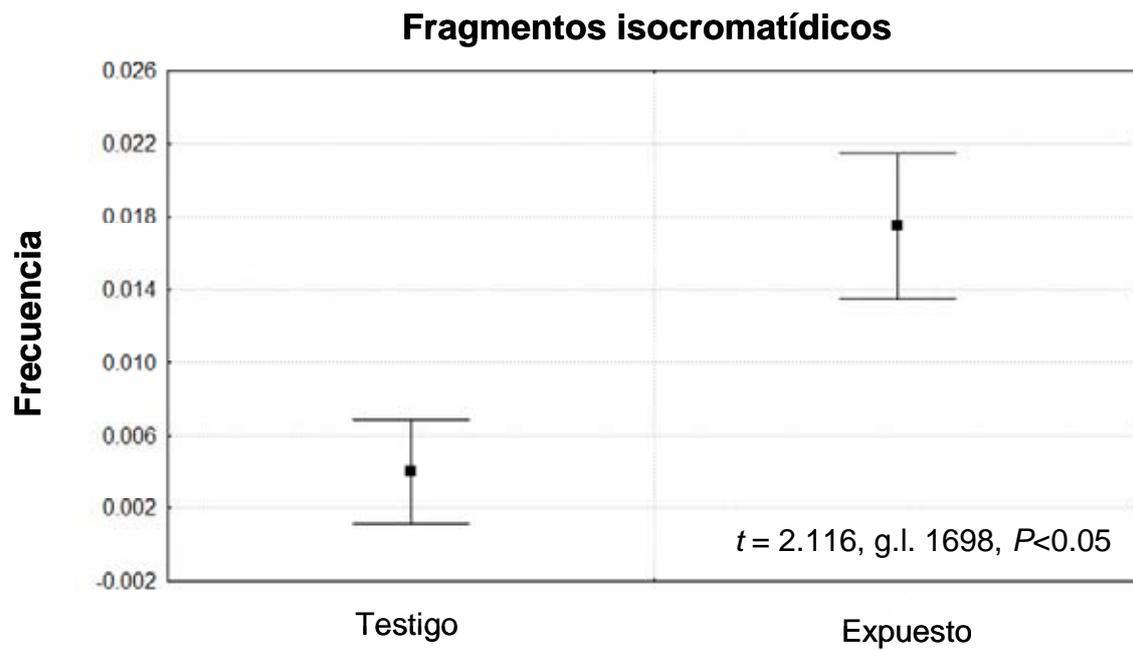


Figura 4. Frecuencia de fragmentos isocromatídicos entre la población control (Ajuchitlan, Morelos) y la expuesta a arsénico en agua de bebida (Huatla, Morelos) ( $x \pm \text{e.e.}$ ).





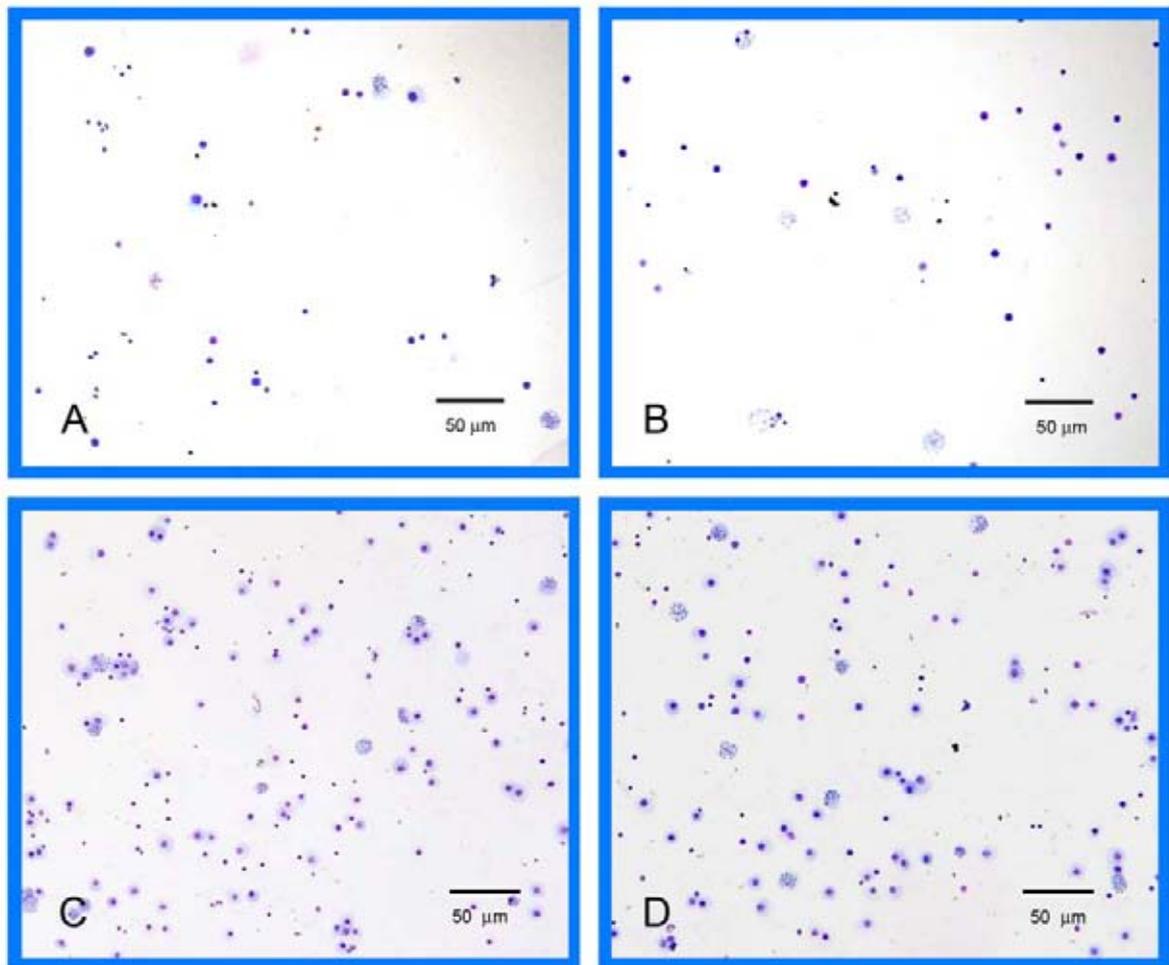


Figura 7. Índices mitóticos de individuos control (A, B) donde se muestra menor cantidad de células en interfase y mitosis, con respecto a los individuos expuestos (C, D).

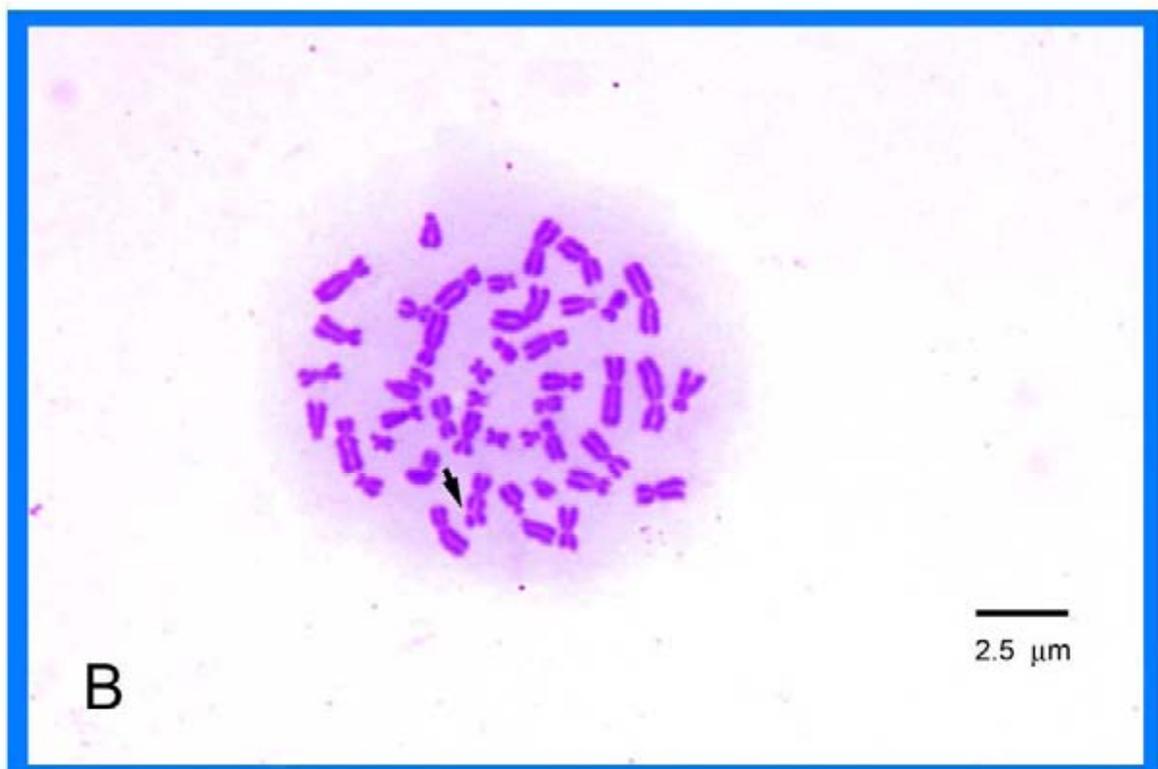
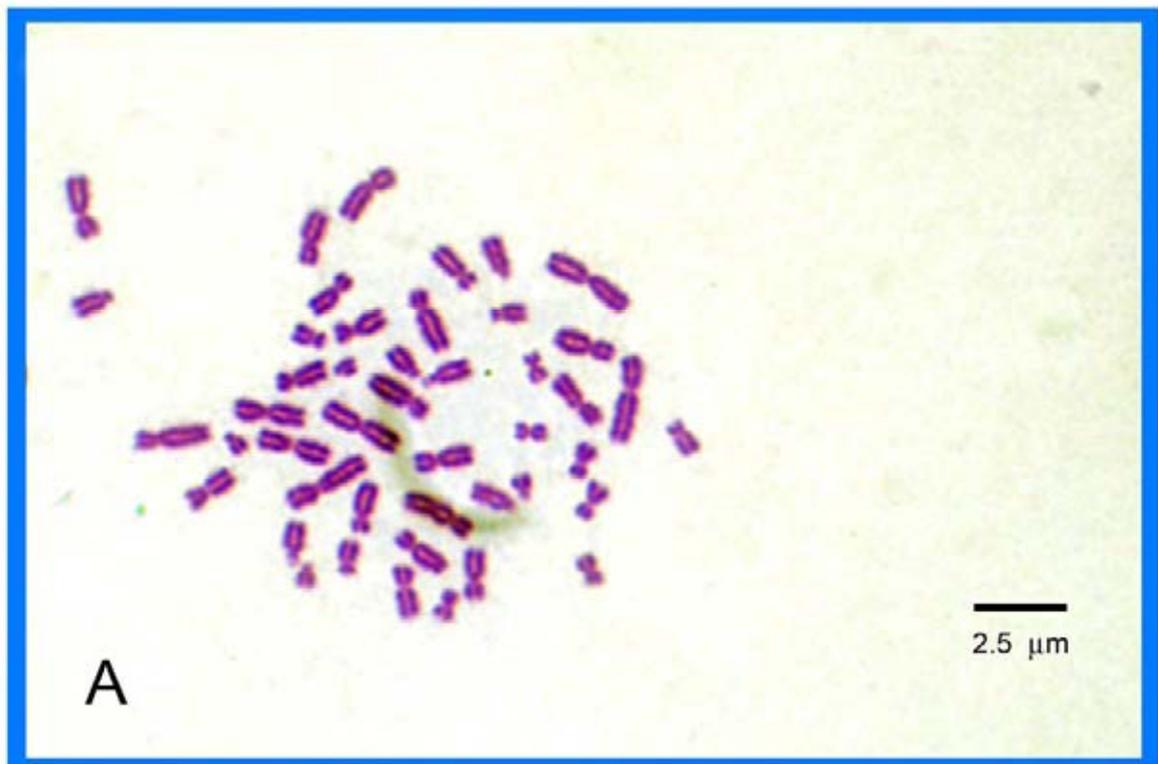


Figura 8. Metafase de un individuo control donde se muestran los cromosomas separados, bien definidos y teñidos (A). Metafase de un individuo expuesto, donde se señala un “gap” o brecha (B).

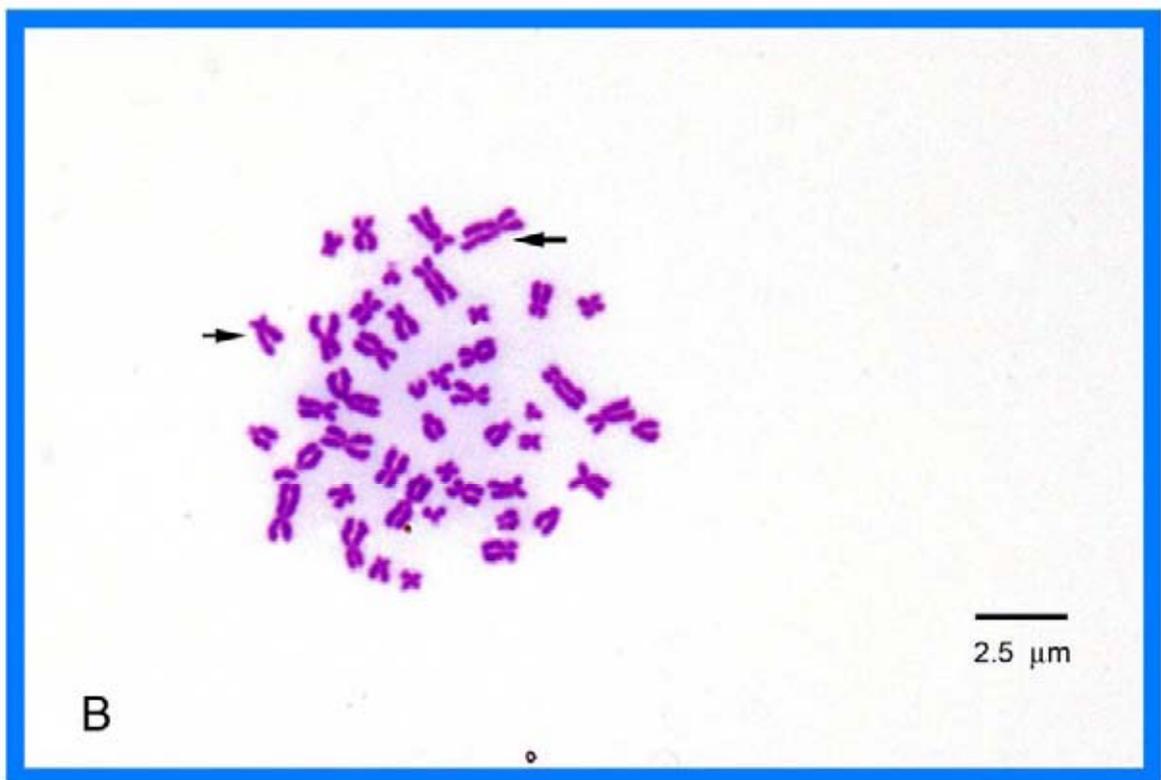


Figura 9. Metafases de individuos expuestos, donde se señala un doble “gap” o brecha (A), y dos cromosomas con deleciones terminales cromatídicas (B).

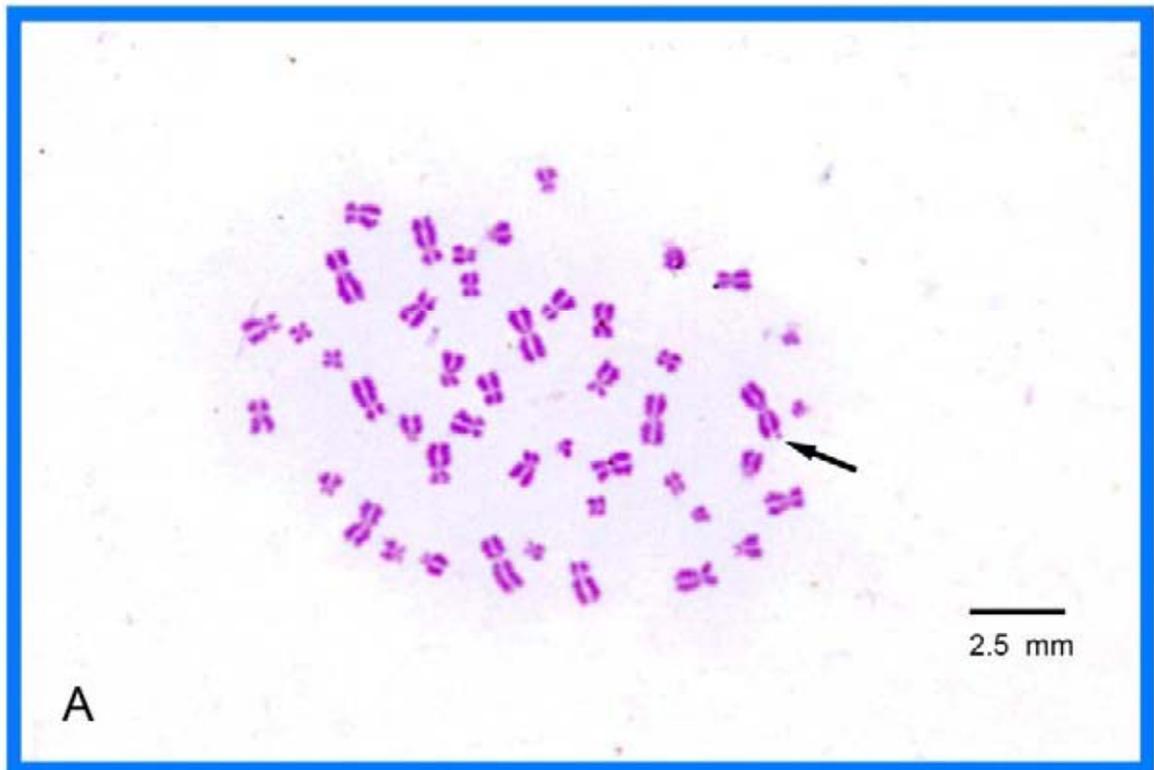


Figura 10. Metafasas de individuos expuestos donde se observa un fragmento sencillo (A), y un “gap” o brecha (B).

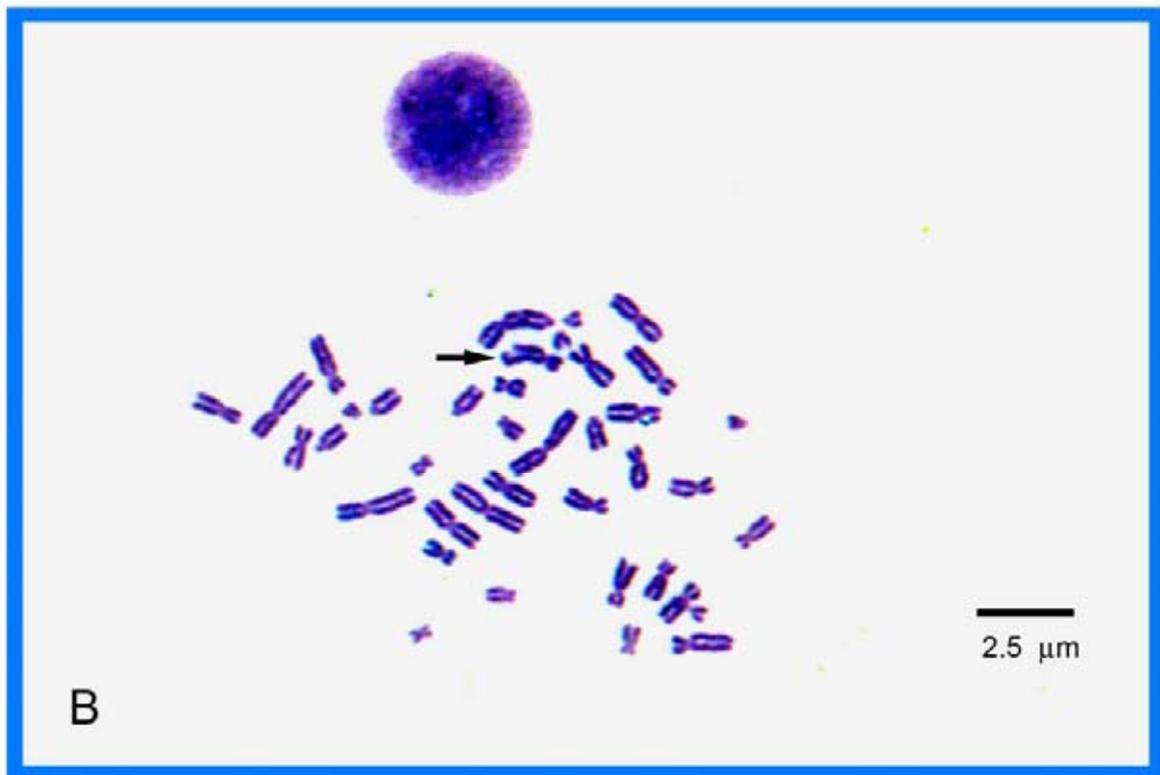
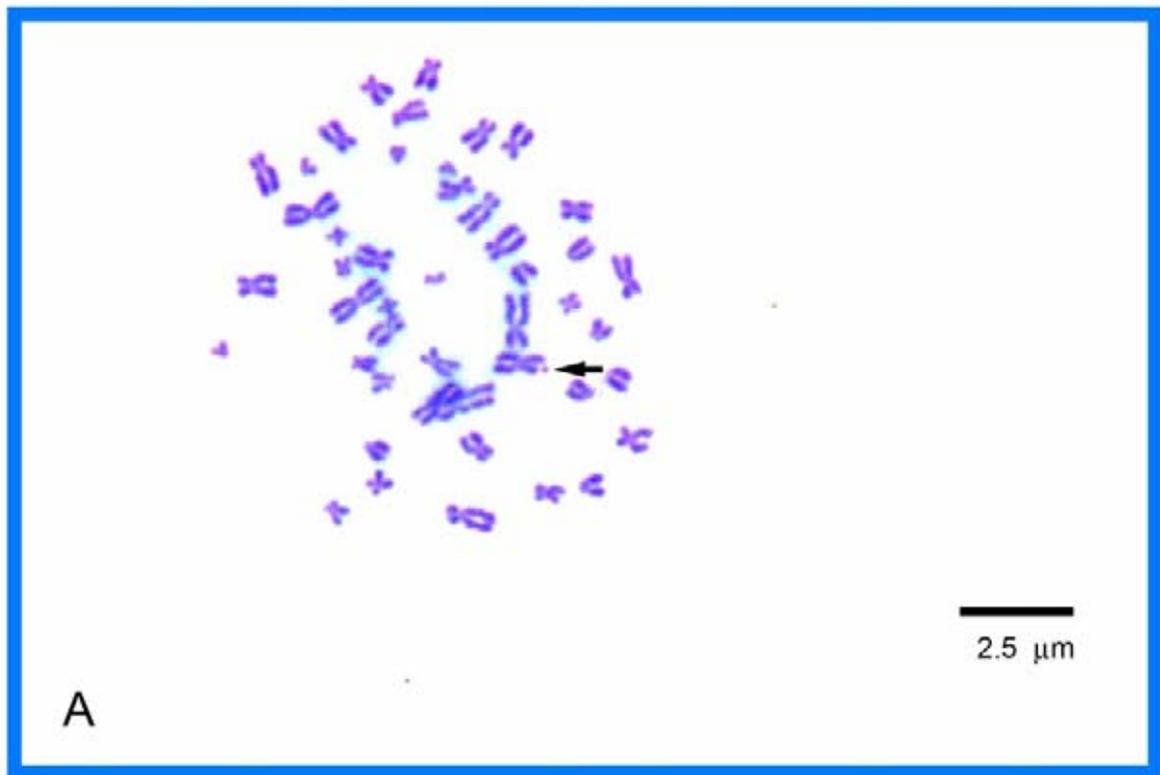


Figura 11. Metafasas de individuos expuestos donde se observan fragmentos sencillos (A y B).

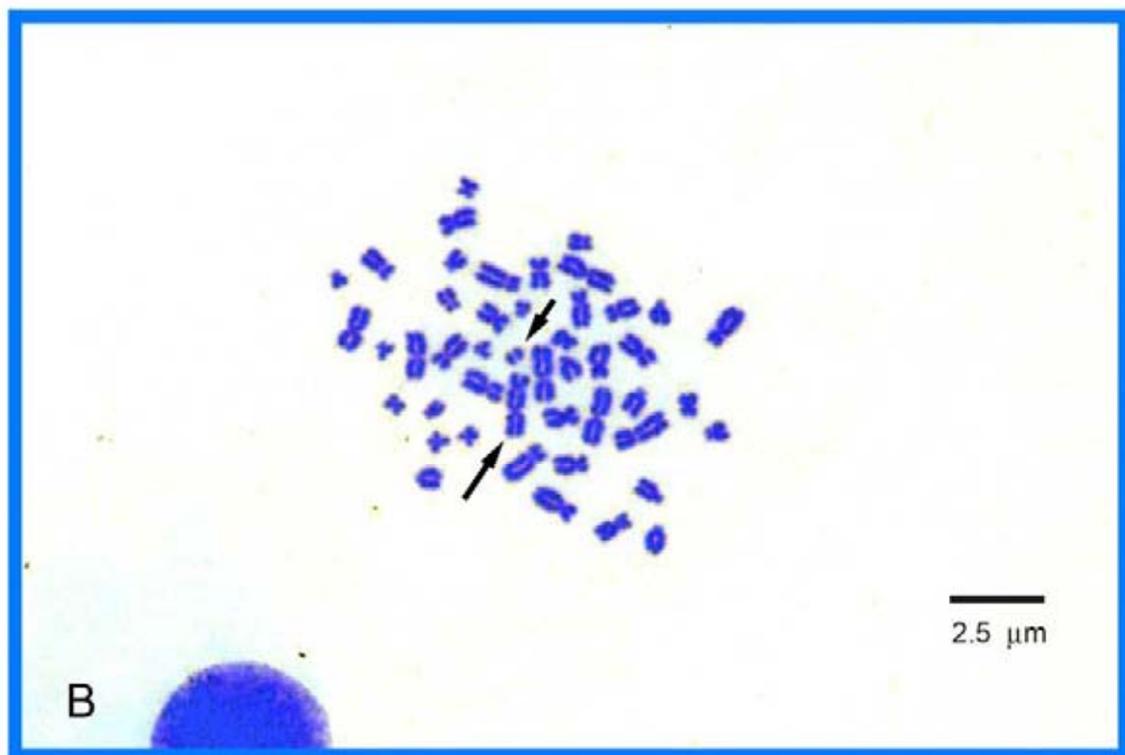


Figura 12. Metafasas de individuos expuestos donde se observan dos “gaps” o brechas en un mismo cromosoma, un fragmento sencillo y un fragmento isocromatídico (A). En B se observa un cromosoma dicéntrico y dos fragmentos acéntricos.

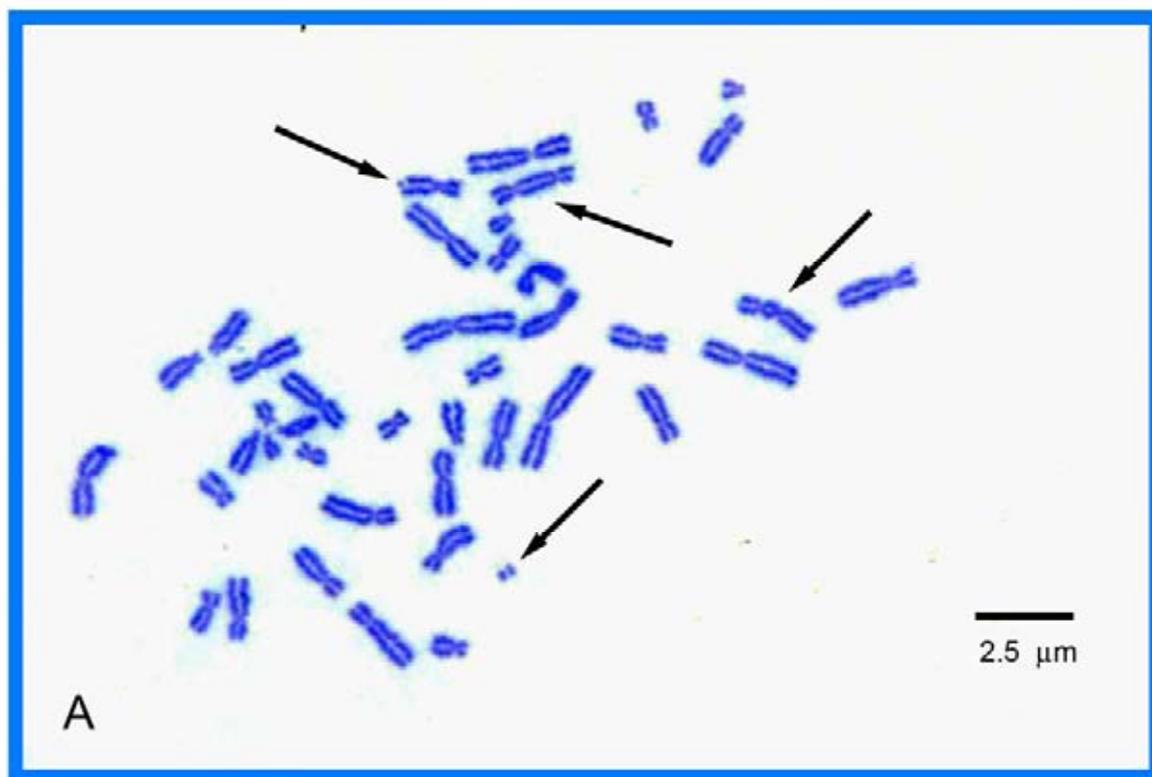


Figura 13. Metafase de un individuo expuesto donde se observan dos cromosomas dicéntricos, dos fragmentos acéntricos y un fragmento sencillo.

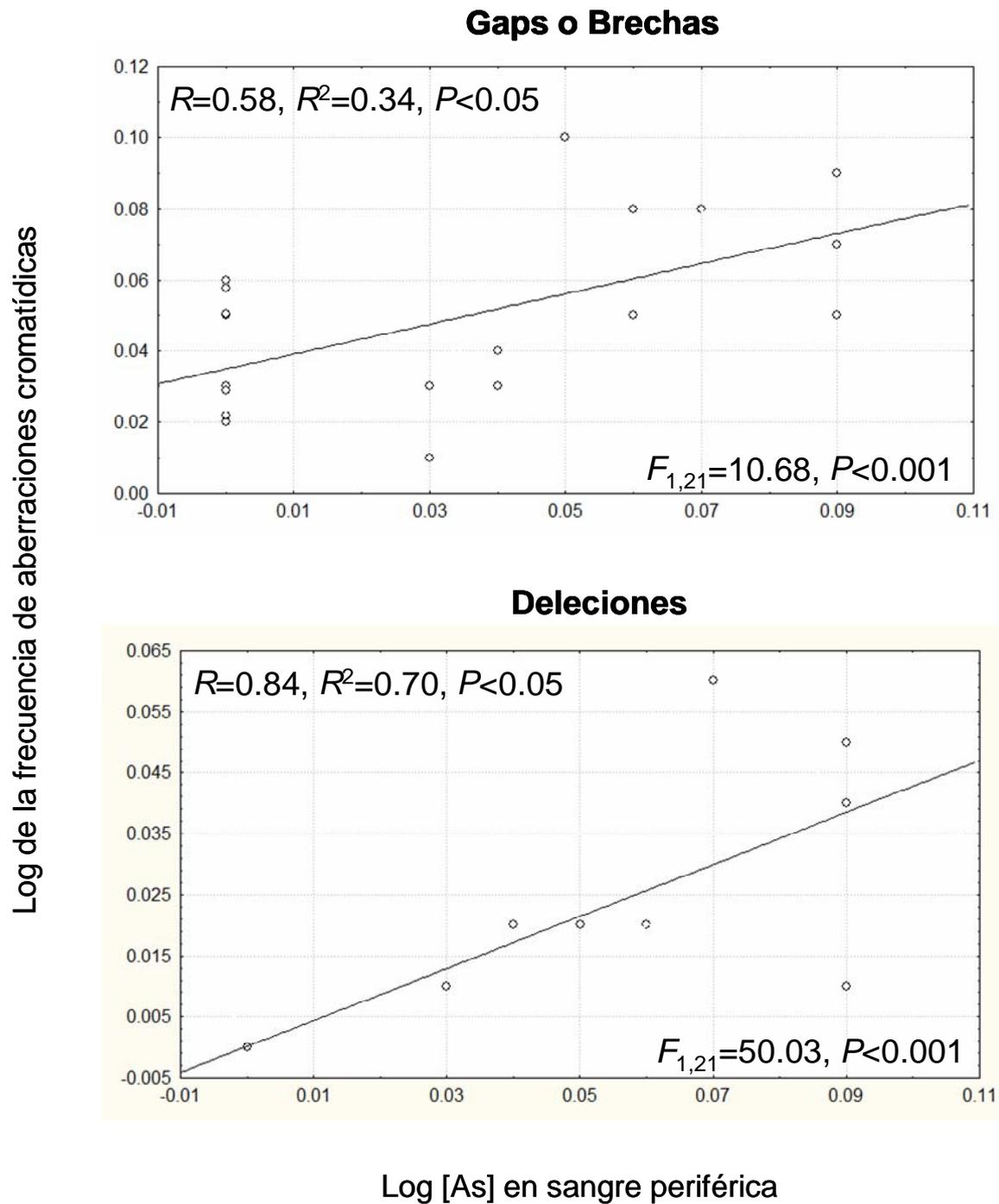


Figura 15. Regresiones entre las aberraciones cromatídicas (“gaps” o brechas y deleciones) y la concentración de arsénico en sangre periférica de individuos expuestos y testigos

### Fragmentos isocromatídicos

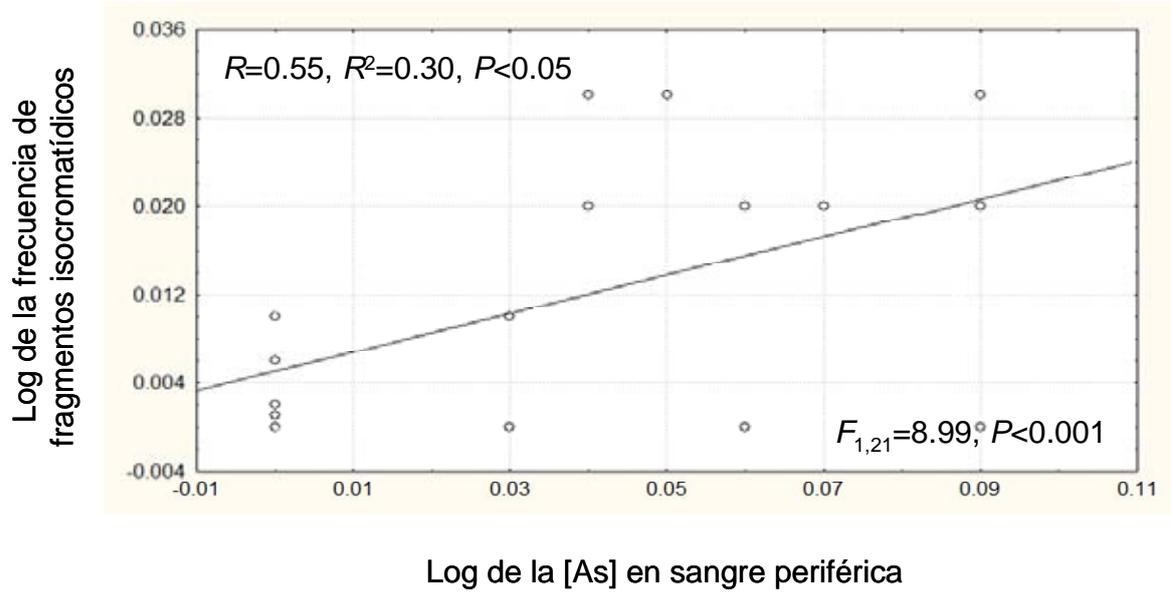
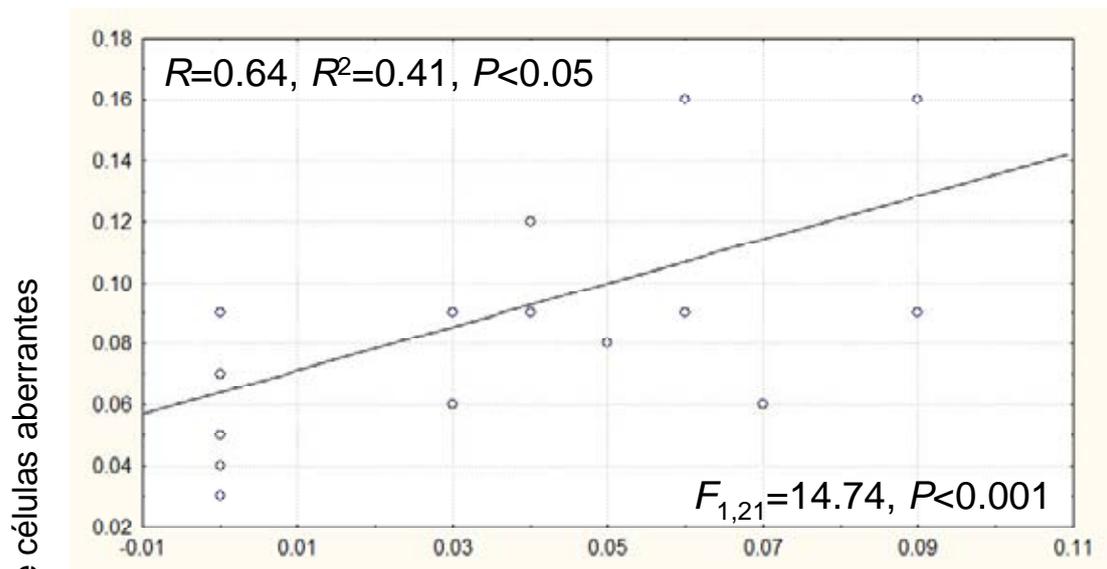


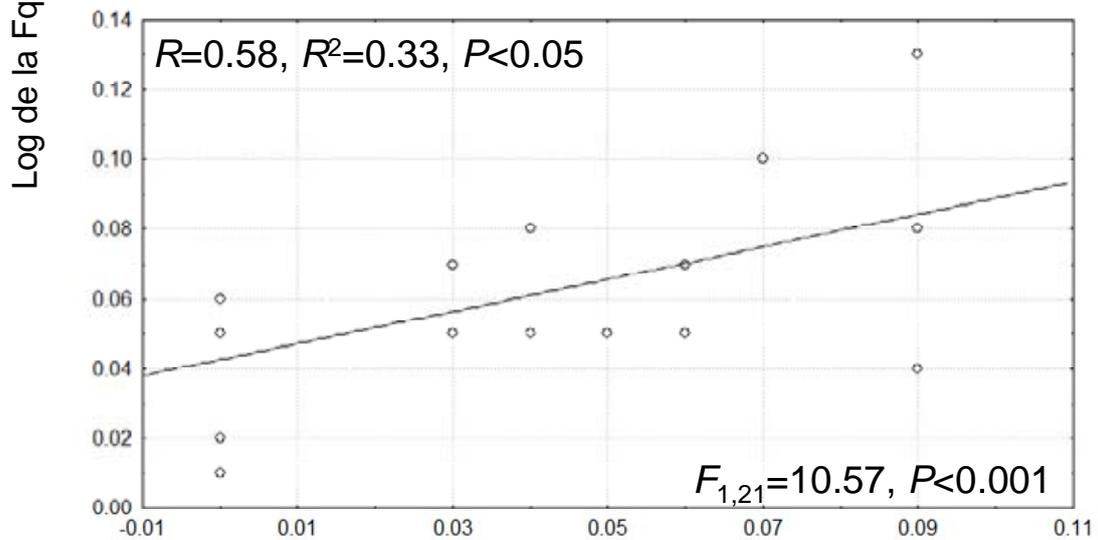
Figura 16. Regresiones entre los fragmentos isocromatídicos y la concentración de arsénico en sangre periférica de individuos expuestos y testigos.



### Porcentaje de Células Aberrantes con Gaps



### Porcentaje de Células Aberrantes sin Gaps



Log [As] en sangre periférica

Figura 18. Regresiones entre el porcentaje de células aberrantes (con y sin gaps) y la concentración de arsénico en sangre periférica de individuos testigos y expuestos.

Cuadro 3. Resumen de las todas las aberraciones cromosómicas analizadas ( $x \pm e.e$ ) de la población expuesta (Huautila, Morelos) y testigo (Ajuchitlán, Morelos). Todos los parámetros analizados muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo.

n	Porcentaje de aberraciones cromatídicas		Aberraciones cromatídicas por célula	IM(%)	IR(1-3)	Porcentaje de células Aberrantes s/gaps	Porcentaje de células Aberrantes c/gaps
	S/gaps	C/gaps					
T= 12	0.03±0.01	0.03±0.02	0.05±0.01	4.95±0.63	1.37±0.05	2.67±1.20	4.67±1.20
E= 12	0.09±0.01 0.11±0.01		0.09±0.01	7.44±0.58	1.96±0.06	6.75±1.99	9.75±1.06
t	3.790**	2.882**	2.107*	2.796**	8.275***	2.621**	2.719***

n= número de sujetos, T = testigo, E = Expuesto, IM = índice mitótico, IR = índice de replicación, t = valor de la prueba t-student, \* =  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **EFEECTO DE LA EDAD, CONSUMO DE TABACO E INGESTA DE ALCOHOL SOBRE LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Finalmente, se hicieron regresiones para saber si había un efecto de la ingesta de alcohol, el consumo de tabaco y la edad de los participantes sobre el total de aberraciones cromosómicas con y sin gaps. En ningún caso se encontró relación entre los parámetros antes mencionados y el daño genético analizado tanto para la población expuesta (Huautila, Morelos) como para la población testigo (Ajuchitlán, Morelos).

## DISCUSIÓN

Los seres humanos están expuestos a una gran variedad de agentes químicos que pueden ser carcinógenos, por lo que, al evaluar exposiciones biológicamente relevantes, es de suma importancia buscar directamente en los individuos o poblaciones expuestas, biomarcadores de efecto temprano. Los resultados obtenidos por otros autores y los logrados en este estudio acerca del biomonitoreo humano de efectos tempranos, como el daño citogenético, pueden ayudar a predecir riesgos potencialmente carcinogénicos, los cuales se discuten a continuación.

### **PRESENCIA DE ARSÉNICO EN EL AGUA DE BEBIDA DE HUAUTLA, MORELOS.**

Este estudio ha demostrado que el agua proveniente de la mina “Pájaro Verde” en el poblado de Huautla, Morelos, está contaminada por arsénico y que los individuos muestreados están expuestos a este metaloide mediante este recurso.

La causa más común de encontrar al metaloide en el agua, es la presencia de minerales en el suelo con alto contenido del metal, como la arsenopirita, escoradita y la orpimenta, los cuales pueden aparecer en distintos ambientes geológicos, en estos casos se observa una correlación positiva entre el pH y las concentraciones de arsénico en el agua (Díaz-Barriga, 1999). Tomando en cuenta lo anterior, en la zona de estudio, hay suelos ricos en minerales con alto contenido de arsénico (SEMARNAT, 2005), como los mencionados anteriormente, lo cual puede estar contribuyendo en gran medida a la contaminación del agua por arsénico.

Otro de los orígenes de esta contaminación son las fuentes antropogénicas y en especial la lixiviación de residuos de los jales a los cuerpos de agua cercanos, debido a que los jales de Huautla se encuentran a la intemperie y al borde del “*Arroyo Chico*”, el cual se junta con los arroyos *Juchitlán*, *Salitre* y *Atlipa*, para formar el “*Arroyo Grande*” que desemboca en el Río Amacuzac.

Tomando en cuenta los estudios realizados por SEMARNAT (2004, 2005) los cuales indican la presencia de altos contenidos de As en los jales de la región (hasta 274 mg/kg) revasando los límites máximos permisibles propuestos por la PROFEPA para As (20 mg/kg suelo residencial y 40 mg/kg suelo industrial), podemos decir que la contaminación del agua por arsénico se debe a la combinación de factores naturales y antropogénicos. Lo anterior concuerda con observaciones hechas en otras regiones

donde la combinación de éstos dos factores es la causa de la contaminación (Armienta *et al.*, 1993, 2001; García *et al.*, 2001; Mendez y Armienta, 2003).

Por otra parte, las concentraciones promedio de As registradas tanto en la mina “Pájaro Verde” como en el tanque de depósito ( $x = 237 \mu\text{g/l}$ ) revelan que se encuentran por arriba de las normas mexicanas e internacionales y en general, por debajo de las concentraciones registradas en otras zonas estudiadas en el mundo y en México, por ejemplo: Ostrosky *et al.* (1991) describen en la región lagunera, específicamente en el poblado de Santa Ana (Coahuila)  $390 \mu\text{g/l}$  de arsénico en agua de bebida, en este mismo sitio, 6 años después se registra una concentración de  $408.17 \mu\text{g/l}$  (Gonsebatt *et al.*, 1997). Por otro lado, Mendez y Armienta (2003) reportan que en Zimapán, Hidalgo las concentraciones de As registradas en agua de bebida son mayores a  $1100 \mu\text{g/l}$ .

En Chile, en el poblado de San Pedro de Atacama, Aposhian *et al.* (2000) registraron concentraciones de As en agua de  $593 \mu\text{g/l}$ . También, en Finlandia se encontraron  $410 \mu\text{g/l}$  de arsénico en agua (Maaki-Paakkanen *et al.*, 1998) y una de las regiones más contaminadas del mundo por este agente es Bangladesh, donde las concentraciones rebasan 100 veces la norma establecida por las organizaciones internacionales antes mencionadas. En general, Huautla representa un escenario de exposición crónica al metaloide a concentraciones menores a las registradas en otras zonas de nuestro país y del mundo, por lo que los efectos de arsénico en los individuos expuestos pueden ser distintos a los de otras poblaciones.

## **CONCENTRACION DE ARSENICO EN SANGRE: ¿UN BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN ÚTIL?**

### **ARSÉNICO EN SANGRE Y AGUA DE BEBIDA**

Tomando la concentración de arsénico total en sangre periférica como un biomarcador de exposición de dosis interna, podemos decir que efectivamente, el metaloide está ingresando al organismo, rebasando los límites sugeridos por Hall *et al.* (2006), ATSDR (2006), Hall *et al.* (2007) y Gamble *et al.* (2007), que establecen que el metaloide no debe exceder una concentración mayor a  $50 \mu\text{g/L}$  en sangre periférica.

En la población expuesta se registró una concentración promedio de arsénico total en sangre periférica de  $60 \mu\text{g/L}$ . la cual, sobrepasa el límite antes mencionado. En exposiciones únicas, la dosis de As en sangre es eliminada rápidamente del organismo por el riñón, por lo que estas concentraciones reflejarían exposiciones recientes (Pandey

*et al.*, 2007). Sin embargo, durante exposiciones crónicas y continuas las concentraciones del metaloide en sangre se mantienen constantes, por lo que puede evidenciar exposiciones pasadas y reflejar la carga de As en el individuo, por lo que se ha utilizado como biomarcador de exposiciones pasadas (Morton y Dunette, 1994; Wu *et al.*, 2001; Gamble *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2007). De hecho, se cree que en exposiciones crónicas, en el tejido hematopoyético residen concentraciones de As de otros tejidos, lo que puede reflejar de mejor manera la concentración total interna del metal en el organismo que cuando se estima con otros biomarcadores (Morton y Dunette, 1994; Wu *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2006; Gamble *et al.*, 2007).

Las concentraciones de As total en sangre han sido correlacionadas con las presentes en el agua de bebida, con el tiempo de exposición y la concentración total en orina, al respecto, Hall y colaboradores (2006) estudian una población expuesta a As por agua de bebida, en individuos sin lesiones de piel (n= 849) y con ellas (n= 303), los primeros tomaron agua contaminada (103.1 µg /L) durante un promedio de 8.6 años y presentaron una concentración de As total en orina de 137.3 µg/L y en sangre de 11 µg/L. Los segundos tomaron agua contaminada (157.4 µg /L) durante un promedio de 10 años, presentando concentraciones de As total en orina de 172 µg/L y en sangre de 14.3 µg/L, lo que indica que al aumentar las concentraciones de As en agua e incrementarse el tiempo de exposición, el As en orina y sangre aumenta, por lo que se reportó una correlación positiva y significativa entre estos parámetros. Los autores también observaron un comportamiento dosis-respuesta entre el riesgo de presentar lesiones en piel y los biomarcadores de exposición antes mencionados, los que mejor se correlacionaron fueron la concentración de As en sangre y la de orina y se correlacionaron de manera similar con la concentración de As en agua. Por otro lado, Goyer (1984), Morton y Dunette (1994) y Klassen (2001) apoyan lo anterior ya que establecen que las concentraciones de arsénico total en sangre son un marcador útil para estudiar exposiciones humanas al metaloide y que en muchos casos éstas se relacionan con las de arsénico en agua.

También, Wu *et al.* (2001) observaron que a mayor concentración de As en agua de bebida, aumenta la de As en sangre, reportando que hay una correlación positiva y significativa ( $r = 0.41$ ,  $p = 0.001$ ) entre los niveles de As en sangre periférica ( $9.60 \pm 9.96$  µg/L, con un intervalo de 0 a 46.50 µg/L) y el nivel de especies reactivas de oxígeno encontradas y una relación inversa ( $r = -0.30$ ,  $p = 0.014$ ) con el nivel de antioxidantes en plasma de estos sujetos. Los autores concluyen que este biomarcador

es muy útil para estudiar exposiciones continuas, en contraste con las concentraciones de As en orina que son útiles para estimar exposiciones recientes (días) o las concentraciones en pelo y uñas que son útiles para estudiar exposiciones recientes en el orden de meses.

Por su parte Vahter *et al.* (1995) reportan una concentración de As en agua de bebida de 0.200 mg/L y una concentración promedio de As en sangre periférica de individuos expuestos de 76 µg/L. Lo anterior soporta los resultados obtenidos en este estudio ( $60 \pm 9.0$  µg/L de As en sangre y 237 µg/l, de As en agua de bebida). Por lo que, creemos que la concentración de As total en sangre de individuos expuestos a éste mediante el agua de bebida es un buen biomarcador de exposición útil para estudiar exposiciones continuas, que ofrece información acerca de la cantidad del metal en el organismo y éste se puede correlacionar con distintos parámetros como: cantidad de As en agua de bebida y en orina (Morton y Dunette, 1994; Klassen, 2001; Hall *et al.*, 2006; Gamble *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2007), nivel de oxidantes y antioxidantes en plasma (Wu *et al.*, 2001) expresión de moléculas proinflamatorias en linfocitos (Wu *et al.*; 2003) y enfermedades vasculares (Wu *et al.*, 2003; Tchounwou *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2007), entre otros.

## **RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACION DE ARSÉNICO EN SANGRE Y LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS**

Nuestros resultados demuestran que la concentración de As en sangre se correlaciona de manera positiva y significativa con todas las aberraciones cromosómicas analizadas. Aunque la concentración de As en sangre se ha correlacionado con otras variables como ya se mencionó anteriormente, hasta ahora no hay datos en la literatura que relacionen la concentración de As en sangre de individuos expuestos con los diferentes tipos de AC. Esto se debe a que el As en sangre no había sido el marcador más utilizado para medir la carga interna de As en el organismo ya que la metodología empleada para este fin es más detallada y costosa que la medición de As en orina.

De las AC analizadas, las deleciones cromatídicas registraron los coeficientes de correlación más altos ( $r=0.84$ ). Este tipo de lesiones son muy frecuentes en linfocitos de personas expuestas a As en agua de bebida, como lo reportan varios autores (Lee *et al.*, 1985; Ostrosky *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1995; Gonsebatt *et al.*, 1997; Basu *et al.*, 2001; Mahata *et al.*, 2003; Chackraborty *et al.*, 2006). Esto se debe a que el As es

considerado como un agente “S” dependiente, lo que quiere decir que las aberraciones son producidas durante la fase “S” o “G2” del ciclo celular. En linfocitos de sangre periférica (en G0) la mayoría de los agentes químicos como el As inducen AC tipo cromtídicas. La aberraciones producidas, sólo se reflejarán en los linfocitos de sangre periférica después de la estimulación *in Vitro*. Sin embargo, estas células pueden acarrear lesiones sin reparar o mal reparadas, las cuales resultan en la formación de AC durante la replicación del material genético *in-vitro* (Sorsa *et al.*, 1992) y que las aberraciones de tipo cromatidico que caracterizan a los agentes “S” dependientes indican que la producción de AC es un evento post-replicativo (Savage,1990).

La aberración que menor coeficiente de correlación presentó ( $r=0.55$ ) fueron los fragmentos isocromatídicos, esta aberración fue la menos abundante en comparación con las deleciones, fragmentos sencillos y gaps.

Lo anterior expuesto es una evidencia más de que el As en sangre puede ser un biomarcador útil de exposición que se correlaciona positiva y significativamente con daño genotóxico.

## **ÍNDICES MITÓTICOS Y DE REPLICACIÓN**

En este estudio observamos diferencias estadísticamente significativas en la población expuesta ( $7.44\pm 0.58$ ,  $1.96\pm 0.06$ ) con respecto a la población testigo ( $4.95\pm 0.63$ ,  $1.37\pm 0.05$ ), entre el índice mitótico y de replicación respectivamente. Lo anterior establece que los linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos responden más rápido al estímulo de proliferación (fitohemaglutinina) y entonces observamos más células en metafase en comparación con los linfocitos de los individuos testigos. También, los linfocitos de los individuos expuestos proliferan más rápido en comparación con los testigos, por lo que podemos decir que hay un mayor número de células ciclando y que éstas proliferan más rápido.

Recordando la hipótesis de que el arsénico y sus compuestos son capaces de alterar la regulación del ciclo celular tanto positiva como negativamente en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, y con distintas concentraciones, en este estudio se encontró un efecto positivo en el ciclo celular de los linfocitos de individuos expuestos, lo que podría explicarse de la siguiente manera:

Se ha reportado que el arsénico en concentraciones bajas ( $0.1 \mu\text{M}$ ), no tóxicas y con una exposición a largo plazo, altera vías de señalización dependientes de P53 en

células humanas, comprometiendo la habilidad de éstas células para responder al daño genotóxico, previniendo el incremento de p21 (Vogt y Rossman, 2001).

Se cree que el As regula a c-Myc positivamente (Germolec *et al.*, 1997; Trouba *et al.*, 2000) lo que inhibe la expresión de p21 y regula positivamente a la ciclina D. Niveles bajos de p21 se requieren para activar a ciclina D1-cdk4/6, mientras que niveles altos de p21 la inhiben (Mitchell y El-Deiry 1999; Bouchard *et al.*, 1999). Cuando hay bajos niveles de p21, pRb se fosforila y se inactiva, lo que promueve la división celular; en estas células el mecanismo de p53-p21-Apoptosis está bloqueado, por lo que se activa el ciclo celular. También se ha observado que las células con daño y p53 alterado es más probable que sigan ciclando a que se mueran por apoptosis, y a su vez, presentan elevadas frecuencias de aberraciones cromosómicas (sobre todo deleciones) (Hainaut 1995; Labaer *et al.*, 1997; Vogt y Rossman, 2001). De igual forma, se ha registrado en una gran cantidad de células neoplásicas que el circuito de arresto del ciclo celular que involucra a pRb está alterado (Hannahan y Weinberg, 2000).

Tromba *et al.* (2000) observaron que en fibroblastos tratados con arsenito de sodio, se incrementa la cantidad de células que entran a fase “S” del ciclo celular, al analizar las proteínas reguladoras del ciclo positivamente, encontraron que factores de sobrevivencia como c-myc y E2F-1 estaban sobreexpresados, en contraste con factores reguladores de proliferación negativamente como MAP-K-fosfatasa-1 y p27 que registraron una menor expresión. Lo que apoya la hipótesis de que el arsénico desregula la proliferación celular al sobreexpresar factores de sobrevivencia y no expresar factores de regulación negativa, lo que contribuiría a su estatus como agente carcinógeno.

Otra posibilidad para explicar nuestros resultados es que el As es capaz de hipermetilar a p53 y p16 en modelos *in vitro* (Mass y Wang, 1997; Suzuki *et al.*, 2006) y en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos mediante agua de bebida (Pilsner *et al.*, 2007) lo que reafirma que el As es capaz de regular el ciclo celular positivamente silenciando la expresión de genes supresores de tumores como p53.

Tomando en cuenta que los linfocitos de las personas expuestas ciclan más rápido y que se observó una elevada frecuencia de AC, podemos sugerir que estas células presentan un fenómeno conocido como: “inestabilidad replicativa”, el cual se da en aquellas células que son capaces de ciclar en presencia de una gran cantidad de lesiones como las AC producidas por metales y otros compuestos químicos (Belyaev, 2004).

## **INDUCCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN INDIVIDUOS EXPUESTOS A ARSÉNICO MEDIANTE AGUA DE BEBIDA**

Los biomarcadores citogenéticos han jugado un papel esencial para estudiar y estimar riesgo a la salud por acción de los contaminantes, en especial las aberraciones cromosómicas constituyen uno de los sistemas más confiables y utilizados para evaluar riesgo en poblaciones humanas expuestas.

Nuestros resultados muestran que las frecuencias de todas las AC analizadas presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo testigo y el expuesto, a excepción de los “gaps” o brechas y que las AC más comunes fueron las de tipo cromatídico. Lo anterior concuerda con estudios que demuestran que la ingesta de agua contaminada por As provoca un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica y que las más comunes son de tipo cromatídico (Lee *et al.*, 1985; Ostrosky *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1995; Gonsebatt *et al.*, 1997; Basu *et al.*, 2001; Mahata *et al.*, 2003; Chackraborty *et al.*, 2006).

Por ejemplo: Mahata *et al.* (2003) reportan diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros citogenéticos analizados, registrando un porcentaje de células aberrantes con gaps de  $8.08 \pm 0.24$  y una frecuencia de AC cromatídicas/célula de  $0.08 \pm 0.002$ , lo que apoya a lo encontrado en este estudio ( $9.75 \pm 1.06$  y  $0.09 \pm 0.01$ , respectivamente) ya que las concentraciones de As en agua registradas ( $211.70 \pm 15.28$ ) son similares a la población de Huautla.

Otros estudios con diferentes niveles de As en agua de bebida, que reportan frecuencias más elevadas de AC en comparación con las encontradas en este estudio, son Gonsebatt *et al.*, (1997) Liou *et al.*, (1999), Maaki-Paakanien (1998), Ostrosky *et al.*, (1991). Estas diferencias en las frecuencias reportadas pueden deberse a varios factores como: diferencia en la concentración de As en agua, diferentes polimorfismos genéticos de enzimas involucradas en el metabolismo de xenobioticos, de reparación y del metabolismo del folato de los individuos expuestos. También, la exposición a otros genotóxicos, la producción interna de radicales libres y otras especies genotóxicas, el estatus nutricional y estilo de vida pueden arrojar diferencia en las frecuencias de AC (Norppa *et al.*, 2006).

En cuanto a los resultados obtenidos con los “gaps” o brechas, pensamos que no encontramos diferencias en la inducción de éstos entre la población testigo y expuesta

debido a que se ha postulado que los gaps o lesiones acromáticas podrían representar sitios de descondensación de cromatina, puntos de síntesis de ADN incompleta, sitios de intercambio muy pequeños, errores en la condensación de cromatina o artefactos técnicos y no lesiones reales en la cromátida, por lo que su frecuencia es parecida en individuos expuestos y testigos. Por ello, su importancia biológica es controvertida, razón por la cual, se realizaron los análisis con y sin gaps. (Savage, 2004; Natarajan *et al.*, 2002). Numerosos estudios han reportado que no hay diferencias en la inducción de gaps entre individuos testigos y expuestos, (Bender *et al.*, 1987; Gonsebatt *et al.*, 1997; Maaki-Pakaanien, 1998; Mahata *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2001; Au y Salama, 2005), lo que apoya nuestros resultados.

Una gran cantidad de evidencia demuestra que el As y sus compuestos (sobre todo los trivalentes) son capaces de producir AC (Basu *et al.*, 2005; Norppa *et al.*, 2006). Los mecanismos propuestos son muy variados, pero el común denominador es que el As es un agente clastógeno. Es decir, produce rompimientos de ADN, ya que para que se produzca una aberración por un agente “S” dependiente debe haber rompimientos de cadena sencilla o RCS, los cuales al ser procesados por los mecanismos de replicación o reparación pueden ser convertidos en rompimientos de cadena doble (Chadwick y Leenhouts, 1981; Savage, 1998; Savage 2004).

Las aberraciones cromosómicas se producen por RCD, los cuales pueden ser generados por diferentes procesos fisiológicos y por exposición a agentes externos como la radiación ionizante. La mayoría de los compuestos químicos no son capaces de inducir RCD directamente, sin embargo, generan otras lesiones en el material genético, las cuales durante procesos de reparación o síntesis de ADN pueden dar lugar a RCD y eventualmente a AC (Obe *et al.*, 2002). Si los RCD no se reparan correctamente pueden resultar en mutaciones, rearrreglos cromosómicos y transformación oncogénica. En la mayoría de los casos, cuando los RCD son pocos, éstos son reparados correctamente, o bien llevan a alteraciones de pequeña escala (algunas bases o kilobases) las cuales se pueden analizar mediante secuenciación u otros métodos. En algunos casos los RCD resultan en alteraciones de gran escala, visibles como AC. Por esto las AC son consideradas como alteraciones microscópicas consecuencia de una gran variedad de productos generados por los mecanismos de reparación de los RCD (Savage, 1990; Obe *et al.*, 2002).

En este contexto, la inhibición o alteración de la reparación de ADN resulta en un evento genotóxico. La reparación puede inhibirse en células tratadas con As, este

efecto puede resultar en un evento co-mutagenico con la luz UV, rayos X y algunas sustancias químicas. Okui y Fujiwara (1986) y Lee-Chen *et al.* (1992) reportan que la reparación por escisión de bases de los dímeros de timina fue inhibida en fibroblastos humanos por As inorgánico. Li y Rossman, (1989) observan que la actividad de la ligasa II esta disminuida en extractos celulares tratados con arsenito. Estos autores concluyen que la ligasa II es más sensible a los efectos del arsenito que la ligasa I.

Hu (1998) explica lo anterior, postulando que este efecto es por alteración en los patrones de fosforilación de proteínas relacionadas con la actividad de la ligasa. Otro hallazgo importante es que las células eucarióticas responden a la generación de rompimientos de ADN, activando a la enzima Poly-(ADP-ribosa) polimerasa, la cual está involucrada en la reparación de rompimientos de cadena doble de ADN (Huges, 2002), la actividad de esta enzima se ve afectada en un 50% en células de linfoma-T tratadas con arsenito. La Poly-(ADP-ribosa) contiene dos grupos sulfhidrilo vecinos, a los cuales se puede unir el As y alterar su función (Yager y Wiencke, 1997; Hartwig *et al.*; 2003, Beyersmann y Hartwig, 2008).

Por su parte Hartwig *et al.* (1997) investigan el efecto del As III sobre la reparación por escisión de nucleótidos en fibroblastos humanos después de irradiarlos con luz UV, concluyendo que este proceso se ve afectado, al igual que la reparación genómica global y la reparación acoplada a la transcripción por la exposición a arsenito.

También se ha observado que células con p53 alterado presentan un elevado porcentaje de deleciones, translocaciones, amplificaciones y aneuploidía, lo que asemeja a los efectos genotóxicos del As. Aparte de las funciones de p53 en los puntos de chequeo, éste participa en la reparación de ADN, en células con p53 deficientes un gran número de deleciones se han observado, sugiriendo que intermediarios de este daño como los rompimientos de ADN o los gaps o brechas, se acumulan durante procesos de reparación deficientes (Vogt y Rossman, 2001).

Otro de los mecanismos mejor estudiados en cuanto a la genotoxicidad del As, es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's). Las células generalmente se pueden adaptar a concentraciones fisiológicas de ERO's con ayuda de los sistemas antioxidantes, sin embargo concentraciones mayores pueden causar daño oxidante, alterando blancos moleculares como el ADN (Quian *et al.*, 2003). Se sabe que el arsénico es capaz de inducir daño oxidante en una gran variedad de células, incluyendo de mamíferos y humanos en especial en linfocitos de sangre periférica (Nesnow *et al.*, 2002).

La formación de ERO's por parte del As puede ser por: disminución del potencial de membrana mitocondrial, alteración de las concentraciones celulares de glutatión, activación de NADH oxidasa y por la oxidación de arsenito a arseniato (Del Razo *et al.*, 2001). De todos los efectos producidos por estos mecanismos, el daño al ADN es probablemente el de mayor importancia biológica ya que se ha demostrado que se pueden producir AC, sobre todo deleciones por acción de las ERO'S y se ha relacionado con la formación de la 8-oxo-2-deoxyguanina (8-oxo-dG), una lesión de gran importancia biológica, la cual al tratar de ser reparada por la células pueden formarse AC (Quian *et al.*, 2003).

Otros estudios que apoyan lo anterior, han demostrado que el As baja la concentración de antioxidantes como glutatión, superóxido dismutasa y catalasa, lo que aumenta su potencial clastógeno, y sugiere que los ROS juegan un papel importante en la inducción de genotoxicidad en células de mamífero (Norderson y Beckman 1991, Hey y Liu 1998; Quian *et al.*; 2003).

Otra posibilidad de generar AC por parte del este metaloide reside en la alteración de los mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, El estudio realizado por Mass y Wang (1997) demuestra que células tratadas con arsenito de sodio, presentan más citocinas metiladas en la región promotora de P53 que los testigos, también observaron que en general, la mayoría de las secuencias CpG se encontraban mayormente metiladas, lo cual podría afectar el anclaje de factores de transcripción y así modificar la expresión de éste y otros genes. Por su parte Huges (2002) reportó que en células transformadas por arsenito de sodio, la actividad de las ADN-Metil-transferasas se redujo hasta un 40% con respecto a los controles y que este fenómeno solo se observa en células tratadas de manera crónica, la expresión del gen de las ADN-Metil transferasas se incremento al doble, lo que se atribuye a un esfuerzo de las células por aumentar la actividad de estas enzimas. Plisner *et al.* (2007) realizan un estudio *in-vivo* en personas expuestas de manera crónica a As en agua de bebida en Bangladesh, donde demuestran que existe una relación positiva entre el grado de metilación en linfocitos de sangre periférica y la exposición a arsénico, dependiente de la dosis. Este efecto se vio afectado por el estatus de folato en el organismo, concluyendo que aquellas personas con deficiencias de folato presentan mayor metilación genómica en linfocitos de sangre periférica. Tomando en cuenta este hecho y sabiendo que la población de Huautla presenta deficiencias nutricionales y de folato (SUIVE, 2003; Rondán-Antuna, 2003) podríamos decir que esto hace a los pobladores de Huautla más susceptibles a los

efectos del As lo que a su vez podría elevar su frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Se sabe que todas estas alteraciones podrían ser causa de transformación maligna y que tanto estados de hiper o hipometilación de ADN, pueden co-existir en células humanas tratadas con arsenito, lo que sugiere que la metilación alterada de una secuencia de ADN específica puede ser más importante que el estado global de metilación en el que se encuentre la célula (Huges, 2002).

Finalmente, cuando se trabaja en poblaciones humanas con parámetros de genotoxicidad, es importante tomar en cuenta factores que podrían afectar los resultados como el consumo de alcohol, el hábito tabaquico y la edad. Los resultados obtenidos a este respecto demuestran que ninguno de estos factores afecta la frecuencia de AC totales con y sin gaps para ninguna de las poblaciones analizadas.

En cuanto al hábito tabaquico y la ingesta de alcohol esto podría explicarse debido a que los individuos muestreados son poco fumadores (6.6 cigarros/día). Lo cual, probablemente no es suficiente para generar RCD y AC. Se ha visto que el tabaco y el alcohol son agentes genotóxicos que generan rompimientos de cadena sencilla (RCS) y en otras técnicas utilizadas para medir daño genotóxico como el “ensayo cometa”, se han observado resultados positivos pero sólo con individuos fumadores (más de 1 cajetilla/día), e individuos con alta ingesta de alcohol y en conjunto con otros factores (King *et al.*, 1997; Pitarque *et al.*, 1999; Hyland *et al.*, 2002; Fracasso *et al.*, 2006). Esta sería una de las razones por las que no se observó mayor daño en los individuos fumadores y con ingesta de alcohol.

Los resultados anteriores están de acuerdo con otros estudios en poblaciones humanas donde los parámetros antes mencionados no elevan la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Bender *et al.*, 1987; Gonsebatt *et al.*, 1997; Liou *et al.*, 1999).

En cuanto a los resultados obtenidos con la edad, en otras técnicas, como la de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), o ensayo cometa se ha visto que la edad si es un factor determinante de variación en las frecuencias de ICH o RCS, pero no para las AC ya que éstas últimas son un daño más grueso el cual necesita de otros factores para elevar su frecuencia. Nuestros resultados están de acuerdo con la mayoría de los trabajos donde la edad no es un factor que altere la frecuencia de AC (Bender *et al.*, 1988). También podría deberse a que el número de individuos muestreados para cada grupo de edad es poco para evidenciar una diferencia debida a este factor.

Por último, es importante recalcar el aporte de estudios como éste donde el uso de biomarcadores de exposición -como la concentración de arsénico en sangre- puede ser utilizado en el estudio de poblaciones potencialmente expuestas y en particular en poblaciones o individuos que presenten elevadas concentraciones de creatinina en orina, lo cual hace difícil la medición de la concentración del metal en este tejido, por lo que, este biomarcador ofrece otra posibilidad como indicador de exposición. Asimismo, el uso de biomarcadores de efecto -como los citogenéticos- pueden identificar poblaciones humanas que pudieran estar en riesgo, lo cual permite prevenir a la población en caso de que se encuentre afectada, así como a las autoridades correspondientes a encontrar soluciones para que se disminuya, o en su caso se elimine la fuente de contaminación.

## CONCLUSIONES

- Este estudio ha demostrado que el agua proveniente de la mina “Pájaro Verde” en el poblado de Huautla, Morelos, esta contaminada por arsénico y que los individuos muestreados están expuestos a este metaloide mediante este recurso.
- Los niveles de arsénico presentes tanto en la mina “Pájaro Verde” como en el depósito del poblado de Huautla, Morelos, sobrepasan los límites máximos permisibles establecidos por normas Mexicanas e internacionales.
- Los niveles de arsénico en sangre periférica de los individuos expuestos sobrepasa los límites sugeridos, corroborando la exposición a este metaloide.
- Los linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos registran un mayor número de células en metafase y un ciclo celular acelerado, con respecto a los individuos testigos, lo que apoya los efectos de regulación positiva del ciclo celular por parte del arsénico y su carácter carcinogénico.
- El arsénico fue capaz de inducir aberraciones de tipo cromatídico en linfocitos de sangre periférica de los individuos expuestos.
- La concentración de arsénico en sangre periférica se correlacionó positiva y significativamente con todos los parámetros de daño genético analizados.
- Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan y corroboran que la concentración de As total en sangre es un buen biomarcador de exposición, útil para estudiar exposiciones continuas, que ofrece información acerca de la cantidad del metal en el organismo y éste se puede correlacionar con distintos parámetros. Asimismo, éste puede ser utilizado en poblaciones expuestas que presenten daño renal y en donde la cantidad de arsénico en orina no pueda ser medida por las variaciones en los niveles de creatinina.

- Ya que las aberraciones cromosómicas son el biomarcador más aceptado para estimar riesgo en poblaciones humanas, podemos decir que la población de Huautla, Morelos, está en riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el arsénico y sobre todo cáncer.
- Este es el primer estudio que refiere contaminación por arsénico en la zona y riesgo a la salud en pobladores expuestos.

## LITERATURA CITADA

Abernathy C, Liu Y, Longfellow D. 1999. Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health Perspect.* 107: 593-597.

Ahmad S, Bandaranayake D, Khan A. 1997. Arsenic contamination in ground water and arsenicosis in Bangladesh. *Int. J. Environ. Health Res.* 7: 271-276.

Ahmad S, Sayed M, Hadi S. 1999. Arsenicosis in a village in Bangladesh. *Int. J. Environ. Health Res.* 9:187-195.

Ahsan H, Perrin M, Rahman A. 2000. Associations between drinking water and urinary arsenic levels and skin lesions in Bangladesh. *J. Occup. Environ. Med.* 42: 1195-1205.

Andrewes P, Kitchin K, Wallace K. 2003. Dimethylarsine and trimethylarsine are potent genotoxins in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 994-1003.

Aposhian H, Gurzau E, Le X. 2000a. Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 693-697.

Aposhian H, Zheng B, Aposhian M, Chris Le, Cebrian M, Cullen W, Zakharyan R, Mingsheng Ma M, Richard D, Cheng Z, Andrewes P, Luke Y, O'Malley G, Maiorino R, Voorhies W, Healy S, y Titcomb A. 2000b. DMPS-Arsenic Challenge Test Modulation of Arsenic Species, Including Monomethylarsonous Acid (MMAIII), Excreted in Human Urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165: 74-83.

Armienta M, Rodríguez R, Villaseñor G, Aguayo A, Cenicerros N, Juárez F, Méndez T. 1993. Estudio de Reconocimiento de la Contaminación por Arsénico en la Zona de Zimapán, Hidalgo, Informe Técnico II. Informe del IGF al Municipio de Zimapán, Hgo.

Armienta M, Villaseñor G, Rodríguez R, Ongley L, Mango H. 2001. The role of arsenic-bearing rocks in groundwater pollution at Zimapán Valley, México. *Environ. Geol.* 40: 571-581.

Armienta M, Talavera G, Morten O, Barrera M. 2003. Geochemistry of metals from mine tailings in Taxco, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 387-393.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for copper*. U.S. Department of health and human services. 2004. Public Health Service E. U. A.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for arsenic*. U.S. department of health and human services. 2005. Public Health Service E. U. A.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2006. *Toxicological profile for arsenic*. Department of Health and Human Services, Public Health Service: E. U. A.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007. *Toxicological profile for arsenic*. Department of Health and Human Services, Public Health Service: E. U. A.

Au W y Salama A. 2005. Use of Biomarkers to Elucidate Genetic Susceptibility to Cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* 45: 222-228.

Avani G y Rao M. 2007. Genotoxic effects in human lymphocytes exposed to arsenic and vitamin A. *Toxicol. In-Vitro.* 21: 626-621.

Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri A. 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mut. Res.* 488: 171-194.

Basu A, Som A, Goshal S, Mondal S, Chaubey R, Bhilwade H, Rahaman N y Giri A. 2005. Assesment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicol. Lett.* 159: 100-112.

Beckman G, Beckman G y Nordenson I. 1977. Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ. Health Perspect.* 19: 145-146

Belyaev I. 2004. Molecular targets and mechanisms in formation of chromosomal aberrations: contributions of Soviet scientists. *Cytogenet. Genome Res.* 104:56-64.

Bender M, Preston R, Leonard R, Pyatt B, Gooch P, y Shelby M. 1998. Chromosomal aberrations and sister chroamtid exchanges frecuencies in peripheral blood lymphocytes of large human population sample. *Mut. Res.* 204: 421-433.

Beyersamann D y Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellualar mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82: 493-512.

Bonassi S, Znaor A, Norppa H, y Hagmard L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. 2004. *Cytogenet Genome Res.* 104:376-382.

Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Huici Montagud A, Tinnerberg H, Forni A, Heikkila P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen I, Knudsen L, y Norppa H. 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res.* 60: 1619-1625.

Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley- Hudr J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J y Eilers M. 1999. Direct induction of cyclin D2 by *Myc* contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo. J.* 18: 5321-5333.

Brusick, D. 1987. Principles of genetic toxicology. Plenum Press, Nueva York. EUA.

Bryant P, Gray L y Peresse N. 2004. Progress towards understanding the nature of chromatid breakage. *Cytogenet. Genome Res.* 104: 46-55.

Carrillo A, y Drever J. 1998. Adsorption of arsenic by natural aquifer material in San Antonio, El triunfo, Baja California, Mexico. *Environ. Geol.* 35: 251-257.

Carrillo-Chavez A, Morton-Bermea O, González-Partida E, Rivas-Solorzano H, Oesler G, García-Meza H, Hernandez E, Morales P y Cienfuegos E. 2003. Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico. *Ore. Geol. Rev.* 23: 277–297.

Casarett y Doull. 1996. Casarett y Doull's Toxicology, The basic science of poisons. 5<sup>a</sup> edición. Mc Graw Hill. Nueva York, USA.

Castro-Larragoitia J, Kramar U y Puchelt H. 1997. 200 years of mining activities at La Paz/San Luis Potosí/México. Consequences for environment and geochemical exploration. *J. Geochem. Explor.* 58: 81–91.

Chadwick K y Leenhouts H. 1981. The Molecular Theory of Radiation Biology. Springer-Verlag. Nueva York, EUA.

Chakraborti D, Mukherjee S y Saha K. 2003a. Arsenic toxicity from homeopathic treatment. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41: 963-967.

Chakraborti D, Mukherjee S y Pati S. 2003. Arsenic groundwater contamination in Middle Ganga Plain, Bihar, India: A future danger?. *Environ. Health Perspect.* 111:1194-1201.

Chen Y, Guo Y, y Su H. 2003. Arsenic methylation and skin cancer risk in southwestern Taiwan. *J. Occup. Environ. Med.* 45: 241-248.

Chen Y, Su H y Guo Y. 2003b. Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan. *Cancer Causes Control.* 14: 303-310.

Chien-Jen ChenT, Lin-I Hsu, Chih-Hao Wang, Wei-Liang Shih, Yi-Hsiang Hsu, Mei-Ping Tseng, Yu-Chun Lin, Wei-Ling Chou, Chia-Yen Chen, Cheng-Yeh Lee, Li-Hua Wang, Yu-Chin Cheng, Chi-Ling Chen, Shu-Yuan Chen, Yuan-Hung Wang, Yu-Mei Hsueh, Hung-Yi Chiou, Meei-Maan Wu. 2005. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206: 198– 206.

CNA. Comisión Nacional del Agua. 1999. Gerencia Regional Golfo Norte. Gerencia Estatal en Hidalgo. Metales pesados en fuentes de abastecimiento en el Municipio de Zimapán, Hgo. Informe Inédito.

Cornforth M. 1998. Radiation induced damage and the formation of chromosomal aberrations. En: DNA damage and repair. Vol 2. Eds: Nickloff y Hoekstra. Human Press, Nueva Jersey, EUA.

Del Razo L, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderon-Aranda E, Manno M y Albores A. 2001. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177: 132–148.

Díaz-Barriga F. 1999. Evaluación de riesgos en zonas mineras. *Salud Pública de México.* 41:10-19.

- Edelstein D. Arsenic. 1996. *Mineral Commodity Summaries*. 703: 648-649.
- Eguchi N, Kuroda K y Endo G. 1997. Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 141-145.
- EPA. Environmental Protection Agency. Safe water standars. 1997. NPDWR: U.S.A.
- EPA. Environmental Protection Agency. Safe water standars. 2000. NPDWR: U.S.A.
- EPA. Environmental Protection Agency. Safe water standars. 2006. NPDWR: U.S.A.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2006. Arsenic contamination of irrigation water soil and crops in Bangladesh. RAP Publication: USA.
- Fortoul, T y Mussali-Galante P. Metals and its toxicological implications in health. 2007. En: Metals and its toxicological implications in health. Teresa I. Fortoul, Ed. Research Signpost. Kerala, India. 79p.
- Fracasso M, Doria D, Franceschetti P, Perbellini L y Romeo L. 2006. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicol. Lett.* 167: 131-141.
- Freeman B, DennisL y Lynch C. 2004. Toenail arsenic content and cutaneous melanoma in Iowa. *Am. J. Epidemiol.* 160: 679-687.
- Gamble M, Liu X, Slavkovich V, Pilsner J, Ilievski V, Factor-Litvak P, Levy D, Alam S, Islam M, Parvez F, Ahsan H, Graziano J. 2007. Folic acid supplementation lowers blood arsenic. *Am. J. Clin. Nutr.* 86: 1202-1209.
- Garcia A, Armienta M, y Cruz O. 2001. Sources, distribution and fate of arsenic along the Tolimán river, Zimapán, México. En *Hydro-Ecology: Linking hydrology and aquatic ecology*. Ed Acreman M. IAHS publ. 266: 57-64
- Germolec D, Spalding J, Boorman G, Wilmer J, Yoshida T, Simeonova P, Bruccoleri A, Kayama F, Gaido K, Tennant R, Burlerson F, Dong W, Lang R y Luster M. 1997. Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors. *Mut. Res.* 386: 209-218.
- Gonsebatt M, Vega L, Salazar A, Montero R, Guzman P, Blas J, Del Razo L, Garcia-Vargas G, Albores A, Cebrian M, Kelsh M, y Ostrosky-Wegman P. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.* 386: 219-228.
- Goyer R. 1986. Toxic effects of metals. The Basic Science of Poisons. En Casarett and Doull's Toxicology. Eds Klaassen C, Amdur M, Doull J. MacMillan Publishing Co. Nueva York, EUA. 582-635.
- Guo H, Yu H, Hu H. 2001. Arsenic in drinking water and skin cancers: Cell-type specificity (Taiwan, R.O.C.). *Cancer Causes Control* 12: 909-916.

Hainaut P. 1995. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr. Opin. Oncol.* 7: 76–82.

Hall A. 2002. Chronic arsenic poisoning. *Toxicol. Lett.* 128: 69-72.

Hall A, Chen Y, Ahsan H, Slavkovich V, Van Geen A, Parvez F y Graziano J. 2006. Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: results from a prospective study. *Toxicology* 225: 225-233.

Hall A, Gamble M, Liu X, Slavkovich S, Levy D, Cheng Z, van Geen A, Yunus M, Rahman M, Pilsner J, Graziano J. 2007. Determinants of arsenic metabolism: Blood arsenic metabolites, plasma folate, B12 and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environ. Health. Perspect.* 115: 1503-1509.

Hanahan D y Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.

Hartwig A, Groblinghoff U, Beyersmann D, Natarajan A, Filon R y Mullenders L. 1997. Interaction of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18: 399–405.

Hartwig A, Pelzer A, Asmuss M y Burkle A. 2003. Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian cells, *Int. J. Cancer* 104 1–6.

Hey T, Liu S y Waldren C. 1998. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. *Proc. Nat. Acad Sci.* 95: 8103–8107.

Hopenhayn C, Huang B y Christian J. 2003b. Profile of urinary arsenic metabolites during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 111: 1888-1891.

Hu, Y, Su L y Snow E. 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mut. Res.* 408: 203–218.

Huang R, Ho I, Yih L y Lee T. 1995. Sodium arsenite induces chromosome endoreduplication and inhibits protein phosphatase activity in human fibroblasts. *Environ. Mol. Mutagen.* 25: 188–196.

Hughes M. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133: 1–16.

Hyland P, Duggan O y Turbitt J. 2002. Nonagenarians from the Swedish NONA Immune study have increased plasma antioxidant capacity and similar levels of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells compared to younger control subjects. *Exp. Gerontol.* 37: 465–73.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 1980. Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metals and methallic compounds. Vol. 23

IARC. International Agency for Research on Cancer. 1987. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 31-32.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 1987. Monograph on the evaluation of carcinogenicity. An update of IARC monographs. Lyon World Health Organization, International agency for research on cancer. Vol. 1-42, suppl 7.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 1987. Monograph on the evaluation of risks to human, cadmium, mercury, beryllium and glass industry. Lyon, International agency for research on cancer. Vol 58.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 2004. Arsenic in drinking water. Summaries and evaluation. Vol 84.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2000. Censo nacional de población y vivienda, México.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2004. Información geográfica del estado de Morelos.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2004. [cuentame.inegi.gob.mx](http://cuentame.inegi.gob.mx)

Iskander Y, Vega-Carillo H y Manzanera-Acuña E. 1994. Determination of Mercury and other elements in la Zacatecana dam sediment in México. *Sci. Environ.* 148 : 45-48.

Karagas M, Tosteson T, Blum J, Klaue B, Weiss J y Stannard V. 2000. Measurement of low levels of arsenic exposure: a comparison of water and toenail concentrations. *Am. J. Epidemiol.* 152: 84-90.

Kendall R, Anderson T, Robert J, Baker R, Bens C, Carr J, Chiodo L, Cobb G, Dickerson R, Dixon K, Frame L, Hooper M, Martin C, McMurry S, Patino R, Smith E, Theodorakis C. 2001. Ecotoxicology, En: *Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of Poisons*. Nueva McGraw-Hill.

Klassen K. Toxic effects of metals. 1986. The Basic Science of Poisons.. En Casarett and Doull's Toxicology. Eds Klaassen C, Amdur M, Doull J. MacMillan Publishing Co. Nueva York, EUA. 582-635.

King C, Bristow-Craig H y Gillespie E. 1997. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75-80-year-old humans. *Mut. Res.* 377: 137-47.

Kowalska E, Moniuszko J y Kulikowska E. 1988. The effect of orally applied aqueous solutions of lead and zinc on chromosome aberrations and induction of sister chromatid exchanges in the rat (*Rattus sp.*) *Genet. Polonica* 29: 181-189.

LaBaer J, Garrett M, Stevenson L, Slingerland J, Sandhu C, Chou H, Fattaey A, Harlow E. 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11: 847-862.

Lee-Chen S, Yu C y Jan K. 1992. Effects of arsenite on the DNA repair of UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 7: 51–55.

Lee T, Huang R, y Jan K. 1985. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity and 6-thioguanine resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mut. Res.* 148: 83–89.

Lewis D, Southwick J, Ouellet-Hellstrom R. 1999. Drinking water in Utah: A cohort mortality study. *Environ. Health Perspect.* 107: 359-365.

Li J y Rossman T. 1989. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.* 2: 1–9.

Liou S, Lung J, Chen Y, Yang T, Hsieh L, Chen C y Wu T. 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area, *Cancer Res.* 59: 1481–1484.

Liu J, Zheng B y Aposhian H. 2002. Chronic arsenic poisoning from burning high-arsenic containing coal in Guizhou, China. *Environ. Health Perspect.* 110: 119-122.

Loffredo C, Aposhian H y Cebrian M. 2003. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ. Res.* 92: 85-91.

Marin-Guirao L, Marín Atucha E, Lloret Barba J, Martínez Lopez J, García Fernández A. 2005. Effects of mining wastes on a seagrass ecosystem: metal accumulation and bioavailability seagrass dynamics and associated community structure. *Marine Environ. Res.* 60: 317–337.

Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar J, Roy A, Poddar G, Nandy A, Banerjee A, Ray K, Natarajan A, Nilsson R y Giri A. 2003. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mut. Res.* 534: 133-143.

Majid M, Siddique A, Mukhart N, y Mehboob, T. 1999. Status of trace elements level in blood samples of different age populations. *J. Med. Sci.* 29: 697-699.

Maki-Paakkanen J, Kurttio P, Paldy A y Pekkanen J. 1998. Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environ. Mol Mutagen.* 32: 301–313.

Mass M, y Wang L. 1997. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mut. Res.* 386: 263–277.

Mejía, J, Carrizales L, Rodríguez V, Jiménez-Capdeville M y Díaz-Barriga F. 1999. Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pública de México.* 4: 132-140.

Méndez M y Armienta M. 2003. Arsenic phase distribution in Zimapán mine tailings, Mexico. *Geofísica Internacional* 42: 131-140

Milton A, Hasan Z, y Shahidullah S. 2004. Association between nutritional status and arsenicosis due to chronic arsenic exposure in Bangladesh. *Int. J. Environ. Health Res.* 14: 99-108.

Mitchell K y El-Deiry W. 1999. Overexpression of c-Myc inhibits p21WAF1/CIP1 expression and induces S-phase entry in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells. *Cell Growth Differ.* 10: 223-230.

Moore L, Lu M y Smith A. 2002a. Childhood cancer incidence and arsenic exposure in drinking water in Nevada. *Arch. Environ. Health* 57: 201-206.

Morton W y Dunette D. 1994. Health effects of environmental arsenic. En: Nriagu J. (ed). *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. Wiley, Nueva York. EUA.17-34p

Mussali-Galante P, Avila-Costa M, Piñón Zarate G, Martínez Levy G, Rodríguez Lara V, Rojas Lemus M, Avila Casado M, Fortoul T. 2005. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicol. Ind. Health* 21: 155-166.

Mussali-Galante P y Fortoul T. Atmospheric pollution. 2008. En: *Environmental Research Progress*. Florian P. Maes Editor. Nova Science publishers, Nueva York, EUA. 147-160p.

Nakamuro K, Sayato Y. 1981. Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mut. Res.* 88: 73-80.

Natarajan A. 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mut. Res.* 504: 3-16.

Nesnow B, Roop G, Lambert M, Kadiiska R, Mason W, Cullen M, Mass J. 2002. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1627-1634.

Nordenson I, Salmonsson S, Brun E y Beckman G. 1979. Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic. *Hum. Genet.* 48: 1-6.

Nordenson I y Beckman I. 1991. Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Hum. Hered.* 41: 71-73.

Norppa H, Bonassi S, Hansteen L, Hagmard L, Stromberg U, Rossner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Sramf R, Knudsen L, Barale A, Fucic A. 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mut. Res.* 600: 37-45.

Norma Mexicana para determinación de metales en agua. NOM-127-SSA1-1994.

Norma Mexicana para plomo en sangre. NOM-199-SSA1-2000.

Norma Mexicana para la toma de muestras de agua. NOM 014-SSA1-1993

NSGHRCD. Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage, A Nordic data base on somatic chromosome damage in humans. 1990a. *Mut. Res.* 241: 325–337.

NSGHRCD Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage, An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. 1990b. *Cancer Genet. Cytogenet.* 45: 85–92.

Obe G, Beek B y Dudin G. 1975. The human leukocyte test system. DNA synthesis and mitosis in PHA stimulated 3 day cultures. *Humangenetik* 28: 295-392.

Obe G, Pfeiffer P , Savage J , Johannes C, Goedecke W , Jeppesen P, Natarajan A , Martínez-López W, Folle G , Drets M. 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution *Mut. Res.* 504: 17–36.

Okui T y Fujiwara Y. 1986. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mut. Res.* 172: 69–76.

OMS. Organización Mundial de la Salud. 2001. Guidelines for drinking-water quality. Ginebra.

OMS. Organizacion Mundial de la Salud. 2006. Mitigación de los efectos del As presente en las aguas subterráneas de México.

Ostrosky-Wegman P, Gonsebatt M, Montero R, Vega L, Barba H y Espinosa J. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mut. Res.* 250: 477–482.

Pandey P, Yadav S, y Pandey M. 2007. Human arsenic poisoning issues in central-east indian locations: Biomarkers and biochemical monitoring. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 4: 15-22.

Perry P y Wolf S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. 1974. *Nature.* 251: 156-158.

Petres J, Baron D y Hagedorn M. 1977. Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* 19: 223–227.

Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S y Obe G. 2004. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* 104: 7–13.

Pilsner J, Liu X, Ahsan H, Ilievski V, Slavkovich V, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano J, y Gamble M. 2007. Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 86: 1179-86.

Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. 1999. Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mut. Res.* 441: 115-127.

Prieto-García F, Callejas J, Lechuga M, Gaytán J y Barrado E. 2005. Acumulación en tejidos vegetales de arsénico proveniente de aguas y suelos de Zimapán, Estado de Hidalgo, México. *Bioagro* 17: 129-136.

Qian Y, Castranova V y Shi X. 2003. New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. *J. Inorg. Biochem.* 96: 271-278.

Ramírez A. 2006. Biomarkers used to monitor heavy metal exposure in metallurgy. *An. Fac. Med.* 67: 49-58.

Ramos-Arroyo Y, Prol-Ledesma R, Siebe-Grabach CH. 2004. Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 21: 268-28.

Rojas E y Valverde M. Approach for identify antineoplastic drugs. En: Advances in cancer research at UNAM. 2007. Jaime Mas-Oliva Editor. Programa Universitario de investigación en salud y Manual Moderno. México. 326p.

Rondán Antuna S. 2003. Diagnóstico de Salud. Servicios de Salud de Morelos. Jurisdicción Sanitaria II, Tlaquiltenango, Morelos. UNAM.

Roy P y Saha A. 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen. *Curr. Sci.* 82: 38-45.

Rowley R. 1998. Mammalian cell cycle responses to DNA-damaging agents. En: (eds) J. Nikoloff y M. Hoekstra. DNA damage and repair II. Human Press. Nueva Jersey, EUA. 639p.

Salomons W. 1995. Environmental impact of metals derived from mining activities; processes, predictions, prevention. *J. Geochem. Explor.* 52: 5-23.

Savage J. 1990. Mechanisms of chromosome aberrations. En: Savage (ed). Mutation and the environment, Part B. Wiley-Liss, Nueva York, EUA.

Savage J. 1998. A brief survey of aberration origin theories. *Mut. Res.* 404: 139-147.

Savage J. 2004. On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogenet. Genome Res.* 104: 46-55.

Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M y Barbata G. 2004. Arsenic induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability. 2004. *Carcinogenesis.* 25: 413-417.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Reserva de la biosfera Sierra de Huautla. Morelos, México.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2004. Dirección general del centro nacional de investigación y capacitación ambiental. Dirección de Investigación en Residuos y Proyectos Regionales. *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. Tania L. Volke Sepúlveda J. Antonio Velasco Trejo, D. Alejandro de la Rosa Pérez, Gustavo Solórzano Ochoa.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2005. Dirección de Investigación en Residuos y Sitios Contaminados. Subdirección de Investigación en Sitios Contaminados y Sustancias Tóxicas. Informe anual de actividades. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II.

Smith A, Lingas E y Rahman M. 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the WHO* 78: 1093-1103.

Soto-Reyes E, Del Razo L, Valverde M y Rojas E. 2005. Role of the alkali labile sites, reactive oxygen species and antioxidants in DNA damage induced by methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic. *BioMetals* 18: 493–506.

SUIVE. Sistema Único de Vigilancia Epidemiológica. 2003. Centro de Salud Huautla, Morelos.

Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A. 2006. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 9: 199 –207.

Tchounwou, P Centeno J, y Patlolla A. 2004. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis – a health risk assessment and management approach. *Mol. Cell Biochem.* 255: 47–55.

The Mineral Database-mindat.org. 2004. Mineralogía de Huautla, Municipio de Tlaquiltenango, Morelos. <http://www.mindat.org/index.php>

Trouba K, Wauson E, Vorce R. 2000. Sodium arsenite induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164: 161–170.

Vahter M, Concha G, Nermell B, Nilsson R, Dulout y Natarajan A. 1995. A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 455-462.

Vahter M. 1994. What are the chemical forms of arsenic in the urine, and what can they tell us about exposure?. *Clinical Chem.* 40: 679-680.

Vega Faúndez A. 1999. Minería y Medio Ambiente. Ministerio de educación. Buenos Aires, Argentina.

Vig B, Figueror M, Cornforth M y Jenkins S. 1984. Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water. *Am. J. Ind. Med.* 6: 325–338.

Vilkina G, Pomerantseva M y Romaiia L. 1978. Lack of mutagenic activity of cadmium and zinc salts in somatic and germ mouse cells. *Genetika* 14: 2212-2214.

Vogt B y Rossman T. 2001. Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts —a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mut. Res.* 478: 159–168.

Waalkes M y Rehm S. 1994. Cadmium and prostate cancer. *J. Toxicol. Environ Health* 43: 251-269.

Wu M, Chiou H, Wang T, Hsueh Y, Wang I, y Chen C. 2001. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environ. Health. Perspect.* 109: 1011-1017.

Wu M, Hung-Yi Ch, Ching H, Chen C, y Te-Chang L. Gene Expression of Inflammatory Molecules in Circulating Lymphocytes from Arsenic-Exposed Human Subjects. 2003. *Environ Health Perspect.* 111: 1429-1438.

Yager J, Wiencke J. 1997. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mut. Res.* 386: 345–351.

Yamanaka K, Hayashi H, Kato K, Hasegawa A, Okada S. 1995. Involvement of preferential formation of apurinic/apyrimidinic sites in dimethylarsenic induced DNA strand breaks and DNA protein crosslinks in cultured alveolar epithelial cells. *Biophys. Res. Commun.* 207: 244–249.

Zar J. 2006. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New-Jersey, USA.