



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**“GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A PLOMO: DAÑO AL ADN Y  
EFECTOS SOBRE LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN”**

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARTÍNEZ BAEZA ELIA



MÉXICO, D.F.

2009



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: **DRA. MA. BENITA FERNÁNDEZ SALGADO**

**VOCAL:** Profesor: **QFB. MA. ELENA BRAVO GÓMEZ**

**SECRETARIO:** Profesor: **MAHARA VALVERDE RAMÍREZ**

**1er. SUPLENTE:** Profesor: **MC. JOSÉ PARAMO RAMÍREZ**

**2º SUPLENTE:** Profesor: **DR. LEÓN P. MARTÍNEZ CASTILLA**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

**LABORATORIO TOXICOGENÓMICA, DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**MAHARA VALVERDE RAMÍREZ**

**SUSTENTANTE (S):**

**ELIA MARTÍNEZ BAEZA**

---

# **AGRADECIMIENTOS**

## ***A mi mamá***

*Que ha sido el mayor soporte de mi vida, a ti está dedicada esta tesis, por aguantarme en mis épocas de neurosis y estrés, por confiar en mí y seguir siempre con tu apoyo incondicional, por escucharme aun cuando no me llegabas a entender. Este es uno de los mayores logros de mi vida y el cual sin ti no hubiera podido obtener, gracias por todo mamá.*

## ***A mi tío Elías***

*Si, a Ud. que estuvo apoyándome durante todo este tiempo y durante mucho tiempo mas, por tenerme paciencia y retarme para poder demostrar que podía dar más, mucho más. Por sus consejos y cariño, muchas gracias*

## ***A mi familia***

*A todos los integrantes de mi familia, a mi hermano con el cual siempre peleaba y que es mi colega, a mi hermana que nunca entiende nada de lo que le digo, a mi abuelo que nunca creía en mis explicaciones, a mis tías Margarita y Ma. Luisa que tenían la atención de preguntarme como me encontraba y a todos aquellos con los que no me une un lazo sanguíneo pero que puede más uno de cariño, gracias.*

## ***A mis amigos***

*A los pocos amigos verdaderos que tengo y que tuve la dicha de conocer en la facultad y fuera de ella, que me brindaron su amistad, ayuda y consejos, por*

*todos los momentos compartidos, pero sobre todo, por haber creado junto conmigo un espacio de libertad y confianza, el cual ha significado mucho para mí. Principalmente a mis amigos Paco, Edgar, Pamela, Lizbeth, Arturo y Ofelia.*

### **A mis profesores**

*De los cuales algunos hicieron que me interesara en el mundo de la ciencia y la investigación, la genética y la toxicología. Por su educación brindada y porque en ellos también se encuentra no solo a un maestro sino a un amigo.*

### **A la Facultad de Química y a la UNAM**

*Por abrirme las puertas y un mundo lleno de maravillosos conocimientos, por dejarme ser parte de su familia, por mi educación profesional, porque más que una escuela es y será siempre mi segunda casa.*

### **Al Instituto de Investigaciones Biomédicas**

*Por abrirme las puertas, pero especialmente un agradecimiento a mi asesora de tesis, la Dra. Mahara Valverde, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y confianza. Al Dr. Emilio Rojas, a mis compañeros de laboratorio Brenda, Martín, Vicente, Griss, Vero, Pau, Reyna, Diego, Nahúm, Pablo y Mónica, que me recibieron los brazos abiertos y me aceptaron durante el tiempo que trabaje con ellos.*

*Y gracias a todas aquellas personas que formaron parte de este periodo de mi vida.*

## ***INDICE***

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>Estudios previos del efecto genotóxico del plomo.....</b>	<b>19</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>22</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>22</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>23</b>
<b>Diseño experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>Análisis de resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>51</b>

## **INTRODUCCION**

En la actualidad y por la alta presencia de los metales en el medio ambiente, es común estar en contacto con ellos y por ende aumenta la probabilidad de intoxicación con dichos agentes, siendo los principales metales con los cuales podemos estar en contacto: zinc, cobre, vanadio, níquel, cromo, arsénico, antimonio, selenio, cadmio (Cd) y plomo (Pb) (Calderón y Maldonado, 2008).

El plomo está presente en algunos artículos cerámicos como jarras y platos. En casas antiguas se encuentran tuberías de plomo, que contaminan el agua, así como la pintura de sus paredes contienen carbonato de plomo (blanco) y óxido de plomo (rojo), lo que provoca toxicidad crónica por dicho elemento, sobre todo en niños. Otras fuentes de contaminación del plomo son: los acumuladores, juguetes de plomo, cenizas y humos de maderas pintadas, desechos de joyerías. Sin embargo la exposición no ocupacional ha disminuido notablemente en los últimos años. Los trabajadores de fundidoras de plomo y fábricas de acumuladores presentan el máximo potencial de exposición (Córdoba, 2006).

El estilo de vida es un factor importante en el riesgo de intoxicación con metales. Por ejemplo, las personas que fuman están más expuestas al Cd presente en el humo de los cigarrillos. La ingestión de alcohol puede alterar el consumo de elementos esenciales por la dieta, tales como el calcio, que influye en la disminución tóxica del Pb y el Cd. La principal exposición a agentes metálicos en niños es a través de los alimentos, ya que éstos consumen una mayor cantidad de calorías por Kg de peso en relación a los adultos; aunado a que presentan una tendencia de mayor absorción gastrointestinal de los metales (Hernández, 2008).

El plomo, es uno de los metales que producen alta toxicidad y al cual se le debe de dar gran importancia, ya que es uno de los agentes tóxicos más antiguos

que se conocen. Su toxicidad fue descrita desde el tiempo de los romanos. En la actualidad, y a pesar de los esfuerzos realizados, constituye uno de los problemas de salud pública de nuestro país, ya que se le da muy poca importancia a los efectos adversos que puede provocar a las personas que están expuestas de manera crónica al metal, así como a las intoxicaciones ocasionadas por una mala calidad de los productos fabricados en los que comúnmente se utiliza plomo o alguna de sus sales (Deisbach, 2003).

El plomo juega el papel de una neurotoxina, encontrada comúnmente en el ambiente por lo que millones de personas se encuentran expuestas a él. La intoxicación por plomo produce diversos efectos dañinos en la salud, entre los que se encuentra principalmente el daño neurológico, hepático y renal (Claudio et. al.1996). A nivel nuclear produce daño cromosomal, incrementando, la formación de micronúcleos y la frecuencia del intercambio de cromatidas hermanas, así como mecanismos indirectos tales como la inhibición de la reparación del ADN, así mismo por su homología con el calcio se ha propuesto su habilidad de actuar como promotor en la inducción de cáncer y en la generación de especies reactivas de oxígeno (Ariza et. al. 1999).

Otro factor importante que se analiza por la intoxicación de plomo, es la disminución de la actividad de la enzima  **$\delta$ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD)**, la cual interviene en la síntesis del grupo hemo al convertir el ácido  **$\delta$ -aminolevulínico (ALA)** en porfobilinogéno. En la actualidad se ha demostrado que la acumulación de ALA provoca efectos genotóxicos, neurotoxicidad y estrés oxidativo (Montenegro et. al. 2006). Reportes previos han mostrado que niveles de plomo en sangre humana están asociados con polimorfismos de ALAD, lo cual, puede influir en la distribución y acumulación de plomo en sangre y órganos blanco, modificando la toxicidad del plomo en los individuos (Claudio et. al. 1996).

# **ANTECEDENTES**

## **I. El plomo en la humanidad**

Desde el año 2000 a.C. se tienen registros de los efectos tóxicos del plomo y de sus usos en varias civilizaciones tales como la egipcia, fenicia y hebrea. En Egipto se encontraron pergaminos en donde se documentaron las primeras observaciones de la toxicidad del Pb y que estos compuestos se utilizaban principalmente con fines homicidas. En el año de 1700 a.C. en el papiro de Ewin Smith hace referencia a las intoxicaciones por Pb. Hipócrates, **en el año 370 a.C. lo menciona en su obra como “el cólico de plomo”,** siendo este, probablemente el primero en descubrir un cólico ocasionado por Pb. En el primer siglo a.C. Dioscórides se dio cuenta de la relación entre la exposición a Pb y las manifestaciones clínicas descrita hasta esos tiempos (Córdoba, 2006).

Los romanos producían grandes cantidades de plomo al año (4,000 toneladas) que utilizaban en la cerámica de vidrios y en forma metálica para utensilios de cocina, así como también en recipientes en donde hervían y condensaban el jugo de uva, con el fin de preservar y endulzar el vino. En esta civilización la intoxicación por plomo provocó mortinatos, efectos teratogénicos y casos de daño cerebral en recién nacidos, como también se ha afirmado que la fertilidad y la civilización romana decayó por la contaminación de plomo (Hernberg, 2000). Otros historiadores nos hablan también del uso de cosméticos con sales de plomo en las mujeres de la alta sociedad de esta civilización, con el fin de conservar el color claro de su piel como signo de su nivel social y distinguirse de las mujeres de categoría social más baja, cuya piel estaría pigmentada por los rayos solares y el ambiente al verse obligadas a laborar, expuestas a la acción de estas (Córdoba, 2006)

En el siglo 16 d.C. Paracelso retoma el tema de la toxicidad del Pb mediante un estudio que lleva por nombre **“Las enfermedades de los minerales”**. A principios del siglo 18 d.C. Ramazzini describió lo que había

observado en artesanos que se dedicaban a la cerámica con Pb, en su obra "*la enfermedad de los obreros*", donde el relacionaba la parálisis, letárgia y pérdida de dientes con la toxicidad de Pb (Hernberg, 2000). En el siglo pasado se comprobó que este metal es el responsable de las lesiones neurológicas en personas expuestas a el y que las intoxicaciones pueden ocasionarse por contacto o bien, por vía oral o por vía inhalatoria. En 1840, Burton describió la línea grisácea que se presenta en la mucosa gingival, la cual cubre la raíz de los dientes en los pacientes intoxicados y desde entonces se ha conocido como *ribete de Burton* (Deisbach, 2003).

## **II. Características del plomo**

El plomo, es un elemento metálico sin función biológica conocida en el cuerpo, ha sido extraído de las profundidades de la tierra e introducido a la biosfera. El Pb es un metal maleable, de color grisáceo que presenta una superficie brillante al corte reciente. Funde a 327°C y entra en ebullición a 1,620°C. Sus vapores son abundantes a 600°C. Tiene la propiedad de impedir el paso de los rayos x, por lo tanto es radiopaco. Se encuentra en la naturaleza como galeana (PbS), grusita (PbCO<sub>3</sub>) y anglesita (PbSO<sub>4</sub>). Los compuestos de Pb (+2) son generalmente iónicos (como PbSO<sub>4</sub>) y por otro lado, los compuestos de Pb (+4) tienen enlaces covalentes (son organometálicos, como el tetraetileno) (Córdoba, 2006).

## **III. Aplicaciones y fuentes de exposición ocupacional y no ocupacional a plomo**

El plomo tiene múltiples aplicaciones por lo cual tienen una gran variedad de fuentes de exposición ocupacional, principalmente las siguientes (Lauwerys, 1994):

- **Minería de plomo y zinc.**
- **Metalurgia de plomo y zinc.** El plomo líquido es colocado en lingotes que son laminados para la fabricación de planchas de plomo, tubos, entre otros. Se utiliza plomo procedente directamente del mineral (fundición primaria) y de la recuperación de baterías usadas (fundición secundaria).
- **Industrias de la construcción.** Cañerías de conducción.
- **Fabricación de municiones.** Perdigones.
- **Fabricación de acumuladores (baterías hechas a base de plomo).** El plomo forma el 70% del peso de una batería. La fabricación de estos acumuladores conlleva la liberación de una gran cantidad de plomo.
- **Sales y óxidos a base de plomo.** Algunas sales se emplean como pigmentos y estabilizantes en la industria de materias plásticas, así como también los óxidos de plomo que se emplean como pigmentos en las pinturas, barnices, esmaltes y materias plásticas:
  - a. La cesura o blanco de plomo
  - b. El sulfato de cromo o blanco de Mulhouse
  - c. El cromato de plomo o amarillo de cromo
  - d. El antimoniato de plomo o amarillo de Nápoles
  - e. El oxiclorigo de plomo o amarillo de Cassel
  - f. El litargirio
  - g. El minio, pintura antióxido cuya aplicación con pistola en alfarerías representa una fuente de exposición muy importante.
  - h. Los barnices y esmaltes plumbíferos se utilizan especialmente en alfarerías y fabricas de mayólicas y de tejas barnizadas.
- **Utilización de plomo y sus aleaciones.**
- **Fabricación de insecticidas.** Por ejemplo el arseniato de plomo.
- **Utilización del plomo para la fabricación de barreras antirruído y antivibración.**
- **Soldadura y corte con soplete.**

- **Fabrica de alambres y cables.** El plomo sirve para recubrir los cables y alambres de un metal resistente a la corrosión y flexible.
- **Industria automovilística.**

#### Exposición no ocupacional:

La exposición no ocupacional al plomo se da principalmente por tres fuentes: **1)** la alimenticia, a través de alimentos contaminados por el metal, tales como la harina (el trigo es contaminado por los vapores y desechos de Pb), las latas soldadas con plomo, las vajillas de barro vidriado empleadas en la cocción de alimentos y en el agua que pasa por tuberías a base de plomo; **2)** los talleres clandestinos, utilizados para la recuperación y fundición del plomo y la destilación ilícita en radiadores de automóviles que da lugar a una bebida comúnmente conocida como "*moonshine*", que contiene grandes cantidades de Pb y que ha sido causa de encefalopatías en adultos; **3)** y la menos común por medio de remedios folklóricos, tal como el "*Azarcón*" utilizado ampliamente en México, el cual es un polvo rojizo con supuestas propiedades medicinales para el tratamiento de diversos padecimientos gastrointestinales y cuyo análisis del polvo muestra que se trata de tetraóxido de plomo, en concentraciones de hasta 97% (Montoya, 2002).

#### **IV. Toxicocinética y toxicodinamia**

##### IVa. Toxicocinética: puntos de contacto y absorción de plomo, distribución y eliminación

La absorción y distribución de las sales de plomo es diferente dependiendo de la forma en la cual se presente y en cuanto se trate de diferentes compuestos a los que se pueda estar expuesto. Las principales vías de absorción y exposición a plomo inorgánico en el organismo son las siguientes:

**A. Vía respiratoria:** esta se da por la inhalación de vapores, humos, polvo fino de plomo. El paso del plomo del compartimento pulmonar hacia la sangre se da por difusión, tras la disolución de partículas (Lauwerys, 1994). La absorción depende de las características de liposolubilidad, de la aerodinámica, del tamaño de las partículas, pero a su vez del gran volumen de aire contaminado que se respira y del tiempo que la persona permanezca en el ambiente contaminado con las partículas que contienen plomo. La absorción por la exposición a nivel respiratorio, es del 50 al 100% (Calderón y Maldonado, 2008).

Existen condiciones que aumentan la absorción del plomo por los pulmones, las cuales son principalmente:

- Sales solubles en grasas
- Presencia de solventes orgánicos
- Partículas finas
- Reducción de humedad
- Aumento de la frecuencia respiratoria
- Aumento de temperatura
- Reducción de mucosidad
- Inflamación pulmonar

**B. Vía oral:** la ingestión de plomo puede ser directa por medio de los alimentos, cigarrillos u objetos contaminados con plomo o alguna de sus sales; o indirecta, después de ser inhalado y transportado a la nasofaringe por un proceso de aclaramiento pulmonar. La absorción intestinal del plomo se efectúa a la vez por un mecanismo de difusión y por un transporte activo, el transporte es bidireccional, como el del calcio (Lauwerys, 1994).

La vía oral tiene diversos factores que modifican la absorción a plomo, entre los cuales se encuentran los siguientes (Córdoba, 2006):

- La absorción de plomo es mayor cuando el estomago se encuentra vacío.
- Actualmente se discute si la presencia de fosfatos en la dieta reduce o no la absorción gastrointestinal de plomo, debido a que los fosfatos se unen con el plomo formando compuestos altamente insolubles.
- Algunos vegetales tienen la propiedad de acumular plomo, metabolizarlo y hacerlo más tóxico para el hombre o los animales que lo consuman.
- La desnutrición, el bajo consumo de calcio en la dieta, el embarazo y la administración de hormonas favorece la absorción de plomo y su posterior almacenamiento.

**C. Vía cutánea:** la absorción cutánea de plomo suele ser muy baja, aun a pesar de que representa una mayor área de contacto, debido a que se necesitan partículas con alta liposolubilidad para poder ser absorbidas, como el tetraetilo de plomo (Lauwerys, 1994).

Las siguientes condiciones son factores que aumentan la absorción de plomo por vía cutánea (Calderón y Maldonado 2008):

- Sales solubles en grasas
- Presencia de solventes orgánicos
- Elementos abrasivos en la piel
- Humedad extrema
- Adelgazamiento de la piel
- Sudoración excesiva
- Aumento de temperatura
- Heridas

Una vez absorbido el plomo, este circula en el organismo unido a los glóbulos rojos, formando con los fosfatos del plasma, fosfatos de plomo, los cuales son muy solubles y constituyen el plomo circulante y al cual se le debe su efecto tóxico. El plomo puede depositarse en riñones, hígado, piel, glándulas, sistema nervioso y en huesos largos, de donde puede ser movilizado nuevamente, siendo mayor la movilización cuando existe acidificación del pH sanguíneo y cuando hay requerimiento de calcio para procesos fisiológicos, en donde se da el proceso de autointoxicación.

El hígado tiene una gran capacidad de captación del metal: 30 minutos después de la administración de una dosis única de plomo, la concentración hepática es de 50 veces mayor que en el plasma. En el hueso se deposita cerca del 90% del plomo ingerido o absorbido (Córdoba, 2006).

La excreción de plomo se hace por la orina en un 76% y en las heces en un 16%, siendo evidentemente la vía urinaria la más importante, aunque también se puede eliminar en menor proporción por el sudor y por la leche materna (Córdoba, 2006).

#### IVb. Toxicodinámica

El plomo tiene alta afinidad por los grupos sulfhidrilo en proteínas y en ligandos con grupos fosfatos, como cisteína e histidina. Por lo tanto, el plomo es similar al cadmio y mercurio, en que inhiben la actividad de numerosas enzimas tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. El plomo imita al calcio, por lo cual puede regular la actividad de muchas proteínas que requieren de calcio, incluyendo la protein cinasa C.

Los efectos de exposición a plomo pueden tener manifestaciones clínicas tales como depresión, episodios de esquizofrenia y psicosis, irritabilidad, decremento de la libido, fatiga (Ariza et. al. 1999). Los efectos del plomo sobre diversos órganos o sistemas se observan en la tabla 1, en donde se muestran las sintomatologías dependiendo de las concentraciones de plomo en sangre,

observándose que a concentraciones menores de 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$  no hay efectos tóxicos del Pb tanto en niños como en adultos, por lo cual es la concentración que define la norma de exposición, NOM-199-SSA1-2000, establecida como la concentración máxima permitida en sangre (Calderón y Maldonado 2008).

**Tabla 1. Magnitud del efecto tóxico presentado por la exposición a plomo.**

<b>Concentración sanguínea de plomo (<math>\mu\text{g}/\text{dL}</math>)</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Niños</b>	<b>Adultos</b>
<b>Neurológico</b>		
Encefalopatía	80 – 100	100 – 120
Déficit auditivo	20	-
Déficit de IQ	10 – 15	-
Defectos in útero	10 – 15	-
Neuropatía periférica	40	40
<b>Hematológicos</b>		
Anemia	80 – 100	80 – 100
U-ALA	40	40
B-EPP	15	15
Inhibición de ALA	10	10
Inhibición de Py-5-N	10	-
<b>Renales</b>		
Nefropatía	40	-
Metabolismo de vitamina D	<30	-
Presión arterial (varones)	-	30
<b>Reproducción</b>	-	40

**Tomado de Klaassen y Watkins III, 2001**

Como se observa en la tabla 1, los efectos que se presentan por exposición a plomo son diversos y engloban a la mayoría de los sistemas y a una amplia gama de órganos. Altas concentraciones de plomo producen daños neurológicos, como encefalopatías tanto en adultos como en niños, mientras que en niños se presentan problemas de déficit auditivo y decremento de IQ desde concentraciones menores a los 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . El mecanismo por el cual el plomo presenta neurotoxicidad es debido a la interferencia que tiene con los mecanismos sinápticos de liberación del transmisor. Se sugiere que esto es debido a que el plomo puede sustituir al calcio en fenómenos dependientes del

ion en la sinapsis, lo cual causa deterioro en diversos sistemas neurotransmisores, por ejemplo en el colinérgico, noradrenérgico, GABAérgico y dopaminérgico (Klaassen y Watkins III, 2001).

Los efectos hematológicos se dan principalmente por la inhibición de las enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo. La exposición crónica a plomo induce daño en los riñones, y en los túbulos proximales, dando como resultado aminoaciduria, glucosuria e hiperfosfaturia. La exposición crónica puede causar también nefritis intersticial que puede ser acompañada por fibrosis intersticial y atrofia tubular. Los mecanismos por los cuales se presenta daño reproductivo aun no se han estudiado plenamente, pero se ha asociado la exposición a Pb con infertilidad en varones, abortos espontáneos, retraso mental en recién nacidos (Ariza et. al. 1999).

## **V. Biomarcadores de exposición a plomo**

Con base a los mecanismos de acción del plomo descritos anteriormente, se han establecido algunos biomarcadores que sirven para la determinación de la intoxicación por plomo, entre los cuales se encuentran los siguientes (Klaassen y Watkins III, 2001; García-García, 2005):

- \* Acido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) urinario y sérico
- \* Reducción de los niveles de glutatión
- \* Aumento en la concentración de MDA
- \* Aumento en la concentración de porfirinas en sangre
- \* Aumento de coproporfirinas urinario
- \* Disminución de *Pirimido-5'nucleotidasa eritrocitaria*
- \* Aumento de porfobilinogeno urinario

## **VI. Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo**

El sistema hematopoyético es uno de los órganos blanco en el envenenamiento por Pb, debido al efecto inhibitorio que tiene sobre las enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo, como se muestra en la figura 1, donde se observa el efecto inhibitorio significativo principalmente en las enzimas, ALAD y ferroquelatasa, así como el efecto bioquímico que desencadena el plomo al actuar sobre las enzimas. La enzima ALAD es la que lleva a cabo la formación de porfobilinogeno a partir de 2 moléculas de ALA. ALAD es la enzima más sensible a Pb en la síntesis del grupo hemo debido a la alta afinidad que tiene por este metal. Mas del 99% de Pb presente esta acumulado en los eritrocitos, de esto, el 80% está unido a ALAD, por lo cual una concentración de plomo en sangre de 15  $\mu\text{g/dL}$  resulta en una inhibición del 50% de la actividad de ALAD (Onalaja y Claudio, 2000).

Como se observa en la figura 1 la enzima ferroquelatasa es la responsable de introducir Fe dentro de la molécula de protoporfirina. El plomo inhibe la actividad de la ferroquelatasa y por lo tanto previene la incorporación de Fe dentro de la hemoglobina. Este efecto tiene como consecuencia la formación de enlaces entre la protoporfirina y el zinc, produciendo la zinc protoporfirina (ZPP) (Onalaja y Claudio, 2000).

La deficiencia de hierro en la hemoglobina, presenta eritrocitos microcíticos e hipocrómicos y adicional a esto se observa un aumento del número de reticulocitos con punteado basófilo, por la inhibición de la enzima piridina-5-nucleosidasa (Py-5-N). La inhibición de esta enzima (ver tabla 1) y la acumulación de nucleótidos por la exposición a plomo afectan la estabilidad de la membrana de los eritrocitos, produciendo estrés oxidante y la unión de plomo a proteínas de membrana y la supervivencia de estos últimos. La anemia que ocurre en la intoxicación por plomo sobreviene por dos defectos básicos: lapso de vida acortado de los eritrocitos y deterioro de la síntesis del hemo (Klaassen y Watkins, 2001).

## **VII. Efectos del plomo sobre la enzima $\delta$ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD)**

La enzima ALAD cataliza la segunda reacción de la síntesis del grupo **hemo, convirtiendo dos moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA)** en una molécula de porfobilinogeno. El plomo se une a los grupos SH que normalmente se unen con zinc, impidiendo la unión de la enzima ALAD. Por ejemplo, una concentración de plomo en sangre de 15  $\mu\text{g/dL}$  resulta en una inhibición del 50% de la actividad de ALAD (Onalaja y Claudio, 2000). El gen responsable de codificar esta enzima se encuentra en el cromosoma 9p34 (Duydu et. al. 2003). Este gen muestra un polimorfismo (una transversión de G a C en la posición 177 en la región codificadora del gen) produciendo dos alelos: ALAD 1 y ALAD 2; y 3 isoenzimas fenotípicas: ALAD 1-1, ALAD 1-2 y ALAD 2-2. Este polimorfismo ha mostrado un efecto en la toxicidad por plomo debido a la acumulación de ALA y su capacidad de generar estrés oxidante en el ADN (Montenegro et. al. 2006).

Esta enzima se encuentra fuertemente inhibida por el plomo, resultando **así en la acumulación del ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA)** en orina y plasma (Montenegro et. al 2005). La presencia de polimorfismos en ALAD ha sugerido que se varía la susceptibilidad y toxicidad por plomo (Duydu et. al. 2003). Ya que existen acarreadores para ALAD 1 y ALAD 2, diversos autores mencionan que los transportadores de ALAD 2 son más comunes y que las personas que presentan este alelo tienen una mayor concentración de plomo en sangre (Montenegro et. al. 2005). Por lo cual también sugieren que el alelo ALAD 2 se une más estrechamente a plomo en comparación con ALAD 1 (Montenegro et al. 2006).

Estas uniones confieren resistencia al efecto dañino del plomo, porque sujetos con ALAD 2 presentan menor viabilidad, debido a la mayor capacidad de ALAD 2 para secuestrar plomo (Montenegro et. al. 2005). Sin embargo, estudios realizados por Onalaja y Claudio (2000) sugieren un papel más complejo para el polimorfismo de ALAD en la toxicidad por plomo, indicando la posibilidad de que ALAD 2 puede tener un efecto protector, debido a la unión

más estrecha con el plomo, lo cual impide que el plomo ejerza su efecto tóxico en otros órganos y teniendo menores efectos tóxicos (Onalaja y Claudio, 2000).

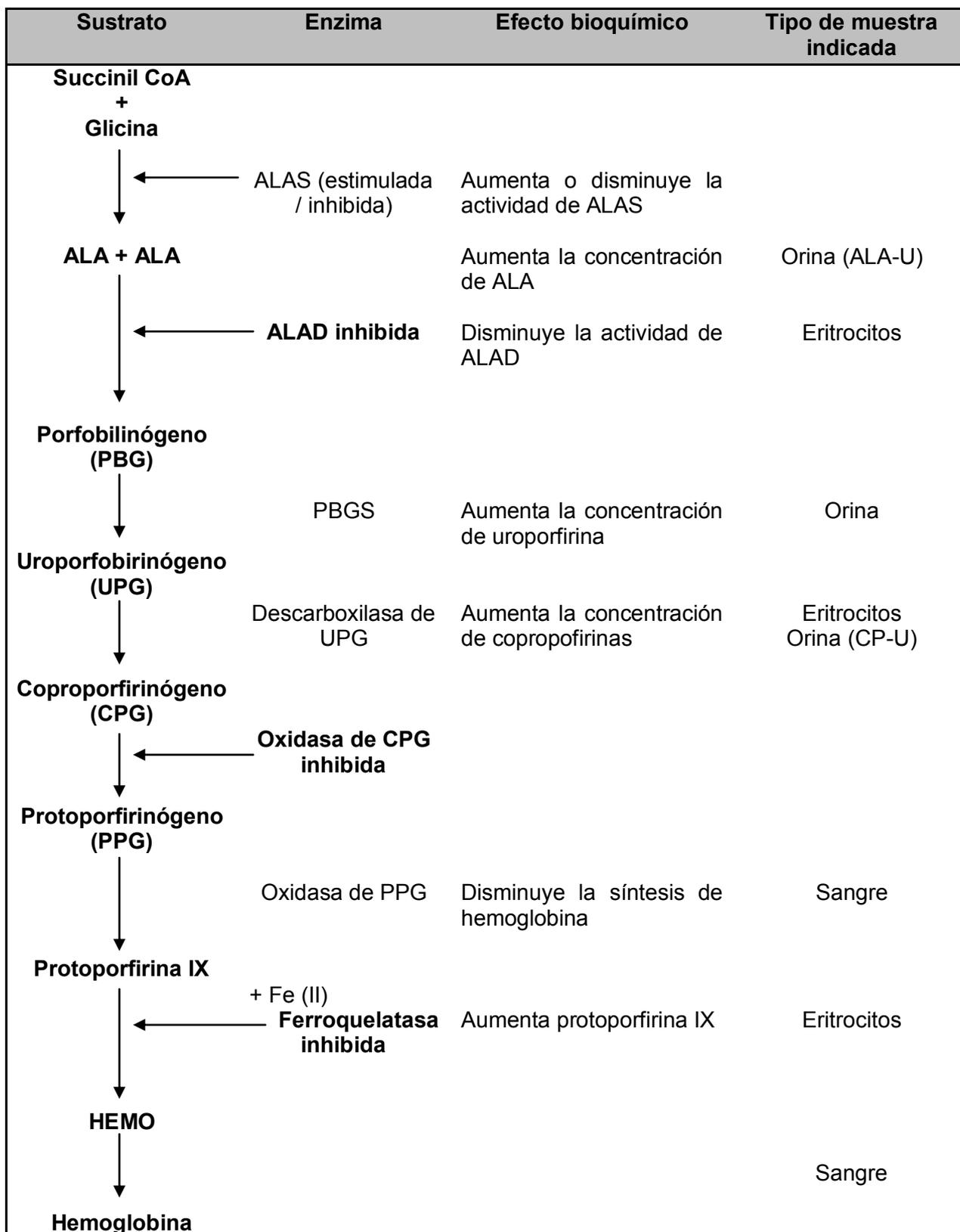


Figura 1. Efectos del plomo sobre la biosíntesis del grupo Hemo y sus expresiones bioquímicas. Se observan las enzimas que se encuentran inhibidas por la presencia de plomo (Tomada de Montoya M. A. 2002).

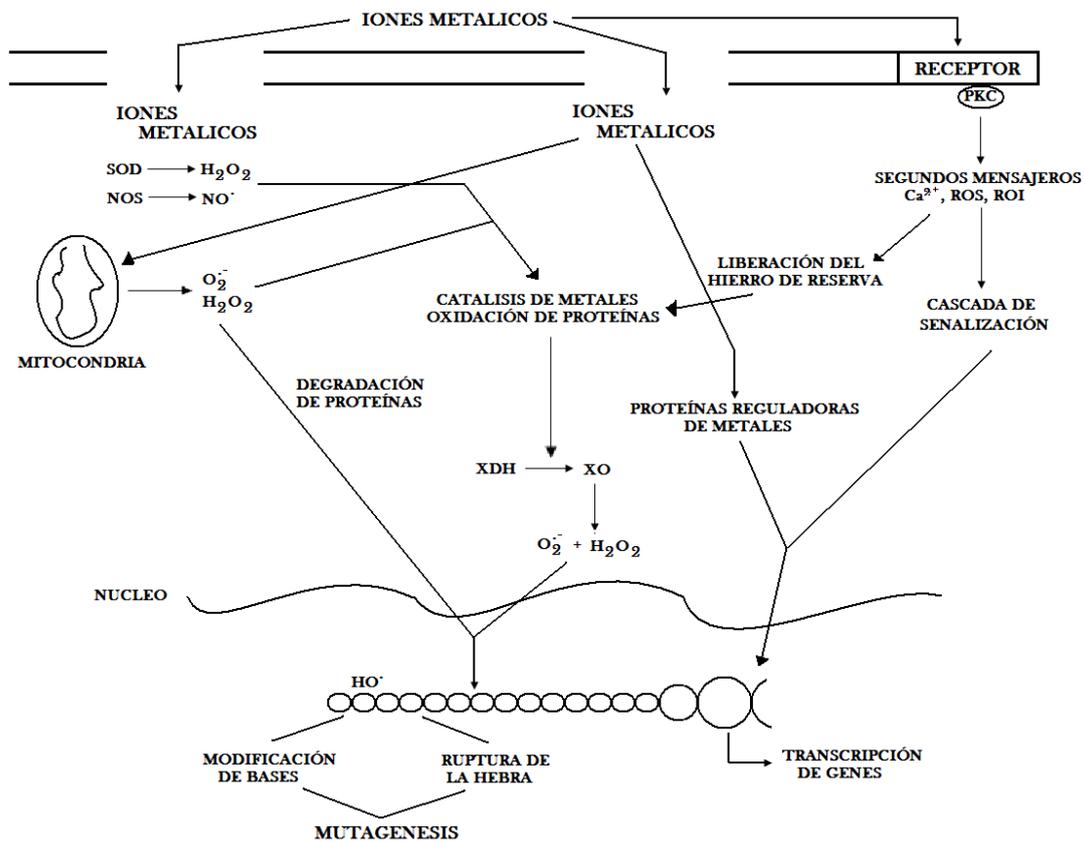
### **VIII. Inducción de estrés oxidativo ocasionado por plomo**

Los grupos sulfidrilo en proteínas son blancos potenciales para la modificación oxidativa y la oxidación de estos grupos puede resultar en alteraciones o pérdida de actividad enzimática y de unión a su receptor, así como una mayor degradación de las proteínas. Mientras pueden reducir directamente al glutatión oxidando sus grupos sulfidrilos, esta reducción no enzimática no es muy rápida o eficiente. Una gran familia de enzimas tio-disulfuro oxidoreductasas están involucradas con la reparación del daño oxidativo. Los sistemas tioredoxin y tiotranferasa, son responsables de reparar el daño a los sulfidrilos en las proteínas (Ariza et. al. 1999).

La presencia de bases oxidadas en el ADN puede alterar su estructura primaria, lo cual puede tener efecto en las interacciones de proteína-ADN o puede producir lesiones pre-mutagénicas en el ADN (Ariza et. al. 1999).

Wozniak y Blasiak (2002) reportan que la exposición ocupacional a plomo induce cambios en el estado redox celular, mostrando una correlación negativa y significativa entre las rupturas de la hélice del ADN con los niveles de GSH y muestran una correlación positiva con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha encontrado una relación directa entre la presencia de este metal en sangre de trabajadores expuestos, con el malondialdehído (MDA) y el daño al ADN. La inducción de lipoperoxidación y las especies reactivas de oxígeno pueden ser consideradas como uno de los mecanismos subyacentes de daño al ADN mediado por plomo.

Como se menciona anteriormente, la acumulación de ALA da origen a la aparición de ROS, por lo cual ALA actúa como un pro-oxidante en la intoxicación por plomo, conduciendo a un daño oxidativo para el ADN. Recientemente, este mecanismo indirecto de daño oxidativo se ha convertido en una forma de evaluar el potencial genotóxico de los compuestos de plomo debido a la rápida oxidación de ALA y a la aparición de ROS (Duydu et. al. 2001).



**Figura 2. Mecanismos por los cuales los iones metálicos y los metaloides inducen estrés oxidativo (Tomado de Ariza et. al. 1999).**

En la figura 2 se muestran los tres principales mecanismos por los cuales los metales pueden inducir estrés oxidativo. En el primer mecanismo se indica la interacción de los iones metálicos con la superóxido dismutasa (SOD) formando peróxido de hidrógeno, el cual produce oxidación de las proteínas y dando como origen la formación de especies reactivas de oxígeno. En el segundo mecanismo los iones metálicos interactúan con el metabolismo de la mitocondria formando radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno, lo cual conlleva a la oxidación y degradación de proteínas e interactuando con las proteínas reguladoras de metales. En el tercer mecanismo se observa que los iones metálicos actúan sobre los receptores de membrana, activando a los segundos mensajeros ( $Ca^{2+}$ , ROS), sin embargo, por cualquiera de los tres mecanismos, los iones metálicos inducen estrés oxidativo y por lo tanto daño al ADN provocando la aparición de mutaciones (Ariza et. al. 1999).

## **IX. Genotoxicidad y efectos del plomo sobre los mecanismos de reparación del ADN**

### **IXa. Efectos directos del plomo sobre el ADN**

El acetato de plomo inhibe la O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa humana, una enzima responsable de la reparación y eliminación de aductos promutagenicos del ADN como es la O<sup>6</sup>-alquilguanina. La O<sup>6</sup>-metilguanina se sabe que causa transición de bases durante la replicación del ADN y ha sido propuesto como una lesión crítica en carcinogénesis y mutagénesis a menos que sea reparado antes de la replicación. La inhibición *in vivo* de la reparación de los grupos O<sup>6</sup>-alquilguanina en el ADN, pueden ocasionar una amplificación de los efectos mutagénicos/carcinogénicos inducidos por agentes alquilantes; esto puede explicar el papel promotor o co-carcinogeno del plomo que ha sido reportado. Se ha reportado que el plomo es capaz de formar complejos con los grupos fosfato de nucleótidos y ácidos nucleicos, y catalizar la hidrólisis no enzimática de nucleosidos trifosfatos (Foulker, 1990).

Antes de una evaluación precisa de los riesgos asociados con la exposición a un compuesto potencialmente cancerígeno, es necesario entender en la medida posible el mecanismo de acción de ese compuesto, y los factores que son importantes en la potenciación o la atenuación de dicha acción. Es de importancia fundamental en este sentido la clasificación de un agente particular como; 1) una genotoxina que se espera pueda interactuar y alterar directamente el ácido nucleico, de tal manera que predisponen a la **transformación neoplásica** o 2) a un "promotor" o agente "epigenético" que también puede predisponer a la transformación, pero por la interferencia con otras vías bioquímicas celulares en vez que interactúen de manera genéticamente directa (Foulker, 1990).

## *IXb. Efectos del plomo sobre los mecanismos de reparación del ADN*

La reparación del ADN consiste en una serie de reacciones enzimáticas coordinadas que son requeridas para reconocer y remover el daño al ADN. La unión de los metales o iones metálicos al ADN o a proteínas implicadas con los procesos de reparación de ADN, pueden causar cambios en la estructura. La sustitución de un ion metálico que es esencial para la actividad enzimática con un metal no esencial puede alterar o inhibir la eficacia de los procesos de reparación del ADN induciendo cambios conformacionales en el ADN o las proteínas, lo que impide el reconocimiento y/o eliminación de la lesión de ADN, por los errores en la fidelidad de la polimerización y/o inhibición de esta (Foulker, 1990).

En recientes estudios, utilizando extractos de células libres, han demostrado que  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  inhiben la reparación por escisión de nucleótidos (NER) en varios pasos de la ruta. Este resultado apoya el concepto de que iones metálicos y metales inhiben los procesos de reparación. NER es importante en la eliminación de distorsiones voluminosas en la hélice del ADN (Ariza et. al. 1999).

Datos biológicos disponibles junto con lo que se conoce en relación a la bioquímica de los metales sugiere que hay tres posibilidades por las cuales se presenta la inhibición sobre los mecanismos de reparación del ADN:

1. Los metales pueden inactivar directamente las enzimas de reparación del ADN.
2. Los metales pueden unirse con otros componentes celulares requeridos para la reparación, por ejemplo el glutatión.
3. Se produce daño al ADN por metales que podrían interferir directamente con los procesos de reparación o competir por las enzimas necesarias para reparar otras lesiones inducidas.

## **ESTUDIOS PREVIOS DEL EFECTO GENOTOXICO DEL PLOMO**

Estudios anteriores han mostrado la capacidad que tiene el plomo de provocar daño al ADN y a los mecanismos de reparación del ADN, tal es el caso de autores como Danadevi y colaboradores (2003) cuya investigación se llevó a cabo para evaluar el efecto genotóxico de la exposición a Pb en trabajadores. Realizaron el estudio con 45 individuos, los cuales trabajan en una fábrica dedicada principalmente a la extracción de Pb a partir de baterías, que fueron monitorizados para detectar lesiones en el ADN en leucocitos de sangre periférica, al mismo tiempo, 36 personas fueron utilizadas como grupo control en este estudio, las cuales realizaban labores administrativas, en una dependencia de la región. A todos los sujetos se les determino el contenido de Pb en sangre por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inducido (ICP-MS, por sus siglas en ingles). La media de Pb contenido en sangre fue significativamente mayor en el grupo de expuesto (248,3  $\mu\text{g}$  / dL) en comparación con los controles (27,49  $\mu\text{g}$  / dL). El daño al ADN se determinó mediante electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) reportando el porcentaje de células con cometa.

Los resultados mostraron que hubo una correlación significativa entre daño del ADN y niveles de Pb en sangre, lo cual sugiere que el daño aumenta conforme a la concentración de Pb en sangre. El aumento de los niveles de daño del ADN observados en el grupo de estudio en comparación con los controles, justifica el uso del ensayo cometa en la evaluación de los efectos genotóxicos en los seres humanos expuestos a plomo del presente trabajo.

Trabajos como los de García-García (2005), nos muestran el daño producido al ADN y la capacidad de reparación del ADN en personas ocupacionalmente expuestas a plomo. El estudio se realizo con 20 personas controles que laboran en una oficina y 16 personas ocupacionalmente expuestas a plomo, quienes laboran en una fabrica dedicada a la producción y reciclamiento de acumuladores en la ciudad de León, Guanajuato, México. A los individuos que conformaron el estudio se les tomaron muestras sanguíneas,

se determino la viabilidad celular, evaluando la actividad metabólica de los lisosomas, por el método dual de fluorocromos. Para determinar el daño al ADN y a los mecanismos de reparación del ADN se realizo el ensayo cometa, cuya técnica se realizo conforme a la versión propuesta por Sing *et. al.* (1988) y modificada por Rojas *et. al.* (1999), evaluando 50 células por laminilla (2 laminillas por condición experimental), obteniendo los valores de longitud de la cola del cometa para poder determinar el daño al ADN y a los mecanismos de reparación.

Una vez realizada la estrategia experimental y analizados los datos, se comprobó que la capacidad de reparación del ADN en personas ocupacionalmente expuestas a plomo se encuentra inhibida alrededor de un 70%, mientras que solo un 5% en las personas control, lo cual indica que al estar crónicamente en contacto con el Pb, generamos daño en el ADN que al acumularse refleja la inhibición de los mecanismos de reparación lo cual podría traducirse a la generación de mutaciones. El daño producido al ADN no se observa muy claramente, lo cual se atribuyó a la capacidad del metal por generar entrecruzamientos ADN-proteína, lo cual se evidencio en el ensayo de electroforesis unicelular como una reducción de la migración de las colas de los cometas.

La conclusión del trabajo realizado por García-García (2005), indica que la exposición laboral a Pb, rebasando los límites permisibles, desencadena una serie de mecanismos indirectos de genotoxicidad como lo son las alteraciones en el balance de antioxidantes y alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN , reflejando que la cronicidad en la exposición a plomo puede abatir los mecanismos que mantienen la integridad del material genético, pudiendo a largo plazo desencadenar un proceso de transformación celular.

## ***JUSTIFICACION***

Dados los antecedentes de poblaciones ocupacionalmente expuestas a plomo en las cuales se determinó daño genotóxico evidenciado como fragmentación del ADN al igual que alteraciones en la capacidad de reparación del ADN tras el reto con tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radiación  $\gamma$  (Danadevi et. al, 2003; García-García 2005), es de sumo interés, el evidenciar los efectos de inhibición que tiene el plomo sobre la capacidad de reparación del ADN, correlacionándolo con los biomarcadores de toxicidad en personas expuestas ocupacionalmente al metal, los cuales son principalmente la enzima **ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALAD)** y la presencia de malondialdehído (MDA), de personas que laboran en talleres de alfarería del INEGI de la ciudad de Dolores Hidalgo, Guanajuato.

## ***HIPOTESIS***

Si en las personas expuestas a plomo, la concentración en sangre es mayor a 10  $\mu\text{g/dL}$  (la norma permitida para personas no ocupacionalmente expuestas), entonces se observaran deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN al no poder remover el daño producido ante un reto genotóxico.

## **OBJETIVO GENERAL**

- ❖ Determinación del daño oxidativo producido al ADN y a sus mecanismos de reparación en individuos expuestos laboralmente a plomo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinación del daño oxidativo en el ADN de individuos expuestos laboralmente a plomo mediante la electroforesis unicelular.
- Determinación de las alteraciones en la capacidad reparativa de los individuos expuestos laboralmente a plomo mediante electroforesis unicelular.
- Analizar el comportamiento de los biomarcadores de exposición a plomo en individuos expuestos laboralmente a plomo (Niveles de Pb en sangre, actividad de ALAD y los niveles de malondialdehído (MDA)).
- Correlación del daño en el ADN y su capacidad de reparación con los diferentes biomarcadores de exposición a Pb.

# METODOLOGIA

## 1. Zona de muestreo

El estudio fue realizado en muestras de 34 personas controles y 29 personas ocupacionalmente expuestas a plomo, quienes laboran en la producción de vasijas de barro vidriadas, en la ciudad de Dolores Hidalgo, Guanajuato (Figura 3). A todos los individuos se les tomo muestras sanguíneas para llevar a cabo el presente estudio tras la aceptación de participar en el estudio, mediante una carta de consentimiento informado.



Figura 3. Mapa del estado de Guanajuato, mostrando las ciudades que lo conforman, se muestra en color más oscuro la ciudad de Dolores Hidalgo, que fue donde se llevo a cabo el muestreo (Imagen tomada de <http://www.ruelsa.com/gto/edo1.html>)

## **2. Obtención de muestras sanguíneas**

Mediante el procedimiento de punción venosa se colectaron aproximadamente 5 mL de sangre en tubos Vacutainer<sup>MR</sup> con heparina, los cuales fueron debidamente etiquetados. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

## **3. Electroforesis unicelular alcalina**

Esta técnica se realizó conforme a la versión propuesta por Singh *et. al.* (1988) y modificaciones descritas por Rojas *et. al.* (1999).

### **3.1. Preparación de las laminillas**

En un portaobjetos lavado, se adicionan 150  $\mu$ L de agarosa regular al 0.5%, estas laminillas son colocadas en un horno hasta que dicha agarosa forme una capa uniforme solidificada.

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

### **3.2. Electroforesis alcalina a pH > 13**

Transcurrido el periodo de lisis, las laminillas fueron colocadas en una cámara de electroforesis horizontal sobre hielo inmersas en un amortiguador alcalino compuesto de NaOH y EDTA a pH > 13 (solución de amortiguadora de electroforesis, ver apendice). Estas laminillas estuvieron inmersas durante 20 minutos, con la finalidad de permitir que las hebras de ADN se pudieran desenrollar. Transcurrido este tiempo se realizó la electroforesis durante 20 minutos a 0.8 V/cm (todo este procedimiento de electroforesis se realiza bajo condiciones de luz amarilla, para impedir que los fotones produzcan daño al ADN).

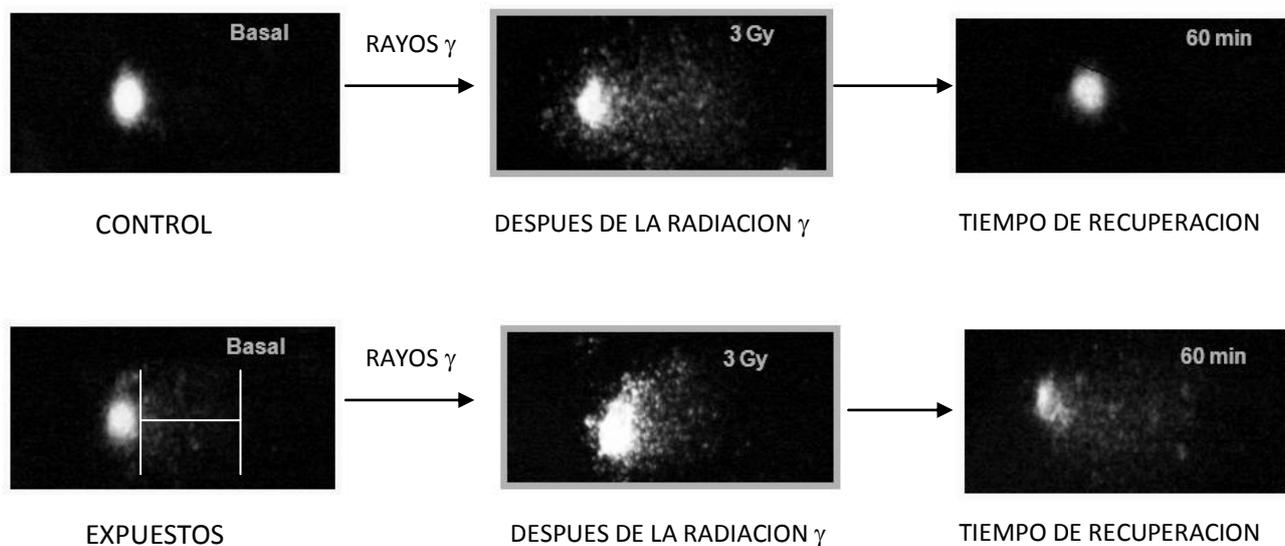
Después de la electroforesis, las laminillas fueron lavadas con Tris al 0.4 M pH 7.5 (solución amortiguadora de neutralización) para neutralizar nuestras laminillas y posteriormente fueron fijadas con etanol absoluto. Una vez secas, se guardan y protegen del polvo.

Para observar las laminillas al microscopio se les adicionó 20 µL de una solución de 2.0 µg/mL de bromuro de etidio (Br-Et); fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 con un filtro de excitación de 515 a 560 nm y un filtro barrera de 590 nm, usando un objetivo de 20x y adaptada a un digitalizador de imágenes Kinetic Image, donde se evaluaron 50 células por laminilla, con dos laminillas por condición experimental, utilizando el programa Komet 3.0 (Kinetic Imaging) de donde se obtuvieron los **datos de "Tail ADN" (% de ADN dañado), "Olive Tail Moment" (una correlación entre el ADN dañado y la migración de ADN fragmentado) y "Tail Length" (migración del ADN fragmentado)**

### **3.3. Ensayo reto (modificación del ensayo cometa)**

A partir de una alícuota de 10 µL se prepararon 2 laminillas para determinar el daño basal. Del resto de la muestra, se utilizaron 100 µL a las cuales se les agregó 900 µL de medio RPMI-1640. Fueron expuestas a radiación  $\gamma$  (3Gy) para después de un lavado con RPMI-1640. Finalizando el

tratamiento las muestras son centrifugadas brevemente y del botón celular se toman 10  $\mu\text{L}$  que se mezclan con 150  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo peso molecular al 0.5% para preparar las 2 laminillas, mientras tanto se les dio 60 minutos de incubación a temperatura ambiente después de la radiación  $\gamma$  (tiempo de reparación del ADN). Mediante el ensayo cometa se determino el daño al ADN de las muestras inmediatamente después de la radiación (3Gy) en donde se evalúa el daño inducido por la radiación y la de los 60 minutos de incubación, donde se evalúa el daño remanente después de la radiación.



Las determinaciones se llevan a cabo con la medición de las colas de los cometas, cuyos valores se dan en micras ( $\mu\text{m}$ ), las cuales nos indican los fragmentos de ADN generados para así poder evaluar el daño que se produce en el ADN y sobre sus mecanismos de reparación.

#### **4. Determinación de plomo en sangre y de los biomarcadores de exposición**

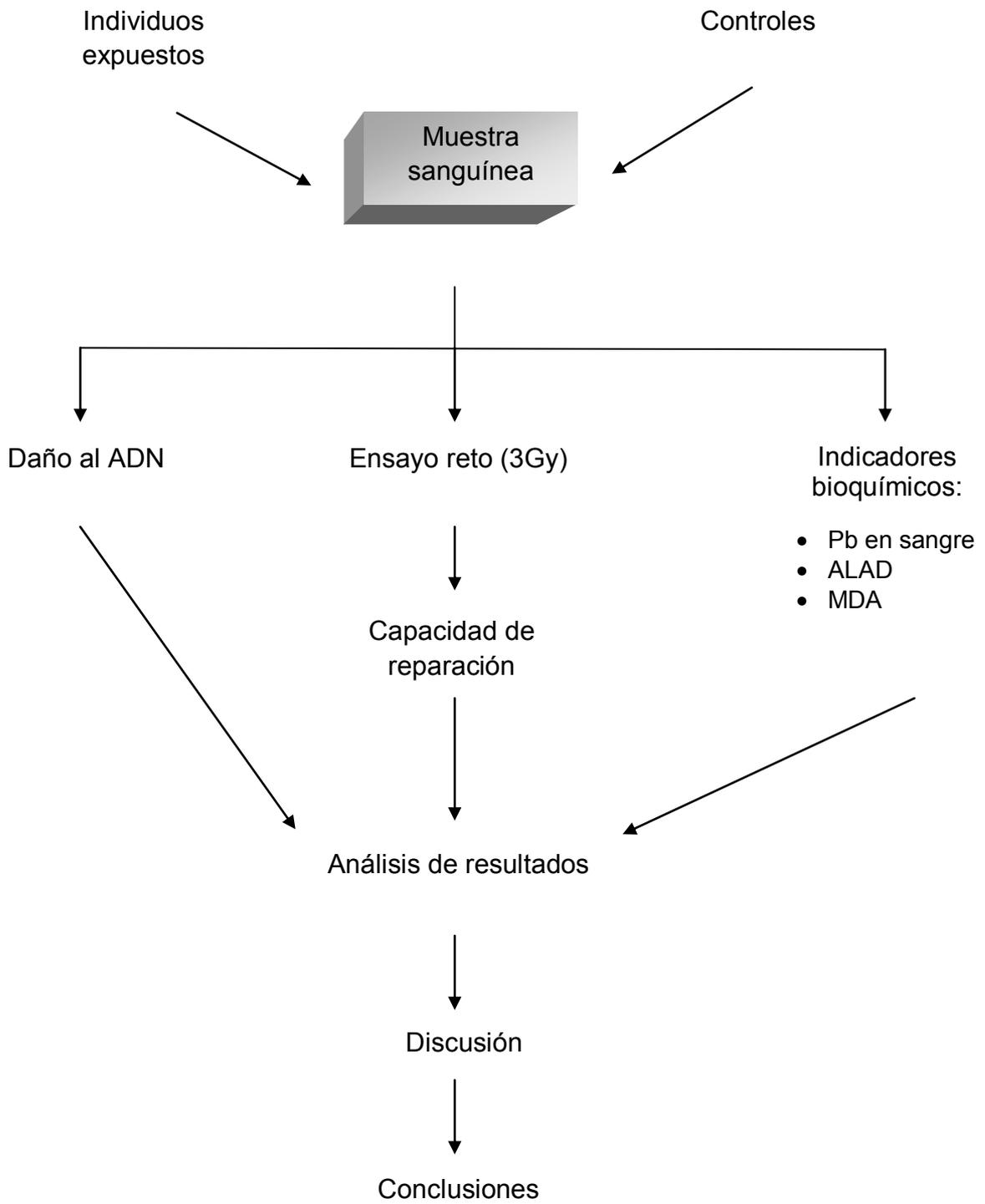
La determinación de plomo en sangre y de los biomarcadores de exposición a plomo se realizó por diferentes técnicas. La determinación de plomo en sangre se llevo a cabo por el método de espectrofotometría de



## **5. Análisis estadístico**

Para determinar si los valores de daño en el ADN y los biomarcadores de exposición son diferentes estadísticamente entre los individuos control y expuestos a Pb se aplicó una prueba t de Student con un intervalo de confianza del 95%. Para determinar la correlación entre las variables determinadas se realizaron correlaciones múltiples y simples de Pearson. Los análisis se realizaron empleando el programa estadístico SIGMA-STAT versión 3.5.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



# RESULTADOS

## I. Genotoxicidad

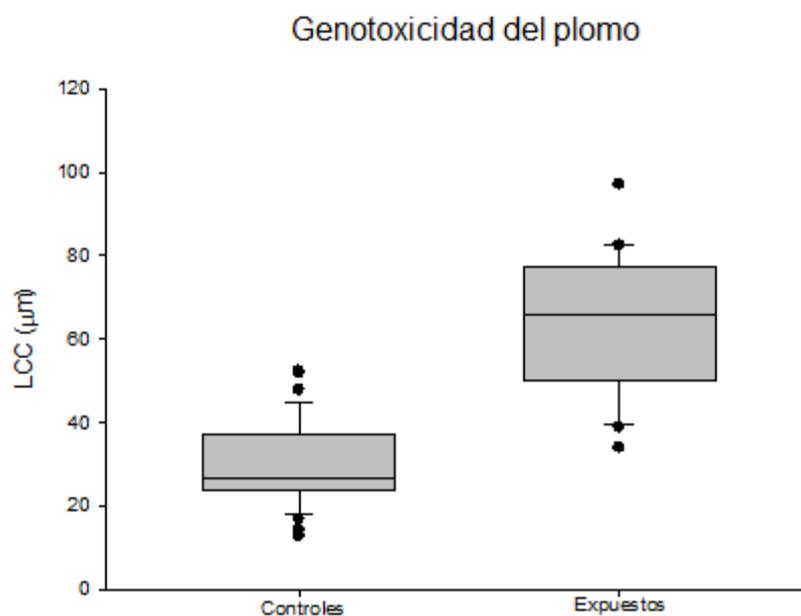
El daño al ADN producido por la exposición de plomo, se determino mediante la electroforesis unicelular alcalina y los valores obtenidos por cada una de las personas se muestran en la tabla 2. Los resultados mostrados son los correspondientes a los obtenidos como migración del ADN fragmentado (Tail Length, medido en  $\mu\text{m}$ ), que corresponde a la longitud de la cola de los cometas.

**Tabla 2. Daño genotóxico en las células de sangre periférica de personas control y personas expuestas a plomo (de las muestras basales).**

Personas control	Tail Length ( $\mu\text{m}$ )	Personas expuestas a Pb	Tail Length ( $\mu\text{m}$ )
C1	12.78	1	68.04
C2	19.46	3	77.29
C3	40.66	4	63.18
C4	41.62	5	81.97
C5	26.02	6	82.42
C6	25.44	9	82.44
C7	26.02	10	77.37
C8	26.45	11	97.13
C9	36.53	12	39.74
C10	31.97	13	77.69
C11	18.04	14	81.47
C12	26.04	15	61.06
C13	41.32	16	70.54
C14	33.80	17	59.42
C15	30.31	18	38.83
C16	41.00	20	50.08
C17	39.68	23	76.95
C18	16.84	25	79.46
C19	51.89	26	64.74
C20	18.94	27	49.72
C21	24.52	28	51.21
C22	52.32	30	50.80
C23	28.14	31	44.94
C24	14.22	32	65.62
C25	26.92	33	50.16
C26	24.99	34	70.08
C27	47.78	35	34.00
C28	23.68	36	40.68
C29	33.56	37	67.44
C30	20.55		
C31	24.38		
C32	31.63		
C33	24.86		
C34	23.25		
<b>Promedio</b>	<b>29.63265</b>	<b>Promedio</b>	<b>63.94724**</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>10.15751</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>16.31397</b>

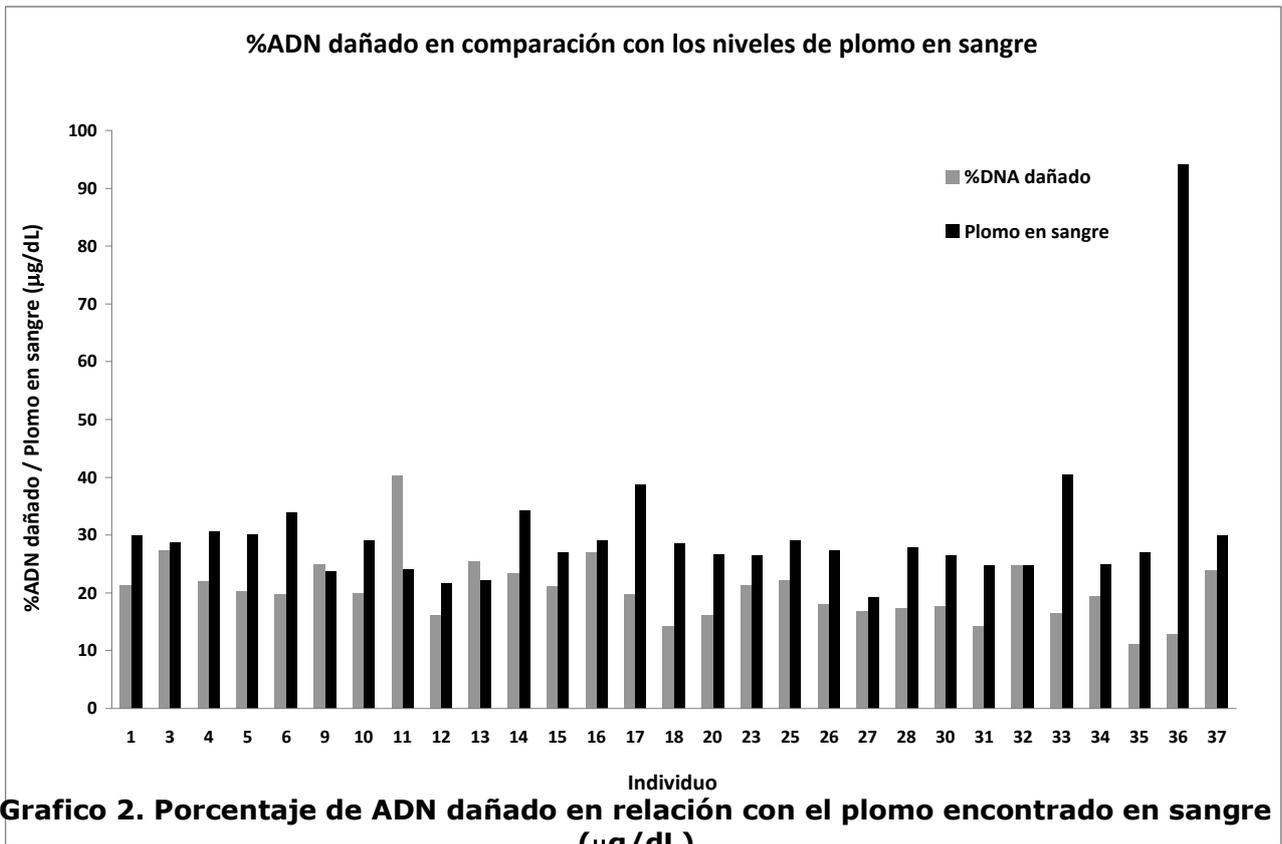
\*\* t Student  $p < 0.001$  controles vs expuestos

El daño al ADN de los grupos estudiados de manera poblacional, se muestran en la gráfica 1, donde las cajas representan la distribución del 95% de los datos y las líneas dentro de las cajas representan el valor promedio de la población. De esta comparación se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, lo cual señala que la población de alfareros presenta daño genotóxico evidenciado como incremento en la frecuencia de rompimientos de cadena sencilla del ADN.

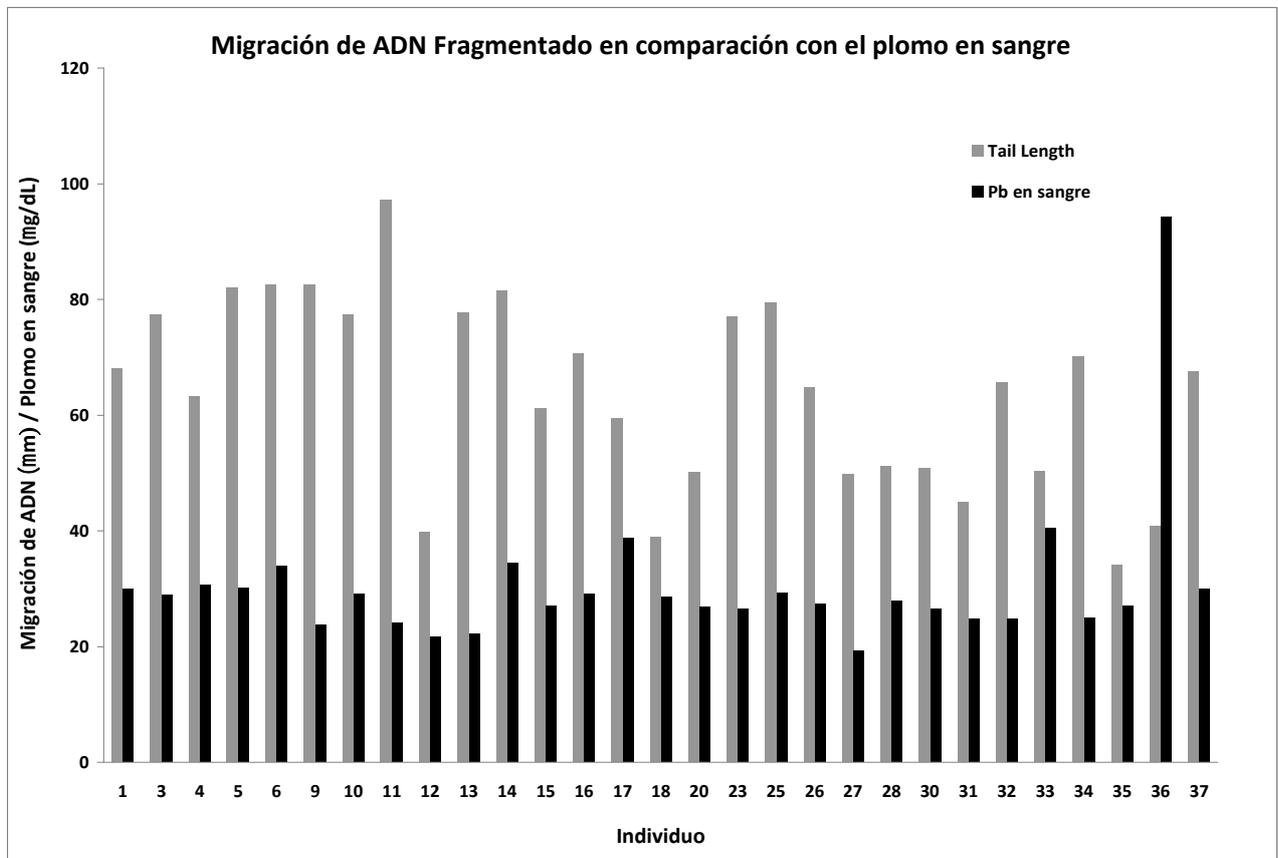


**Gráfico 1. Distribución de la genotoxicidad individual determinada mediante el “Ensayo Cometa” en células de sangre periférica de personas control y expuestas a plomo (LCC: longitud de la cola del cometa). t Student  $p < 0.001$  controles vs expuestos.**

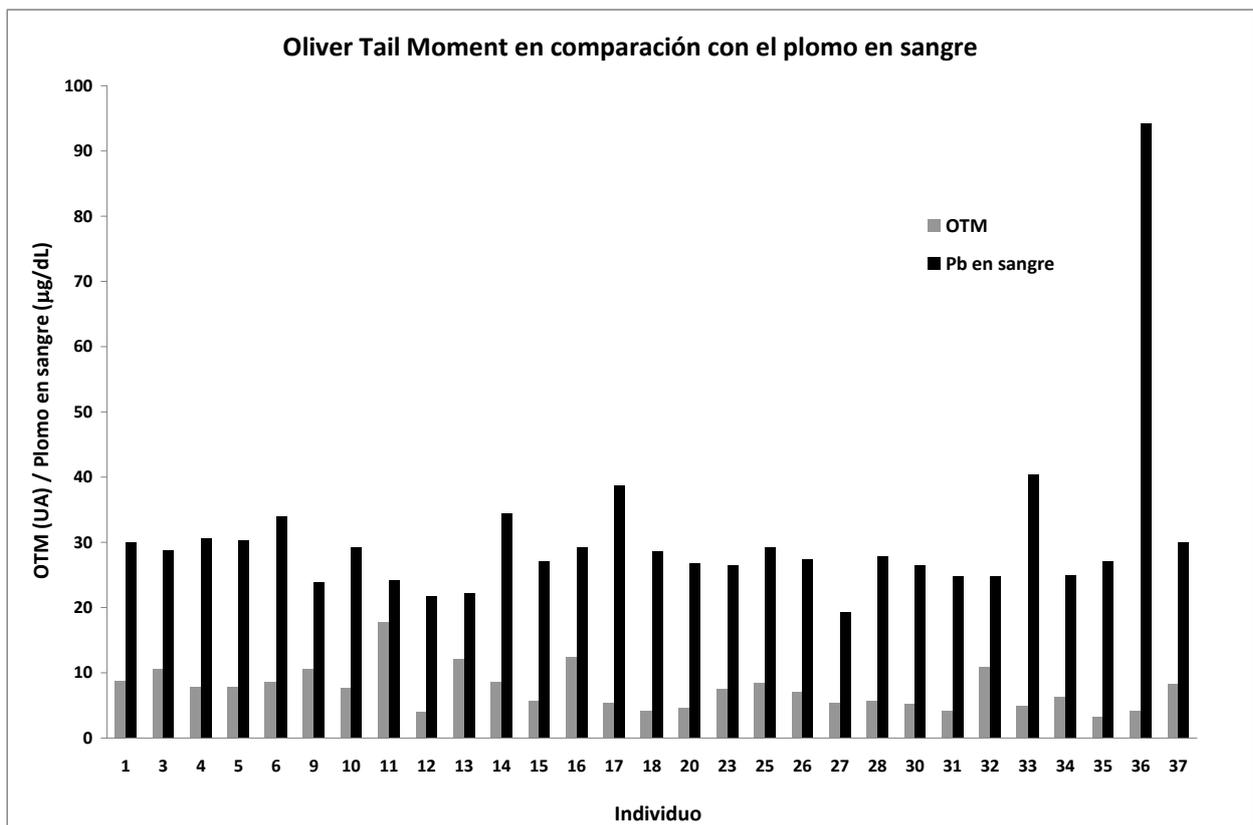
En los gráficos 2, 3, y 4 se muestra la relación del daño producido al ADN evaluado de tres maneras distintas (% ADN dañado, migración de ADN fragmentado y momento de la cola del cometa) y los niveles de plomo encontrado en sangre en las personas expuestas.



**Grafico 2. Porcentaje de ADN dañado en relación con el plomo encontrado en sangre (µg/dL)**



**Grafico 3. Migración del ADN fragmentado (µm) en comparación con los niveles de plomo en sangre (µg/dL).**



**Grafico 4. Olive Tail Moment y su relación con el plomo presente en sangre (µg/dL).**

En el grafico 2 se observa que hay individuos que muestran un bajo porcentaje de ADN fragmentado (menor al 20%) y presentan niveles de Pb en sangre mayores a 10 µg/dL, tal es el caso de los individuos 12, 17, 18, 20, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 35 y 36. Sin embargo también se identifican individuos con un porcentaje de ADN fragmentado mayor al 20% y niveles de Pb en sangre de mayor magnitud, como el individuo 11.

En el grafico 3 se observa que en todos los individuos expuestos la migración de los fragmentos del ADN (Tail length) es mayor a la media de los individuos control y los niveles de Pb en sangre son poco mas del doble de la norma permitida. En el grafico 4 se observa que solo el individuo 11 muestra un momento de la cola superior a 10. Como se puede observar el individuo 11 correspondiente al grupo expuesto, claramente es el que mostró mas alteraciones en el ADN, lo cual además se reflejó en la falta de respuesta ante el reto genotóxico con la radiación  $\gamma$ , lo cual hizo imposible su análisis de cinética reparativa.

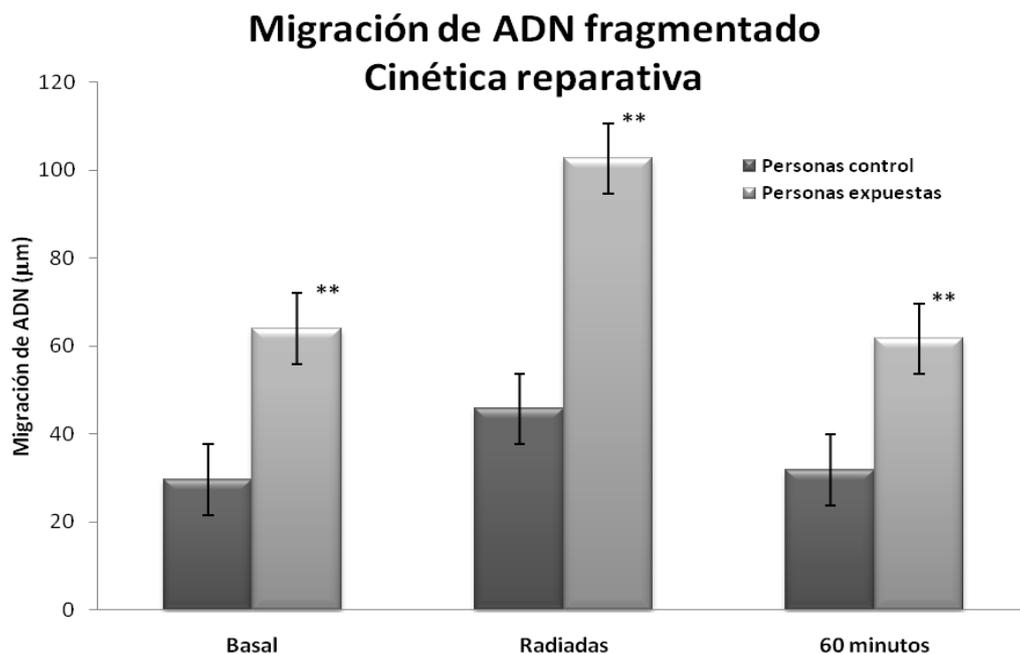
## II. Daño al ADN y a los mecanismos de reparación

Los resultados obtenidos por el "Ensayo cometa" se emplearon para evidenciar alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN, producidas por la exposición prolongada a plomo. El análisis para los individuos control y los expuestos se realizó de forma poblacional a través de los promedios obtenidos de cada grupo de los puntos monitorizados de la cinética reparativa, los cuales se muestran en la tabla 3, daño basal, daño inducido por la radiación y daño remanente a los 60 minutos. Los datos de genotoxicidad indican que ambos grupos repararon el daño inducido en el ADN por la exposición a radiación  $\gamma$ , dado que a los 60 minutos de recuperación los valores de daño en ADN son iguales estadísticamente a los del daño basal.

**Tabla 3. Cinética reparativa, con los promedios de la migración ( $\mu\text{m}$ ) de los fragmentos de ADN de la población control y la expuesta laboralmente a plomo.**

	Personas control	Personas expuestas a Pb
Genotoxicidad Basal	29.63265	63.94724
Genotoxicidad Radiadas	45.71500**	102.6500**
Genotoxicidad a 60 minutos	31.85118	61.69862

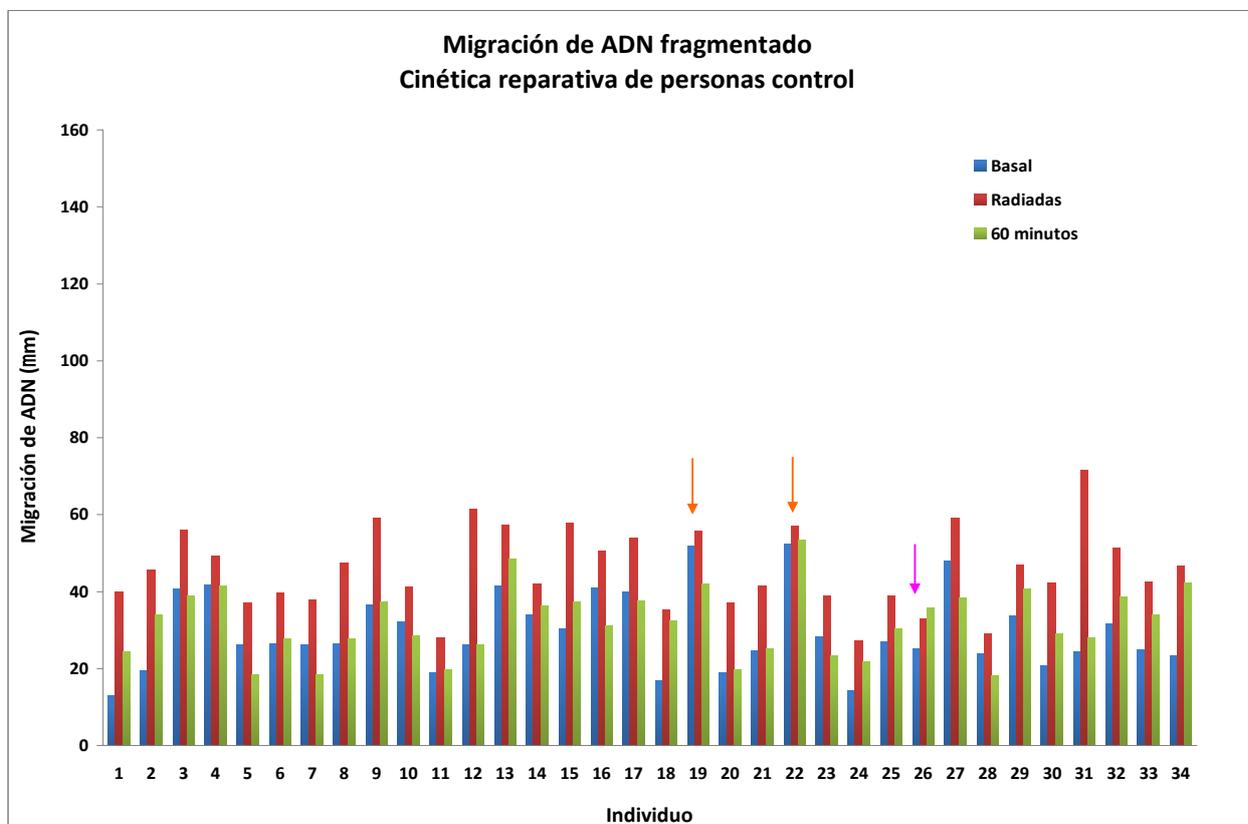
"t" Student, vs basal para cada grupo, \*\* $p < 0.001$ . Los valores están dados en micras de migración en el campo eléctrico.



**Grafico 5. Comparación de la cinética reparativa de personas control y personas expuestas a Pb. t Student entre grupos, \*\*  $p < 0.001$**

En la graficas 5, se muestra la cinética reparativa que tienen las personas control y las personas expuestas a Pb, empleado como parámetro de análisis la migración del ADN fragmentado; donde es posible apreciar que ambos grupos reparan el daño inducido por la radiación  $\gamma$ , aunque cabe señalar que el daño siempre tiene mayores magnitudes en los individuos expuestos.

En las graficas 6 y 7 se observa la cinética reparativa por cada uno de los individuos control y expuestos a plomo. Este análisis permite detectar a los individuos que presentan alteraciones claras sobre sus mecanismos de reparación, mostrando que en los controles todos los individuos menos uno (individuo 26) repararon el daño inducido por el reto genotóxico. Cabe mencionar que para este análisis se excluyeron dos donadores (individuos 19 y 22) dado que no fue posible inducirles daño por la exposición a la radiación. Mientras que en el grupo expuesto solo 3 individuos (9, 15 y 30) fueron incapaces de reparar lo cual representa el 12.5% de la población.



**Grafico 6. Cinética reparativa de personas control. Las flechas de color anaranjado señalan a los individuos incapaces de responder al daño genotóxico inducido por rayos  $\gamma$  (daño menor a  $5 \mu\text{m}$ ) y la flecha rosa señala a los individuos que no repararon el daño producido.**

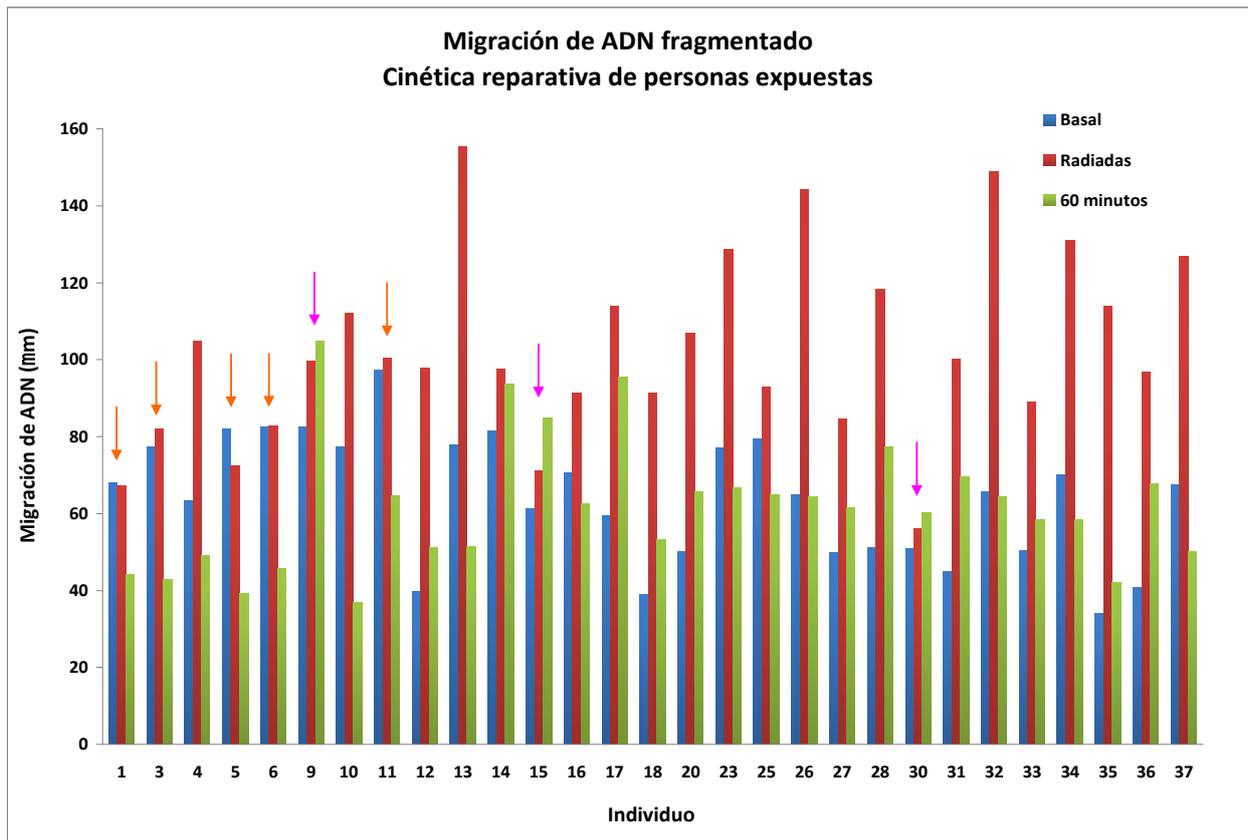


Grafico 7. Cinética reparativa de personas expuestas a plomo. Las flechas de color anaranjado señalan a los individuos incapaces de responder al daño genotóxico inducido por rayos  $\gamma$  (daño menor a  $5 \mu\text{m}$ ) y la flecha rosa señala a los individuos que no repararon el daño producido.

### III. Capacidad de reparación del ADN

La inhibición de la capacidad de reparación del ADN se determino como un mecanismo indirecto de la genotoxicidad a través de una modificación al ensayo cometa, el cual se denomina "Ensayo del Reto" y que consiste en retar a las células sanguíneas a un nuevo agente genotóxico, que en este caso fue radiación  $\gamma$  (3Gy) y posterior a un tiempo de recuperación (60 minutos), en el cual se lleva a cabo la reparación del daño, se evalúa la persistencia del daño, al cual denominamos daño remanente del ADN.

Para determinar la capacidad de reparación del ADN (en porcentajes) de las muestras, se emplearon los valores de la migración de los fragmentos de ADN (Tail Length ( $\mu\text{m}$ )) obtenidos en cada uno de los puntos de la cinética por individuo. Así mismo, cabe mencionar que para este análisis solo se

consideraron los individuos que respondieron al reto genotóxico de la radiación  $\gamma$ .

Los valores individuales del porcentaje de reparación de cada individuo que conforma el estudio después de los 60 minutos de reparación se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. Porcentaje de reparación del ADN de cada individuo que participo en el estudio después de 60 minutos de recuperación y su relación con los niveles de Pb en sangre.**

Personas controles	% Reparación 60 minutos	PbS ( $\mu\text{g/dL}$ )	Personas Expuestas a Plomo	% Reparación 60 minutos	PbS ( $\mu\text{g/dL}$ )
C1	57.98	3.8	4	133.94	30.60
C2	44.34	1.6	9	-30.58	23.78
C3	112.80	0.95	10	216.73	29.11
C4	103.30	2.6	12	80.72	21.61
C5	171.28	5.1	13	133.81	22.14
C6	90.89	4.3	14	24.20	34.31
C7	166.18	3.7	15	-136.62	27.04
C8	94.78	2.5	16	137.86	29.10
C9	96.27	6.1	17	33.68	38.70
C10	139.26	5.4	18	72.47	28.55
C11	92.89	5.1	20	72.50	26.71
C12	99.52	2.7	23	119.74	26.52
C13	56.37	0.25	25	209.23	29.17
C14	71.02	0.6	26	100.63	27.30
C15	74.47	2.3	27	66.94	19.19
C16	206.17	2.9	28	61.15	27.80
C17	115.90	0.9	30	-77.26	26.48
C18	14.87	2.9	31	55.52	24.76
C20	96.49	7.2	32	101.71	24.73
C21	96.37	1.37	33	78.89	40.34
C23	146.75	4.1	34	119.42	24.90
C24	41.89	1.4	35	90.06	26.99
C25	71.60	6.1	36	52.08	94.16
C26	-36.27	1.5	37	129.34	29.94
C27	184.92	1.7			
C28	205.06	4.1			
C29	47.12	3.1			
C30	61.79	1.5			
C31	92.63	1.99			
C32	64.55	5.9			
C33	48.29	1.05			
C34	19.01	1.75			
<b>Promedio</b>	<b>92.14</b>	<b>2.89</b>	<b>Promedio</b>	<b>76.92</b>	<b>30.58</b>
<b>Error están.</b>	<b>12.195</b>	<b>0.412</b>	<b>Error están.</b>	<b>20.052</b>	<b>3.666</b>

Se observa claramente que los individuos control son capaces de reparar el daño inducido por el reto genotóxico en un 92.14%, mientras que los

individuos expuestos a Pb solo alcanzaron a reparar el daño inducido en un 76.92%.

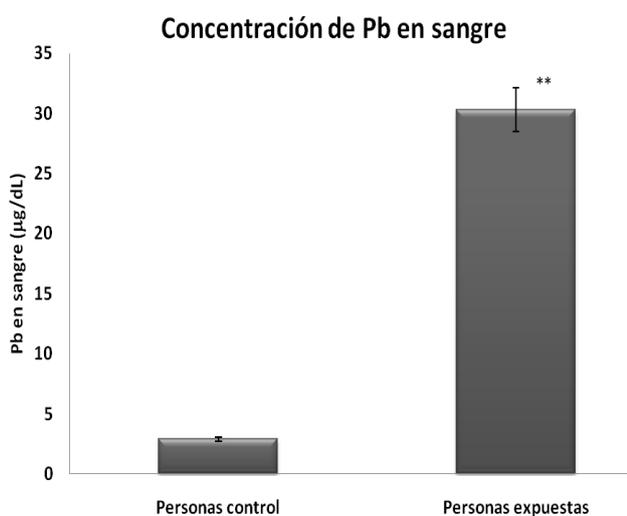
#### IV. Determinación de Pb en sangre, ALAD y MDA

En la tabla 5 y las gráficas 8, 9 y 10 se observan la concentración de plomo en sangre de las personas controles y expuestas, así como la determinación de los biomarcadores de exposición a plomo. Este análisis muestra que los individuos expuestos exceden tres veces la norma permisible de exposición y sus valores son mayores estadísticamente a los presentados por los individuos control. Así mismo se aprecia la inhibición estadísticamente significativa de la ALAD en la población expuesta; sin embargo no hay diferencias en los niveles de lipoperoxidación expresado como niveles de MDA entre ambas poblaciones.

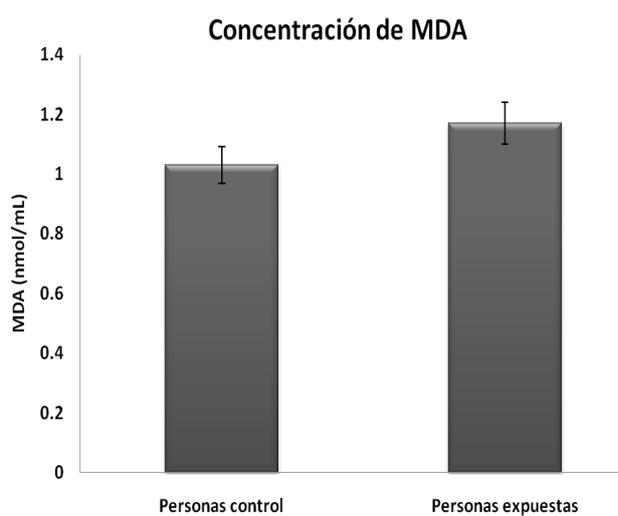
**Tabla 5. Biomarcadores de exposición a plomo**

Biomarcador	Población control	Población expuesta
Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	2.89	30.370**
ALAD ( $\mu\text{mol/hr/mL}$ )	722.32	362.92**
MDA ( $\text{nmol/mL}$ )	1.03	1.17

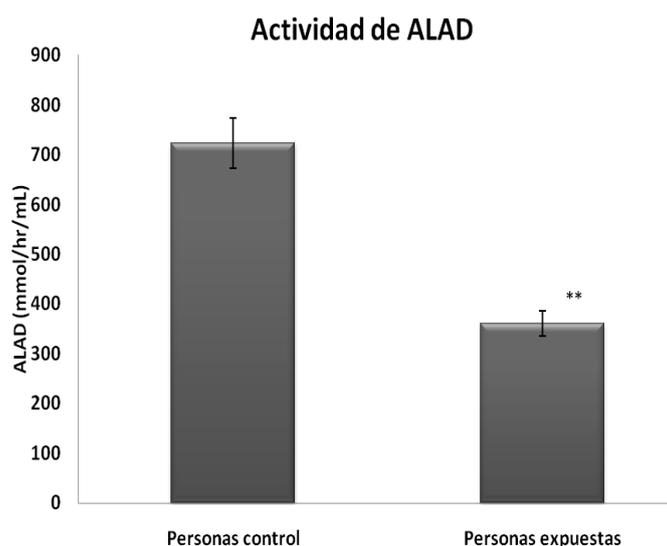
"t" Student, \*\* $p < 0.001$  (personas control vs personas expuestas)



**Grafico 8. Niveles de plomo en sangre de individuos control y los expuestos laboralmente a Pb.**



**Grafico 9. Niveles de malonildialdehído (MDA) como subproducto final de lipoperoxidación**



**Grafico 10. Actividad de la enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidrogenasa en la población control y expuesta a Pb.**

#### IVa. Correlación entre biomarcadores de efecto y exposición a plomo

Para determinar la correlación entre los biomarcadores de toxicidad a plomo en personas control y personas expuestas, se realizaron de forma independiente correlaciones simples de Pearson. Los resultados se muestran en la tabla 6 para los controles y en la tabla 7 para las personas expuestas a plomo.

**Tabla 6. Resultados del análisis de correlación simple de Pearson entre los biomarcadores de exposición a Pb y la genotoxicidad presentes en personas control.**

	% Reparación	Tail length ( $\mu\text{m}$ )	MDA (nmol/mL)	Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	ALAD (mmol/hr/mL)
% Reparación					
Tail length ( $\mu\text{m}$ )	$r = 0.403$ $p = 0.0222$				
MDA (nmol/mL)	$r = 0.162$ $p = 0.375$	$r = -0.0703$ $p = 0.702$			
Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	$r = 0.27$ $p = 0.134$	$r = -0.198$ $p = 0.277$	$r = 0.38$ $p = 0.0322$		
ALAD (mmol/hr/mL)	$r = 0.0069$ $p = 0.97$	$r = -0.367$ $p = 0.0386$	$r = -0.169$ $p = 0.356$	$r = 0.25$ $p = 0.167$	

Los recuadros marcados muestran los valores estadísticamente significativos,  $p < 0,05$ .

**Tabla 7. Resultados del análisis de correlación simple de Pearson entre los biomarcadores de exposición a Pb y la genotoxicidad presentes en personas expuestas a Pb.**

	% Reparación	Tail length ( $\mu\text{m}$ )	MDA (nmol/mL)	Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	ALAD (mmol/hr/mL)
% Reparación					
Tail length ( $\mu\text{m}$ )	$r = 0.26$ $p = 0.22$				
MDA (nmol/mL)	$r = 0.05$ $p = 0.815$	$r = -0.127$ $p = 0.533$			
Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	$r = -0.0537$ $p = 0.803$	$r = -0.238$ $p = 0.263$	<b><math>r = 0.279</math></b> <b><math>p = 0.187</math></b>		
ALAD (mmol/hr/mL)	$r = 0.123$ $p = 0.566$	$r = 0.0423$ $p = 0.884$	$r = -0.137$ $p = 0.524$	<b><math>r = -0.326</math></b> <b><math>p = 0.119</math></b>	

Por otro lado, se realizó la correlación simple de las variables de estudio, incluyendo a todos los individuos, cuyos datos se muestran en la tabla 8. En ella es posible apreciar la correlación estadísticamente significativa entre los niveles de plomo en sangre y la inducción de rompimientos en el ADN; al igual que entre la inhibición de la actividad de ALAD y el daño al ADN y por supuesto entre los niveles de plomo en sangre y la inhibición de ALAD.

**Tabla 8. Resultados del análisis de correlación simple de Pearson entre los biomarcadores de exposición a Pb y la genotoxicidad presentes en todas las personas que conformaron el estudio (controles y expuestos)**

	% Reparación	Tail length ( $\mu\text{m}$ )	MDA (nmol/mL)	Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	ALAD (mmol/hr/mL)
% Reparación					
Tail length ( $\mu\text{m}$ )	$r = 0.0879$ $p = 0.519$				
MDA (nmol/mL)	$r = 0.0686$ $p = 0.615$	$r = 0.0985$ $p = 0.47$			
Pb ( $\mu\text{g/dL}$ )	$r = -0.10$ $p = 0.45$	<b><math>r = 0.597</math></b> <b><math>p = 0.00000119</math></b>	$r = 0.303$ $p = 0.023$		
ALAD (mmol/hr/mL)	$r = 0.109$ $p = 0.422$	<b><math>r = -0.598</math></b> <b><math>p = 0.00000115</math></b>	$r = -0.234$ $p = 0.0829$	<b><math>r = -0.581</math></b> <b><math>p = 0.00000268</math></b>	

Los recuadros marcados muestran los valores estadísticamente significativos,  $p < 0,05$ .

## **DISCUSION DE RESULTADOS**

La investigación presente se realizó con la finalidad de monitorear un grupo de individuos expuestos laboralmente a Pb, para poder evaluar el daño al ADN y evidenciar las alteraciones que este metal puede tener sobre los mecanismos de reparación del ADN.

El efecto genotóxico observado en las personas expuestas va de acuerdo con trabajos previos del laboratorio en los cuales se determinó la capacidad del plomo de inducir rompimientos en la cadena del ADN por exposición *in vitro* e *in vivo* al metal (Valverde et. al. 2000, Valverde et. al. 2001) y trabajos como los de (Wozniak, 2002). El efecto genotóxico determinado en los alfareros se manifestó como la inducción de rompimientos de cadena sencilla del ADN, como se observa en la gráfica 1, ya que las personas expuestas presentan una mayor longitud en la cola del cometa (LCC) en comparación con las personas control, lo cual nos dice que el ADN sufrió una mayor cantidad de rompimientos de cadena sencilla. Este resultado confirma que el plomo es un metal genotóxico, capaz de inducir lesiones de tipo oxidativas en el ADN cuando los niveles de exposición superan a la norma permitida en sangre (10 µg/dL). Sin embargo, en el trabajo de García-García (2005) no fue posible establecer diferencias entre los grupos control y expuestos a nivel de inducción de rompimientos, dado que en esa población se manifestó más bien un efecto entrecruzador por parte del metal.

Un mecanismo por el cual se genera daño al ADN es por la inducción de estrés oxidativo, debido principalmente a la unión del Pb a los grupos sulfidrilo de las proteínas, para favorecer la presencia de bases oxidadas en el ADN. Una correlación positiva se ha observado entre la presencia de Pb en sangre de los individuos expuestos con respecto a la concentración de malondialdehído y el daño al ADN (Wozniak, 2002) con una correlación marginal significativa. Otro evento que genera daño al ADN es la acumulación de ácido δ-aminolevulínico (ALA) que da origen a la aparición de especies reactivas de oxígeno por lo cual

ALA actúa como un pro-oxidante en la intoxicación por plomo, conduciendo a el daño oxidativo para el ADN (Duydu, 2001).

Antecedentes previos (Foulker, 1990) han mostrado que la unión de los metales o iones metálicos al ADN o a proteínas implicadas con los procesos de reparación de ADN, pueden causar cambios en la estructura, lo cual también es un proceso que afecta la funcionalidad de los mecanismos de reparación. Para analizar los efectos inducidos sobre la funcionalidad de los mecanismos de reparación, se determinaron cinéticas reparativas del ADN de los individuos que respondieron ante un reto genotóxico secundario. Dicho reto lo indujo la exposición a radiación  $\gamma$ , ésta induce rompimientos de cadena sencilla en el ADN, esta lesión recluta mecanismos de reparación tales como la reparación por escisión de bases (BER) y también la reparación por escisión de nucleótidos (NER), es por ello que se propone que la alteración de estos mecanismos de reparación (principalmente BER) se da por un mecanismo indirecto de genotoxicidad del plomo (Hartwig y Schwertle, 2002). Los resultados de las cinéticas de reparación del ADN (tabla 3 y grafica 5), muestran que ambas poblaciones reparan aunque hay que hacer notar que el daño en todas las categorías es siempre mayor en los individuos expuestos, lo cual nuevamente refleja que si bien hay respuesta reparativa, es porque la exposición no rebasa el umbral de respuesta (Duydu, 2001).

La sustitución de un ion metálico que es esencial para la actividad enzimática con un no-metal puede alterar o inhibir la eficacia de los procesos de reparación del ADN induciendo cambios conformacionales en el ADN o las proteínas, lo que impide el reconocimiento y/o eliminación de la lesión de ADN, por los errores en la fidelidad de la polimerización y/o inhibición de esta. Los metales y los iones metálicos inhiben los mecanismos de replicación, generalmente esto ocurre a altas concentraciones citotóxicas, inhibiendo la actividad de las enzimas requeridas para la replicación del ADN (Ariza et.al. 1999). Por lo tanto, considerando los resultados tanto de genotoxicidad y de la capacidad reparativa del ADN, podemos proponer que la exposición crónica al metal es un factor de susceptibilidad a la acumulación de daños deletéreos sobre el material genético que si bien alteran solo a un porcentaje de la

población expuesta, que los niveles de exposición y la cronicidad pueden seguir alterando los mecanismos de reparación en la población que muestra alteraciones y también en los individuos que aún no manifiestan alteraciones en la reparación del daño inducido por la radiación  $\gamma$ .

Los resultados de la capacidad de reparación del ADN se observan en la tabla 4, donde puede apreciarse que los individuos expuestos tienen una capacidad de reparación del 77% en comparación con los controles que repararon un 92% el daño inducido, lo cual nos indica que el estar en contacto con el plomo, es un factor de riesgo y que ocasiona inhibición en los mecanismos de reparación del ADN, provocando también la acumulación de daños en el material genético, lo cual puede generar un cambio en la estructura del ADN, sin embargo en el trabajo realizado por García-García (2005) se observa claramente un daño sobre los mecanismos de reparación de la población ocupacionalmente expuesta a plomo ya que se observa que se inhibe hasta un 70% la capacidad reparativa del ADN. Quizás la diferencia en el nivel de afectación de la reparación del ADN entre ambos trabajos radica en los niveles de Pb en sangre, ya que en el trabajo de García-García (2005), los niveles de exposición rebasan la norma más de 7 veces, mientras que en el presente trabajo el promedio de exposición al metal es de 2 a 3 veces por encima de la norma; lo cual sugiere que se requieren altos niveles de plomo en sangre para inducir efectos sobre los mecanismos reparativos del ADN.

En el grafico 6, se observa la cinética reparativa de cada uno de los individuos que conforman el grupo control, en donde se observa que los individuos 19 y 22 no son capaces de responder al daño genotóxico producido por la radiación  $\gamma$ , y que el individuo 26 no fue capaz de reparar el daño producido aun a pesar de tener una baja concentración de plomo, en conjunto esto demuestra que hay variación en la susceptibilidad de los individuos para responder a los efectos dañinos ocasionados sobre el ADN. En el grafico 7 se observa la cinética reparativa de los individuos que forman el grupo expuesto en donde se ve claramente que la mayoría de ellos se logro inducir un daño mayor ante el reto genotóxico, a excepción de los individuos 1, 3, 5, 6 y 11,

que no fueron capaces de sufrir un daño mayor a 5  $\mu\text{m}$  en relación con el basal.

Se observa que la mayoría de los individuos son capaces de reparar el daño inducido, exceptuando a los individuos 9, 15 y 30 que no fueron capaces de reparar el daño producido por la radiación y teniendo un comportamiento inesperado con el individuo 36, ya que tomando en cuenta la hipótesis del presente trabajo se espera un mayor daño al ADN al tener una concentración sanguínea de plomo 9 veces por arriba de la norma permitida y presentando un daño basal menor que los individuos expuestos que presentan una menor concentración de plomo y que después de someterlo al reto genotóxico el daño producido es menor en comparación con el individuo 13 que presenta niveles de plomo 2 veces por arriba de la norma permitida. El en caso del individuo 36 se observa que capaz de reparar el daño producido aun cuando no llegue a los niveles basales, lo que nos indica que el plomo si esta ejerciendo efectos sobre los mecanismos de reparación del ADN, pero no los deseados. Este comportamiento puede asociarse a un posible polimorfismo de la enzima ALAD, presentando probablemente el alelo ALAD 2, ya que si bien tiene una alta concentración sanguínea de plomo no presenta un gran daño genotóxico, lo que puede asociarse a que el plomo se encuentra unido a la enzima y no es capaz de ejercer su efecto sobre el ADN.

En el caso del presente trabajo pueden existir diferentes factores por los cuales los individuos no presentan una inhibición tan drástica sobre los mecanismos de reparación del ADN. Una de ellas puede deberse a la variabilidad que presenten los individuos en el polimorfismo de ALAD, ya que individuos con el alelo ALAD 2 tienen una mayor cantidad de acarreadores para este alelo, el cual se dice tiene una unión mas estrecha con el plomo, lo que origina que los individuos que presentan este alelo tengan una mayor concentración de plomo en sangre y por ende mayores efectos tóxicos. Estas uniones confieren resistencia al efecto dañino del plomo, porque sujetos con ALAD 2 presentan menor viabilidad, debido a la mayor capacidad de ALAD 2 para secuestrar plomo (Montenegro et. al. 2005). Sin embargo, estudios realizados por Onalaja y Claudio (2000) sugieren un papel más complejo para

el polimorfismo de ALAD en la toxicidad por plomo, indicando la posibilidad de que ALAD 2 puede tener un efecto protector, debido a la unión más estrecha con el plomo, lo cual impide que el plomo ejerza su efecto tóxico en otros órganos y teniendo menores efectos tóxicos (Onalaja y Claudio, 2000).

La inhibición de la actividad de la enzima ALAD y la posible capacidad del Pb de generar estrés oxidativo determinado por la medición de un subproducto generado en la lipoperoxidación celular, malondialdehído (MDA), se puede observar en la tabla 5, donde se muestran los valores de los biomarcadores de exposición a plomo de individuos control e individuos expuestos. Al analizar estas variables a nivel de correlación no fue posible establecer la dependencia entre ellas, aunque los resultados de inhibición de ALAD y los niveles del metal en sangre son diferentes estadísticamente entre los grupos.

Por otro lado resulta interesante el que la cantidad de MDA para ambos grupos es igual, de lo cual se deduce que el plomo si bien es capaz de generar un estrés oxidativo, su blanco celular en este caso particular no fueron los lípidos de células sanguíneas. Sin embargo la presencia de especies oxidantes puede generarse también por la inhibición de la actividad de la enzima ALAD, la cual se observa en la grafica 10, en donde en las personas expuestas a plomo se encuentra inhibida aproximadamente un 50% en comparación con las personas controles, lo que comprueba que el plomo inhibe drásticamente la actividad de esta enzima, en concentraciones por arriba de 15  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (Onalaja y Claudio, 2000).

Para cumplir con el objetivo de correlacionar el daño al ADN y la capacidad reparativa con los diferentes biomarcadores de exposición a plomo, se realizó una correlación simple de Pearson, cuyos resultados se muestran en las tablas 6, 7 y 8 para controles, expuestos y global respectivamente. La correlación entre la genotoxicidad (Tail length) y el % Reparación muestra que una alteración de los mecanismos de reparación del ADN, influye sobre la estabilidad e integridad del material genético dada la correlación significativa entre ambos parámetros, sugiriendo que los rompimientos del ADN se pueden

deber a ciclos inconclusos de reparación, que se presentan solo en los individuos control, cuyos niveles de Pb en sangre son menores a 5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ .

Existe una correlación de la actividad de la enzima ALAD con el factor de exposición, lo cual corrobora que el plomo es capaz de inhibir la actividad de ALAD y que la posterior acumulación de ALA genere un daño al ADN y a sus mecanismos de reparación, observándose una mayor migración de los fragmentos del ADN.

Sin embargo en la tabla 7 en las correlaciones de los biomarcadores de las personas expuestas a altas concentraciones de plomo no se observa correlación significativa en los individuos expuestos, observándose una correlación marginal entre el plomo y la generación de MDA, así como en la correlación marginal de ALAD con plomo, donde se observa que el plomo inhibe su actividad, el resultado de esta correlación puede deberse a la presencia de polimorfismos que tiene la enzima ALAD ( alelo 1 y 2), lo cual ha sugerido que se aumenta la susceptibilidad y toxicidad por plomo (Duydu et. al. 2003), lo que también sugieren es que el alelo ALAD 2 se una más estrechamente a plomo en comparación con ALAD 1 (Montenegro et al. 2006).

Otra explicación a la falta de correlación entre los diferentes marcadores de intoxicación a plomo y efectos sobre la cinética reparativa se deben a que este proceso se afecto muy poco en la población de alfareros, sin embargo todos los marcadores fueron positivos con respecto a la población control. Así mismo, al no tener correlación significativa de los individuos expuestos a la lipoperoxidación (MDA) no se puede descartar la posibilidad de que se generara daño oxidativo y probablemente se hubiera observado esta correlación con otros biomarcadores que evidencien el estrés oxidante que puede generar el plomo, tales como Catalasa, SOD y glutatión.

Sin embargo al realizar la correlación de todas las variables en la población monitorizada, como se observa en la tabla 8, fue posible establecer que cuando los niveles de exposición son de 2 a 3 veces mayores a 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , existe una correlación con la inducción de rompimientos de cadena sencilla; al igual que es posible establecer una relación entre el biomarcador de exposición

y efecto, es decir, entre la inhibición de la actividad de ALAD y el daño al ADN. Por otro lado la correlación determinante entre la inhibición de ALAD y los niveles de Pb en sangre reflejan la existencia de una exposición reciente que no necesariamente refleja una exposición clínica.

En conjunto este trabajo describe los procesos bioquímicos que padece una población laboralmente expuesta a Pb, cuyos niveles del metal en sangre son de 2 a 3 veces mayores a la norma establecida y muestra que hay efectos genotóxicos a nivel de inducción de daño. Sin embargo, aún no se manifiestan alteraciones en la funcionalidad de los mecanismos de reparación del ADN como los determinados en otros trabajos (García-García, 2005), lo cual nos lleva a proponer posibles estudios de intervención en la población con la finalidad de disminuir los efectos biológicos (Calderón y Maldonado, 2008).

## **CONCLUSIONES**

- \* Se observó el efecto genotóxico del plomo, evidenciando que el metal es capaz de inducir rompimientos de cadena sencilla del ADN a niveles de exposición laboral del ramo de la alfarería. Individuos que laboran en talleres de alfarería del INEGI de la ciudad de Dolores Hidalgo, Guanajuato, presentan una concentración de plomo en sangre 3 veces por arriba de los niveles permisibles.
- \* Las personas laboralmente expuestas a Pb presentan una inhibición en los mecanismos de reparación del 23%.
- \* La inhibición de ALAD confirma a nivel bioquímico la intoxicación por plomo.
- \* El análisis de correlación de todos los individuos monitorizados señala la relación entre la exposición a plomo ([PbS] e inhibición de ALAD) y la inducción de rompimientos de cadena sencilla en el ADN cuando los niveles de exposición son hasta tres veces por encima de la norma permisible.
- \* La exposición a plomo por arriba del límite permitido (10 µg/dL) genera una serie de mecanismos indirectos de genotoxicidad como lo son las alteraciones sobre los mecanismos de reparación del ADN y sugiere que la exposición crónica puede abatir los mecanismos por los cuales se mantiene la integridad de material genético.

## **APENDICE**

### Preparación de las soluciones a utilizar para la electroforesis unicelular alcalina a pH >13

- ***Agarosa regular 0.5%***

Se requiere saber la cantidad de agarosa que se debe de preparar por las laminillas a hacer. Para 300 laminillas, se debe de pesar 250 mg de agarosa regular en 50 mL de agua destilada. Se licua el agarosa en el microondas por algunos segundos, hasta que esté completamente transparente.

- ***Agarosa de bajo punto de fusión 0.5%***

Para preparar 300 laminillas se debe de pesar 255mg de agarosa de bajo punto de fusión en 25 mL de agua destilada. Se prepara al igual que la agarosa regula, licuando la agarosa en el microondas por algunos segundos, hasta que esté completamente transparente.

- ***Solución de lisis pH 10***

Para la solución de lisis para los kôplins se debe de tener en cuenta el número de kôplins a utilizar, en este caso son 30 y por cada vaso kôplin se requiere de 50 mL de solución de lisis. La cantidad de solución a preparar es de 1.5 L

<u>Nombre del reactivo</u>	<u>Volumen a preparar 1.5 L</u>
Solución stock de lisis pH 10	1350 mL
DMSO (dimetil sulfóxido) 10%	120 mL
Tritón X-100 1%	12 mL

- ***Solución NaOH 10 N***

Para un litro de solución, se disuelven 400g de sosa en los 1000 mL de agua destilada. Se almacena a temperatura ambiente y en frasco ámbar.

- ***Solución EDTA disódico 200 mM pH 7.5***

Para un litro de solución, se disuelven 74.4g de EDTA disódico en los 1000 mL de agua destilada. Se almacena a temperatura ambiente y en frasco ámbar.

- ***Buffer Tris pH 7.5***

Para un litro de solución se requiere de 48.5 g de Tris base. Primeramente se disuelve el Tris en 800 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 7.5 con HCl concentrado y después se afora a 1 L. Se almacena a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

- ***Solución amortiguadora de electroforesis***

Esta solución se prepara a partir de las soluciones de NaOH 10 N y EDTA disódico 200 mM pH 10. La solución amortiguadora se debe de preparar en el momento en que se vaya a utilizar.

El volumen a preparar depende de las dimensiones de la cámara de electroforesis. Por cada litro de solución es suficiente para 15 laminillas y por cada 1.5 litros es suficiente para 24 laminillas.

<u>Nombre de la solución</u>	<u>Para 1 L de solución</u>	<u>Para 1.5 L de solución</u>
NaOH 10 N	30 mL	45 mL
EDTA disódico 200 mM	5 mL	7.5 mL
Agua destilada	c.b.p el aforo	c.b.p el aforo

- *Preparación de solución de tinción de bromuro de etidio 10x (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*

Para 50 mL de solución, se disuelven 0.01 g de bromuro de etidio en el volumen de agua destilada. Se almacena a temperatura ambiente y protegido de la luz.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.** Ariza, ME; Bijur, GN; Williams, MV; Environmental Metal Pollutans, Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity, Molecular Approaches to Determine Mechanism of toxicity; Kluwer Academic Publishers; USA; pp 30, 63, 103, 104, 106, 118, 119; **1999**.
- 2.** Calderón V; Maldonado, M; Contaminación e intoxicación por plomo; Trillas, **2008**, pp 50-67.
- 3.** Claudio, L; Lee, T; Wolff, M.S; Wetmur, J.G; A murine model of genetic susceptibility to lead bioaccumulation; *Fundamental and applied toxicology*. **1996**, 35, pp 84-90.
- 4.** Córdoba D; Toxicología, 5<sup>a</sup> edición; Ed. El Manual Moderno; pp 337-344; **2006**.
- 5.** Danadevi, K; Rozati, R; Banu, B.S; Rao, P.H; Grover, P; DNA damage in workers exposed to lead using cometa assay; *Elsevier toxicology*. **2003**, 187, pp 183-192.
- 6.** Deisbach, RH; True, BL; Manual de toxicología clínica de Deisbach: prevención, diagnostico y tratamiento, 7<sup>a</sup> edición en Español; Ed. El Manual Moderno; pp 234-240; **2003**.
- 7.** Duydu, Y; Süzen, H.S; Aydin, A; Uysal, H; Isimer, A; Vural, N; Correlation Between Lead Exposure Indicators and Sister Chromatid Exchange (SCE) Frecuencias in Lymphocytes from Inorganic Lead

Exposed Workers; *Archives of environmental contamination and toxicology*. **2001**, 41, pp 241-246.

- 8.** Duydu, Y; Süzen, H.S; Influence of  $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on the frequency of sister chromatid exchange (SCE) and the number of high-frequency cells (HFCs) in lymphocytes from lead-exposed workers; *Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. **2003**, 540, pp 79-88.
- 9.** Foulkers, E.C; Biological Effects of Heavy Metals; Volume II Metal Carcinogenesis; **1990**, pp 46, 47, 86-88.
- 10.** García-García, J.D. Genotoxicidad del plomo: alteraciones en los mecanismos de reparación del AND en personas ocupacionalmente expuestas (POE). Tesis para obtener el título de QFB, UNAM (2005).
- 11.** Hernández, F; Curso de toxicología; Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, **2008**.
- 12.** Hernberg, S; Lead Poisoning in historical perspective; *Am J Ind Med*. 38: 244-245; **2000**.
- 13.** Hartwig, A y Shewerdtle, T; Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair process: Toxicological implications; *Toxicol Lett*, 127: 47-54; **2002**.
- 14.** Klaassen, C.D; Watkins III J.B; Caserett & Doull: Manual de Toxicología; 5ª edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana, **2001**, pp 667-682.

- 15.** Lauwerys, RR; Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales; Ed. Masson; pp 175-191; **1994**.
- 16.** Montenegro, M.F; Barbosa, F; Sandrim, V.C; Gerlach, R.F; Tanus-Santos J.E; A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio; *Inorganic compounds*. **2005**, 80, pp 394-398.
- 17.** Montenegro, M.F; Barbosa, F; Sandrim, V.C; Gerlach, R.F; Tanus-Santos J.E; Ethnicity affects the distribution of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) genetic variants; *Clinica Chimica Acta*. **2006**, 367, pp 192-195.
- 18.** Montoya, MA; Toxicología clínica, 3<sup>a</sup> edición; Ed. Mendez; pp 275-288; **2002**
- 19.** Onalaja, A; Claudio, L; Genetic susceptibility to lead poisoning; *Environ. Health Perspect*, 108 suppl; 1:123-28; **2000**.
- 20.** Rojas, E; López, M; Valverde, M; Single cell electrophoresis assay: methodology and applications; *J. Chromatogr.* **1999**, 727:225-254.
- 21.** Sing, N.P; Mc Coy, M.T; Ticel, R.R; Schneider, E.L; A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. **1998**, 175: 184-191.

- 22.** Valverde, M; Trejo, c; Rojas, E; Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?; *Mutagenesis*. **2001**, 16(3), pp 265-270.
- 23.** Valverde , M; Fortoul, T; Díaz-Barriga, F; Mejía, J; Rojas, E; Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*. **2002**, 17 (1), pp 55-61.
- 24.** Wang, G; Fowler, B.A; Roles of biomarkers in evaluating among mixtures of lead, cadmium and arsenic; *Toxicology an applied pharmacology*. **2008**, 20, pp 1-8.
- 25.** Wozniak, K; Blasiak, J; In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links; *Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. **2002**, 535, pp 127-139.