



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ADUCTOS DE
MALONDIALDEHÍDO EN DNA DE PERSONAS EXPUESTAS A
CONTAMINACIÓN POR COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES
EN EL AMBIENTE Y SU RELACIÓN CON LOS POLIMORFISMOS
GENÉTICOS CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y NQO1.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

DULCE MARIA BELTRAN TRUJILLO

DIRECTORA DE TESIS
DRA. REGINA MONTERO

2010



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.



	página
Resumen	1
I Introducción	3
1.1 Metabolismo	5
1.1.2 Citocromo P450	7
1.1.3 Actividad catalítica	8
1.1.4 Glutación transferasa	12
1.1.5 Función biológica de glutación transferasa	12
1.1.6 NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1)	13
1.2 Estrés oxidante	14
1.2.1 Radicales libres	15
1.2.2 Principales fuentes de ROS	18
1.2.3 Respuesta celular	18
1.2.4 Efectos nocivos de los ROS	19
1.2.5 Peroxidación lipídica	20
1.3 Biomarcadores	23
1.4 Estudios de genotoxicidad	25
1.5 Micronúcleo	26
1.6 Aductos	27
1.6.1 Malondialdehído	27
1.6.2 Malondialdehído deoxiguanosina M1dG	29
II Lugar de estudio	30
III Planteamiento del estudio	33
IV Hipótesis	35
V Objetivos	35
VI Material y método	37
VII Resultados	43
VIII Discusión	49
IX Conclusiones	56
X Bibliografía	57
Anexos	66



RESUMEN

En el año de 1954, Rebeca Gershman sugirió por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos generadores de enfermedades, debido a la alta inestabilidad atómica de los mismos (Ramos et al., 2006).

La producción de radicales libres y ROS puede generar la Peroxidación de lípidos, principalmente de cadenas poliinsaturadas, que a su vez pueden conducir a la formación de compuestos intermediarios y/o finales altamente reactivos, entre ellos el MDA, el cual es producto final de este proceso (Chiuauailaf et al., 2001).

En diversos estudios se menciona a los aductos de DNA como un posible iniciador en el proceso de carcinogénesis (Helmut et al., 2005). La biotransformación en el organismo de los compuestos bioquímicamente extraños, o xenobioticos, es fundamental para facilitar su excreción e influye poderosamente en sus efectos tóxicos.

Para que la excreción sea efectiva, la biotransformación modifica la molécula original haciéndola más hidrosoluble. Como consecuencia de este proceso suelen formarse metabolitos menos tóxicos que el original. Sin embargo, en ocasiones los metabolitos resultantes son más tóxicos que el compuesto del que proceden, en cuyo caso se puede hablar de activación metabólica o bioactivación.

La biotransformación se realiza por medio de una serie relativamente reducida de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas. Las reacciones de transformación se clasifican en dos grandes grupos: reacciones de fase I (CYP 450) y de fase II (GST) (Moreno, 2003).

El objetivo de este estudio fue evaluar la cantidad de aductos de M1dG en DNA, en un grupo de individuos expuestos a contaminantes ambientales como cloroformo, cloruro de metileno, índigo, anilina y tolueno; cerca de los ríos Atoyac y Xochiac del estado de Tlaxcala (Montero et al., 2006). Los individuos estudiados estaban clínicamente sanos y se utilizó un grupo de referencia del Distrito Federal; se analizaron mediante un modelo lineal generalizado los factores que pueden influir en los niveles de aductos de MDA, tales como el índice de masa corporal, hábito de fumar, el género, la actividad o la exposición a



contaminantes por la cercanía de su residencia a los ríos contaminados. La metodología de determinación de aductos de malondialdehído deoxiguanosina (M1dG) en DNA fue por inmunopunto según Leuratti et al., 1998 con algunas modificaciones. El presente estudio mostró niveles más altos en las concentraciones de M1dG en los pobladores del D.F. en comparación con las localidades aledañas al Río Atoyac en Tlaxcala, es decir, Justina, Villalta y Xalmimilulco. En relación al índice de masa corporal, se observó una diferencia significativa de mayor daño en las personas con desnutrición a diferencia de las que presentan IMC normal, sobrepeso y obesidad.

Las personas que tienen el hábito de fumar presentaron una mayor concentración de aductos a diferencia de las no fumadoras. En cuanto al polimorfismo GSTM1 nulo los varones presentaron una mayor concentración de aductos a diferencia de las mujeres. Conclusiones: encontramos evidencia de que el biomarcador de estrés oxidante M1dG, puede estar determinado por diferentes factores de estilo de vida como el hábito de fumar y hábitos alimenticios siendo aparentemente más susceptible el género masculino.



I. INTRODUCCION

Los contaminantes atmosféricos pueden encontrarse en forma sólida, líquida o gaseosa en el rango de temperaturas habituales en el medio ambiente. Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) incluyen diversas clases de compuestos químicos, con distinto grado de volatilidad y liposolubilidad, utilizados en grandes cantidades en la industria, en el transporte y en el ámbito doméstico. Estos compuestos incluyen numerosos disolventes tanto halogenados como no halogenados, utilizados en múltiples aplicaciones: agentes desengrasantes, pinturas, barnices, lacas, tintas, combustibles y sus aditivos, así como los subproductos de la cloración del agua de abastecimiento; son también los protagonistas de numerosos casos de contaminación ambiental de origen industrial en los que se hace necesaria la restauración y limpieza de terrenos y aguas subterráneas (Moreno, 2003).

Los VOC's comprenden un importante grupo de contaminantes comúnmente presentes ya sea en un lugar cerrado o al aire libre. Algunos de estos compuestos son potentes carcinógenos o mutágenos en animales a muy bajas concentraciones (Kim *et al.*, 2003).

El análisis de la exposición ambiental a VOC's debe considerar en la mayor parte de los casos las posibles interacciones entre los mismos, dada la habitual presencia conjunta de distintos contaminantes de este tipo. Las interacciones entre VOC's pueden ser aditivas, sinérgicas o antagónicas.

La presencia simultánea de varios compuestos es característica de la exposición ambiental. La mayor parte de los contaminantes se presenta en forma de mezclas complejas, como el aire contaminado por emisiones industriales y el tráfico. Además, es inevitable la exposición simultánea a compuestos químicos por distintas vías, como pueden ser la ingestión, la inhalación o la vía dérmica. Una vez absorbidos, los compuestos químicos se distribuyen en el organismo alcanzando sus órganos diana, donde ejercen sus efectos tóxicos (Moreno, 2003).

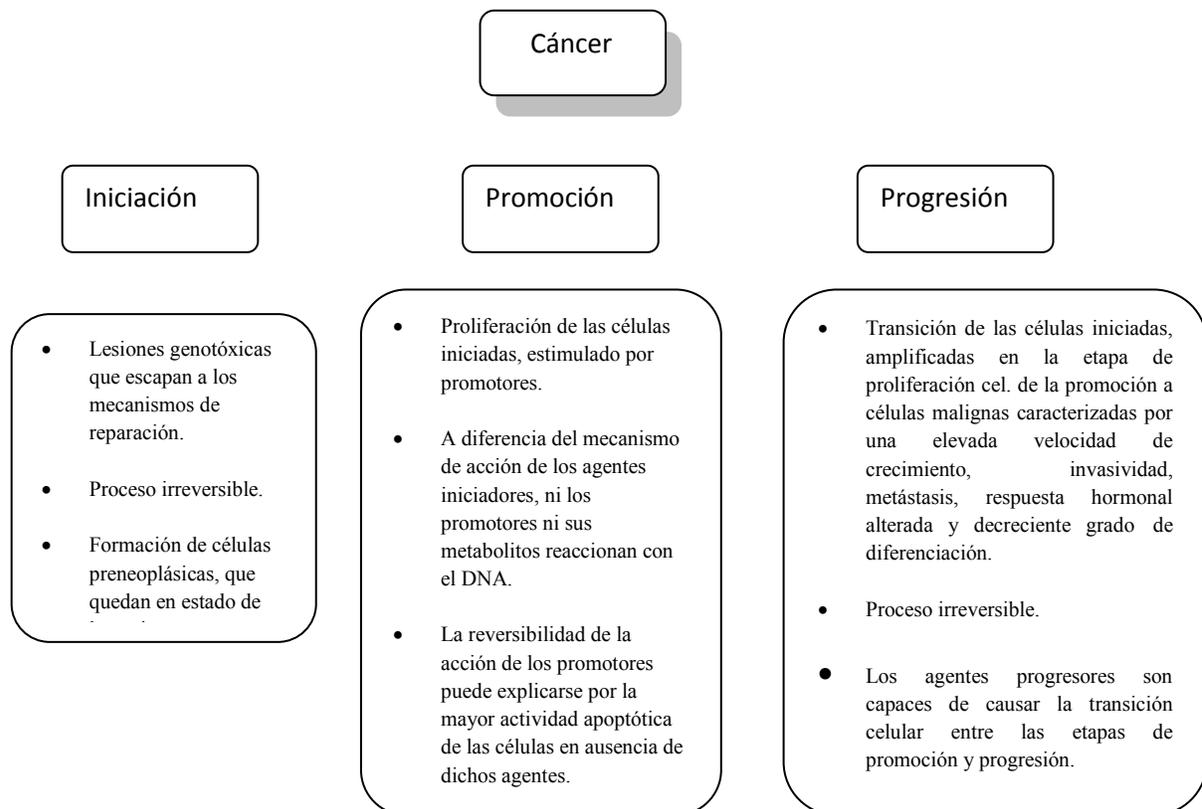
Las técnicas de la epidemiología tradicional han sido útiles para demostrar la asociación entre la exposición ambiental y el desarrollo de diferentes enfermedades. La epidemiología molecular utiliza biomarcadores que son una medida del efecto tóxico de un agente químico o físico dentro del organismo que se quiera estudiar (Bonassi y William. 2002).



Estudios epidemiológicos han demostrado un incremento en la incidencia de cáncer en trabajadores expuestos a compuestos aromáticos policíclicos (PAH), especialmente el riesgo de padecer cáncer de pulmón, piel, vejiga y próstata (Marczynski *et al.*, 2005).

Existe evidencia del desarrollo de (especies reactivas de oxígeno) ROS en la producción de tumores por PAH; estas especies de oxígeno pueden llevar a la formación de daño oxidante al DNA. Este daño que puede pertenecer a diversas lesiones como lo son aductos, rompimiento de cadenas; es fácil de detectar y se considera como un paso en el proceso de carcinogénesis. (Figura 1)

Figura 1. La inducción de estrés oxidante ha sido sugerido como posible mecanismo de carcinogénesis ya que se encuentra presente en todos sus estadios: iniciación, promoción y progresión (Moreno 2003).





1.1 Metabolismo

La biotransformación en el organismo de los compuestos bioquímicamente extraños, o xenobióticos, es fundamental para facilitar su excreción e influye poderosamente en sus efectos tóxicos.

La excreción de los compuestos lipofílicos en ausencia de biotransformación sería extraordinariamente lenta, dada la facilidad con que estos compuestos se absorben por difusión pasiva y se reabsorben en los túbulos renales e intestino por idéntico mecanismo.

Para que la excreción sea efectiva, la biotransformación modifica la molécula original haciéndola más hidrosoluble. Como consecuencia de este proceso suelen formarse metabolitos menos tóxicos que el original. Sin embargo, en ocasiones los metabolitos resultantes son más tóxicos que el compuesto del que proceden, en cuyo caso se puede hablar de activación metabólica o bioactivación.

La biotransformación se realiza por medio de una serie relativamente reducida de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas. Las reacciones de transformación se clasifican en dos grandes grupos: reacciones de fase I y de fase II (Moreno. 2003).

Las transformaciones metabólicas de fase I son reacciones de degradación, consistentes en la hidrólisis, oxidación o reducción de la molécula original, con lo que suele producirse un pequeño aumento de su solubilidad en agua. Las reacciones de fase I son procesos enzimáticos con productos cuyas moléculas presentan grupos funcionales como el alcohol, ácido carboxílico, sulfhidrilo, amino o epóxido. Un ejemplo de enzimas de esta fase es el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450.

Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación, mediante las cuales la molécula original o sus metabolitos, generados en la fase I, se combinan enzimáticamente con moléculas endógenas (ácido glucurónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos) para formar compuestos con un grupo funcional ácido fuerte, normalmente ionizado, lo que aumenta en gran medida su hidrosolubilidad. Los conjugados así formados se eliminan fácilmente por las vías renal y biliar (Moreno. 2003).



Los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación se encuentran repartidos por todo el organismo, pero de una forma muy irregular. El hígado es el órgano donde se encuentran la mayoría de los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación. Le siguen en importancia los pulmones, la mucosa nasal, el tracto digestivo, los ojos y la piel, es decir, todos los órganos en contacto directo con el mundo exterior. También poseen actividad metabólica otros órganos como los riñones, el páncreas, los ovarios, los testículos, la placenta, etc. De hecho, en todos los tejidos existe actividad metabólica, aunque no tan extensa como en el hígado y los pulmones.

La presencia en todo el organismo de los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación puede tener profundas repercusiones toxicológicas. Es interesante destacar que dentro de un mismo órgano pueden encontrarse células con una gran actividad metabólica junto a otras carentes de dicha actividad, es decir, los propios órganos pueden tener un comportamiento heterogéneo frente a los efectos tóxicos del xenobiótico, causado por las diferencias en las capacidades metabólicas de las células que lo integran.

En las células con capacidad metabólica y, en particular en los hepatocitos, los sistemas enzimáticos se sitúan preferentemente en el retículo endoplásmico (de donde se forman los microsomas cuando se hace un homogenado del tejido) y en la fracción soluble del citoplasma, aunque también se encuentran en menor medida en las mitocondrias, núcleo y lisosomas (Moreno. 2003).

1.1.2. CITOCROMO P450

El sistema de monooxigenasas es un complejo multienzimático que posee una hemoproteína denominada citocromo P450 (CYP450 o P450), cuyo sitio activo está conformado por una protoporfirina IX, unida a un átomo de hierro a través de una cisteína. Este grupo de enzimas comenzó a ser estudiado a mediados del siglo XX y en 1964 los japoneses Tseo Omura y Ryo Sato confirmaron la naturaleza hemo-protéica de estas enzimas dándole el nombre de Citocromos P450 por la peculiaridad de que su espectro de absorción en luz UV presenta un pico máximo a 450 nm. Una vez identificado CYP450, numerosos estudios demostraron que esta proteína era una



hidroxilasa microsomal hepática y su actividad enzimática es conocida por estudios de la biotransformación de fármacos (Josephy. 1997).

Las enzimas del citocromo P450 juegan un rol central en el metabolismo de algunos xenobióticos, catalizando reacciones de desintoxicación y bioactivación.

Este sistema se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente activo en el hígado. Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, el P450 participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroideas y ácidos grasos. En los mamíferos, el P450 se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso (microsomas) (Orellana *et al.*, 2004).

1.1.3. Actividad catalítica

El P450 cataliza la biotransformación de un sinnúmero de xenobióticos, proceso que se realiza principalmente en el hígado, pero en éste y otros órganos participa además en el metabolismo de una serie de compuestos de naturaleza endógena. La gran gama de reacciones químicas catalizada y la amplia especificidad de sustrato característico de estas enzimas, hacen del P450 uno de los catalizadores más versátiles conocidos (Orellana *et al.*, 2004).

Como se observa en la figura 2, aunque la principal función del P450 es participar en reacciones de desintoxicación transformando un xenobiótico activo en inactivo que es excretado por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo (Orellana *et al.*, 2004).

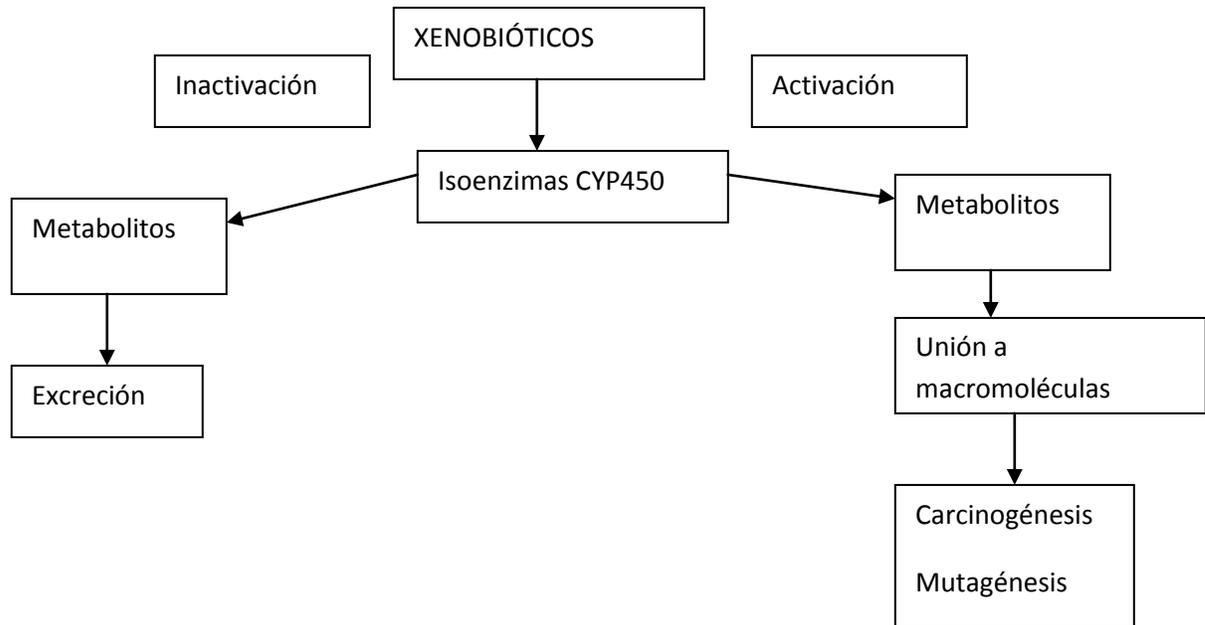
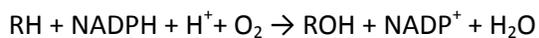


Figura 2 Reacciones de activación o inactivación mediadas por enzimas de citocromo P450 (tomada de Orellana *et al.*, 2004).

La mayoría de las reacciones catalizadas requieren de un paso inicial que involucra la inserción de un grupo hidroxilo en el sustrato para formar un intermediario hidroxilado al cual pueden, dependiendo de la naturaleza del sustrato y la estabilidad del intermediario, ocurrirle reacciones de alquilación, aminación, etc.

La reacción general catalizada por P450 es:



El P450 tiene requerimiento absoluto de NADPH y oxígeno molecular para la catálisis de la monooxigenación (Lewis. 2004).



Las reacciones de monooxigenación requieren de dos electrones que son transferidos desde P450 por la flavoproteína NADPH-P450 reductasa.

Los electrones de P450 son necesarios para la activación del oxígeno lo que finalmente lleva a la inserción de un átomo de oxígeno al sustrato; la continua producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es el resultado inevitable del consumo de NADPH por el sistema microsomal P450 en presencia o ausencia de sustrato y puede ser una causa potencial de peroxidación lipídica, toxicidad de la célula y muerte; un ejemplo de esto se presenta en células HepG2 tratadas con hierro y ácido araquidónico lo cual llevó a un incremento en la peroxidación lipídica en células que expresan CYP2E1.

Los ROS están implicados en la regulación transcripcional de P450, particularmente de CYP1A1; este gen está representado en las células HepG2 en donde hubo un incremento de ROS por P450 en respuesta al tratamiento con H₂O₂ ó L-butionina (S,R)-sulfoximina.

Está bien establecido que P450 puede convertir sustratos a metabolitos reactivos que pueden estimular la peroxidación lipídica. Un ejemplo clásico es que CYP2E1 cataliza la reducción de tetracloruro de carbono al radical triclorometil, que puede abstraer un átomo de hidrógeno de los lípidos e iniciar el estrés oxidante. Se sugiere que la inducción de P450 puede incrementar la conversión de compuestos endógenos a metabolitos reactivos y esto puede ser una fuente de estrés oxidante con el incremento de la expresión de P450 (Zangar *et al.*, 2004).

Otro ejemplo es que el hierro puede incrementar la toxicidad del etanol y éste puede incrementar la expresión de CYP2E1; el citocromo P450 es muy activo en la oxidación del etanol a acetaldehído y en la oxidación de algunos metabolitos reactivos que son hepatotóxicos. CYP2E1 es muy activo en la oxidación de NADPH y en la producción de O₂[•] y H₂O₂ durante la actividad oxidasa microsomal. La inducción de CYP2E1 y la formación de intermediarios reactivos pueden constituir una importante vía por la cual el etanol produce estrés oxidante. (Sakurai y Cederbaum., 1998).



Los P450 que participan en la activación de procarcinógenos y xenobióticos se observan en el cuadro 1. En particular está claro que las enzimas de las subfamilias de CYP1A y CYP2E están especialmente ligadas con la activación metabólica de carcinógenos; esto ha sido observado en experimentos con animales, especialmente ratones, y en humanos se conoce que P450 cataliza estos oxidantes y consecuentemente son más susceptibles a la exposición a estos xenobióticos (Lewis.2001)

Cuadro 1. Enzimas humanas de P450 involucradas en la activación de carcinógenos y toxinas (Lewis, 2001)

CYP1A1	CYP1A2	CYP2E1	CYP3A	CYP1B1
PAHs	PAHs, aminas y aminas heterocíclicas	DMN, DEN, Benceno,	Aflatoxin B1	17 β -estradiol
ej. Benzo(a)pireno	ej Ph1P, Glu-P-1, IQ,	Butadieno	Aflatoxin G1	
		Tricloroetano,	17 β - estradiol	
		Triclorometano		
		Tetraclorometano		

Nota: Algunos carcinógenos activados por CYP2E1 también son metabólicamente activados por CYP2A6 en menor medida.

Abreviaturas:

PAHs = Hidrocarburos Aromáticos policíclicos

PhIP = 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo-[4,5-b]piridina

Glu-P-1 = 2-amino-6-metil-dipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol

IQ = 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina



1.1.4. Glutación Transferasa

Las glutación S transferasas (GST) constituyen uno de los principales sistemas de defensa celular y catalizan la conjugación de Glutathion (GSH) con una amplia gama de compuestos químicos electrofílicos. Los electrofílicos a menudo son citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos: GST constituyen el principal sistema de defensa contra éstos.

Las GST se encuentran en todos los organismos aeróbicos y en altas concentraciones en tejidos de mamíferos. Por ejemplo, el 5% de la proteína citosólica del hígado humano comprende GST y su contenido en el hígado de rata excede el 10%.

Las GST pueden ser clasificadas como enzimas citosólicas (solubles) y enzimas de enlace de membrana (microsomal). Las GST microsomales están localizadas en el retículo endoplásmico y fuera de la membrana mitocondrial, lo que representa del 3 – 4% del total de la proteína. Las GST tienen sitios de unión para los sustratos, por lo cual son consideradas como enzimas de desintoxicación (Josephy. 1997).

1.1.5. Función biológica de Glutación Transferasas

La existencia de sustratos para GST está ligada con el metabolismo del oxígeno, algunos grupos electrofílicos importantes como moléculas sustrato incluyen el epóxido, activación de alquenos y grupos hidroperoxi, que pueden surgir en procesos oxidantes en la célula. Los mecanismos de desintoxicación son muy generales por la gran cantidad de grupos químicos potencialmente tóxicos que portan los compuestos endógenos y exógenos. (Josephy 1997).

Las enzimas de la superfamilia de glutación S transferasa (GST) tienen un importante papel en la desintoxicación o inactivación de varios fármacos, xenobióticos y la limitación de efectos tóxicos



de los ROS. Existen cuatro clases de GST, GST- θ (GSTT) y GST- μ (GSTM) presentan polimorfismos genéticos, y un gran porcentaje de individuos tienen la delección homóciga en GSTT1 y GSTM1.

Se ha demostrado que el genotipo de *GSTM nulo* está asociado con varios tipos de cáncer de origen ambiental, como los relacionados con el hábito de fumar, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas, adenoma de pituitaria y leucemia linfoblástica aguda. También se ha observado una interesante asociación de este genotipo con trastornos inflamatorios intestinales tales como colitis (Keshav y Sinh. 2006)

1.1.6. NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1)

La NQO1 originalmente llamada DT-diaforasa, es una enzima que ha atraído considerablemente la atención por su función de desintoxicación de un gran número de compuestos naturales y sintéticos; así como la activación de ciertos agentes anticancerígenos (Ernster. 1998). Esta enzima es altamente inducible; antioxidantes sintéticos y extractos de vegetales y crucíferas incluyendo el brócoli son sus poderosos inductores. Con esta característica se ha sugerido que NQO1 tiene un importante rol en la quimioprevención del cáncer.

El benceno es metabolizado en el hígado a fenol, hidroquinona y catecol, los cuales son llevados a médula ósea y pueden ser activados por peroxidasa a quinonas altamente tóxicas. NQO1 es capaz de mantener estas quinonas en su forma reducida y evitar la toxicidad (Smith.1999).

En 1970 Iyanagi y Yamazaki mostraron que NQO1 cataliza la reducción de quinonas a hidroquinonas sin la formación intermedia del radical libre semiquinona (Iyanagi y Yamazaki. 1970). La principal hipótesis de protección otorgada por NQO1 contra la toxicidad del benceno es que NQO1 mantiene a las benzoquinonas en su forma reducida hidroquinona y previene la



formación de especies con enlaces covalentes como las quinonas y las semiquinonas. NQO1 confiere protección contra el estrés oxidante manteniendo la forma antioxidante de la ubiquinona.

Es probable que la hidroquinona y otros metabolitos del benceno induzcan NQO1 en médula ósea como respuesta antioxidante, ya que se ha observado que la incubación de células mieloides con hidroquinona incrementan la producción de peróxido de hidrógeno, especies reactivas de oxígeno y por lo tanto estrés oxidante (Wiemels y Smith. 1999).

1.2. Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como el efecto adverso de las reacciones oxidantes inducidas por las ROS dentro de los sistemas biológicos y es reconocido en la génesis de diversas enfermedades. (Contreras *et al.*, 2004)

El daño celular que producen las especies reactivas y los radicales libres, ocurre en los enlaces de proteínas, en los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, en hidratos de carbono y en ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, tales como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas y diversos tipos de cáncer, entre otros (Ramos *et al.*, 2006).

Un factor importante presente en el proceso de carcinogénesis es el rol que juegan las ROS. Se ha demostrado que el estrés oxidante produce rompimiento de una o ambas cadenas del DNA, así como aberraciones cromosómicas y esto puede contribuir al proceso de carcinogénesis a través de la modulación de la señal transduccional y proliferación celular (Beddowes *et al.*, 2003). Se ha reportado que el tetracloruro de carbono (CCl_4) causa estrés oxidante (Sun *et al.*, 2001) y es un compuesto orgánico volátil, al igual que otros VOC's como el cloroformo, cloruro de metileno y



tolueno que son algunos de los compuestos encontrados como contaminantes ambientales en regiones industriales.

1.2.1. Radicales libres

Un radical libre representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados girando en sus orbitales atómicos externos (Cheeseman y Slater. 1993). Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, la mayoría tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de cuantificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles (en el caso de los radicales libres que poseen carga electrónica tienen la particularidad de ser difusibles no importando su tiempo de vida media) que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones en retículo endoplásmico liso y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Díaz. 2002).

Diversos autores han clasificado a los radicales libres de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula. El tipo más frecuente de encontrar en los seres vivos son los radicales libres en cuya estructura está presente el oxígeno como centro funcional. La mayoría procede de reacciones metabólicas normales, por ejemplo el anión superóxido, el radical hidroxilo y los radicales libres derivados de compuestos orgánicos: peróxido y alcoxilo, y se pueden incrementar por efectos de factores exógenos (Kehrer. 1993).

Son menos abundantes los radicales tioles, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo. Otros radicales descritos contienen carbono, fósforo o nitrógeno como centro reactivo (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas de oxígeno, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes, y son las ROS (Díaz. 2002).



Las principales especies de oxígeno o sustancias prooxidantes son:

Radical hidroxilo HO^\bullet

Peróxido de hidrógeno H_2O_2

Anión superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$

Oxígeno singulete $^1\text{O}_2$

Oxido nítrico NO^\bullet

Semiquinona Q^\bullet

Ozono O_3

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

- *Radicales libres inorgánicos o primarios.* Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.
- *Radicales libres orgánicos o secundarios.* Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.
- *Intermediarios estables relacionados con los radicales libres de oxígeno.* Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas



sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito (Díaz. 2002).

1.2.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero 2–5% escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de ROS, que son átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, y que también se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace. Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas.

Los ROS son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales y se forman de la manera siguiente figura 3

La reducción univalente del O_2 produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente, genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD); el H_2O_2 no es un radical libre, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton y forma el radical hidroxilo ($\cdot OH$) que es varios miles de veces más reactivo que el $O_2^{\bullet-}$ y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres (Díaz. 2002).

Se ha estimado que una célula humana está expuesta aproximadamente a 1.5×10^5 oxidaciones por día del radical hidroxilo y de otros radicales libres. El radical hidroxilo es conocido por reaccionar con todos los componentes de la molécula de DNA: daña tanto las bases purina y pirimidina, así como la desoxirribosa. La permanente modificación del material genético resultante del daño oxidante representa el primer paso en el proceso de mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento (Valko *et al.*, 2006).

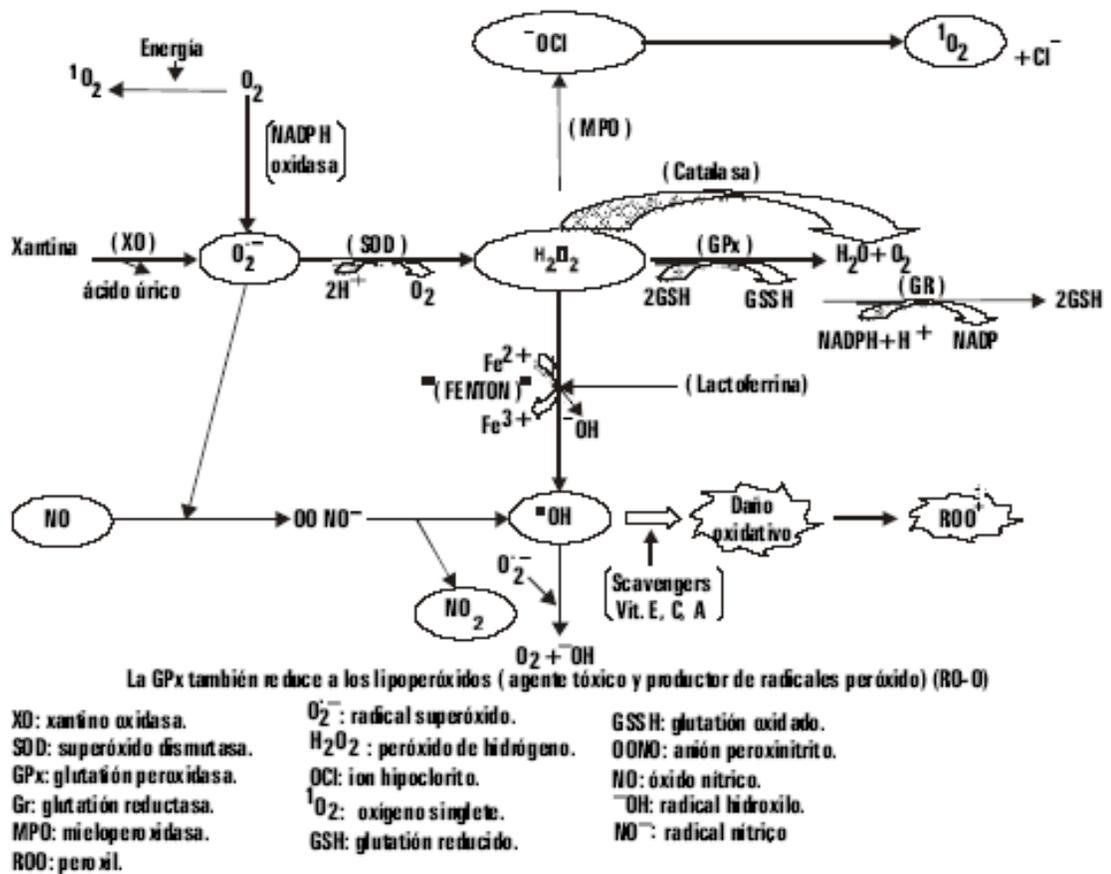


Figura 3. Representación metabólica de los ROS (Tomado de Diaz, 2002).

1.2.3 Respuesta celular

El desarrollo de un tumor representa un desbalance entre la proliferación celular y la apoptosis, utilizada para eliminar las células dañadas o las células precancerosas. A pesar de su papel en la promoción de procesos anormales de proliferación y tumorigénesis, los ROS pueden promover la apoptosis y en este caso ayudan a prevenir la proliferación y la propagación de las células transformadas, ya que, como parte de su proliferación anormal, las células cancerosas necesitan



evadir la apoptosis normalmente desencadenada por los altos niveles de estrés oxidante y daño celular (Seifreid *et al.*, 2007).

1.2.4 Efectos nocivos de los ROS

El daño celular producido por las ROS ocurre sobre diferentes macromoléculas:

1. *Lípidos*. Es donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, y altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica representa una forma de daño que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo cual son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidante iniciado por los radicales libres del oxígeno (Reylli y Burkley 1990).

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador.
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana y su accesibilidad.
- La tensión del oxígeno.
- La presencia de hierro libre.
- El contenido celular de antioxidantes (glutación, betacarotenos, etc.)
- La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutación peroxidasa (GSH-Prx)

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que llevan a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Díaz, 2002).



2. *Proteínas*. Existe oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, etc. Además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilo.

3. *DNA*. Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, oxidación de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables DNA-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación del DNA que activa genes.

El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida) de algunos oncogenes y/o antioncogenes que pueden conducir a la iniciación de carcinogénesis (Díaz, 2002).

Los genes alterados pueden ser modificados por un simple cambio en una base de la secuencia del DNA (Roche, 1994).

1.2.5 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es definida por A.L. Tappel como el deterioro oxidante de los lípidos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces carbono-carbono, contenidos en la mayoría de las membranas de las células y organelos. Los principales constituyentes de las membranas biológicas son los lípidos y las proteínas (Halliwell y Gutteidge. 2007).

Históricamente el interés toxicológico centrado en la peroxidación lipídica significa la pérdida de la función de la membrana que es visible en etapas avanzadas. Altas dosis de prooxidantes tóxicos como el tetracloruro de carbono o el paraquat fueron frecuentemente usados en experimentos a menudo diseñados para determinar si la aparición de la peroxidación lipídica causalmente precedió a la pérdida irreversible de la viabilidad o si simplemente se produjo en las células necróticas (Burcham y Kuhan, 1998).



La peroxidación lipídica puede ocurrir bajo control enzimático o no enzimático; esta última forma es la que se relaciona con el estrés oxidante y daño celular (Romero *et al.*, 1998).

La peroxidación lipídica es particularmente destructiva, ya que se desarrolla como una reacción en cadena autopropagante. Se inicia cuando las especies reactivas de oxígeno atacan un ácido graso poliinsaturado, quitándole un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical libre acil-ácido graso; inmediatamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical libre peroxilo ácido graso que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros ácidos grasos poliinsaturados e inicia nuevas reacciones (figura 4) (Burcham y Kuhan 1996: Esterbauer *et al.*, 1982).

Los productos finales de la peroxidación lipídica son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxinonenal (4-HNE) y malondialdehído, aunque se ha comprobado que este último posee una baja toxicidad (Chihuailaf *et al.*, 2001).

El daño celular inducido por ROS depende de los sitios de formación; la compartimentalización es crucial para la viabilidad de la célula, el daño a las estructuras de la membrana usualmente son blancos en la iniciación de la muerte celular. Los ROS dañan a la membrana de dos formas:

- Directamente: por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en los lípidos.
- Indirectamente: con la inhibición de la síntesis de los lípidos, desnaturalización de los ácidos grasos ó la activación de lipasas.

La peroxidación lipídica se divide en:

- La generación de radicales libres como el HO[•] y H₂O₂ y subsecuentemente la extracción del hidrógeno de la biomolécula (iniciación).
- Cambio del radical (propagación)
- Terminación (Goetz *et al.*, 2008)



La fase de iniciación ocurre cuando se abstrae un átomo de hidrógeno del enlace C-H del lípido generando un radical en el carbono central del lípido. Esto es más complicado en la fase de propagación en donde el radical lípido sufre un rápido acoplamiento con el O_2 generando el radical peroxil.

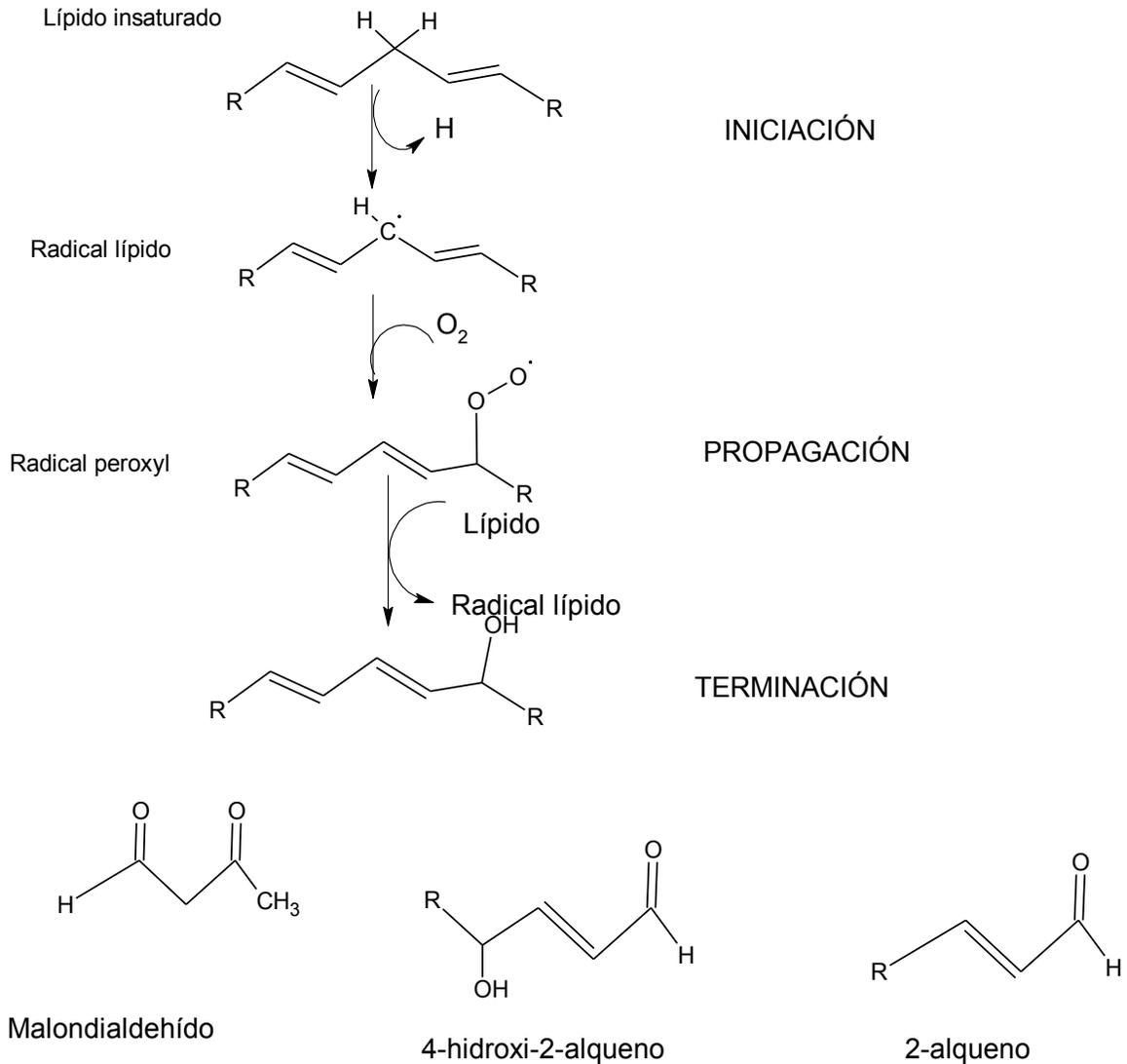


Figura 4. Fases de la peroxidación lipídica (Burcham y Kuhan 1996)



Los lípidos son una buena fuente de energía para el cuerpo, están presentes en la membrana celular y en tejidos, pero los lípidos son fácilmente peroxidados por radicales libres y el malondialdehído es utilizado para estimar el daño lipídico durante la peroxidación lipídica. De los productos de peroxidación presentados se sabe que el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal forman aductos con el DNA. Esta es una evidencia de que los lípidos pueden estar implicados en carcinogénesis.

En recientes estudios, se caracterizaron cambios en la composición de ácidos grasos o lípidos del plasma en pacientes con tumores malignos, por resonancia magnética nuclear y por cromatografía.

1.3 Biomarcadores

Los biomarcadores son definidos como la alteración celular, bioquímica o molecular de especies biológicas en fluidos, células o tejidos y han sido desarrollados y aplicados en la investigación sobre el cáncer, así como en la evaluación de riesgo (Kwack *et al.*, 2000). Los biomarcadores se clasifican de la siguiente manera:

Biomarcadores de exposición

La presencia de un xenobiótico o de sus metabolitos, así como el producto de una interacción entre un xenobiótico y una diana molecular o celular medido en un compartimento de un organismo, se consideran biomarcadores de exposición. En general los biomarcadores de exposición se utilizan para estimar la dosis recibida por un individuo (Bonassi *et al.*, 2001).

Biomarcadores de efecto

Los biomarcadores de efecto se definen como las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, conductuales o de otro tipo que sufre un organismo y que, dependiendo de su magnitud, se identifican como un trastorno de la salud o una enfermedad potencial o definida.



Hay biomarcadores más inespecíficos que también están validados, pero tienen aplicaciones más extensas y suelen responder a clases químicas más amplias. Para poder vincular el agente etiológico con el efecto adverso, es necesario añadir otros biomarcadores o bien analizar los residuos químicos (Bonassi y William, 2002).

Biomarcadores de susceptibilidad

Los biomarcadores de susceptibilidad son criterios de valoración indicativos de una alteración bioquímica o fisiológica que puede predisponer al individuo a los efectos de los agentes químicos, físicos e infecciosos. Estos biomarcadores resultan de gran utilidad para extrapolar los estados patológicos humanos a partir de modelos animales (Klaassen y Watkins., 2005), sin embargo; existen diferentes formas de exposición a algún genotóxico, éstas pueden ser: ocupacional, medicinal, por la forma de vida, accidental o ambiental. Los biomarcadores pueden ser utilizados como punto final en la evaluación de los efectos tóxicos debidos a la exposición a un xenobiótico (Schoket *et al.*, 1999). Los biomarcadores se utilizan para:

- detectar la presencia de una exposición,
- determinar las consecuencias biológicas de la exposición,
- detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico,
- identificar a los individuos sensibles de una población,
- fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Los biomarcadores más útiles son los que se pueden obtener en forma menos invasiva para el donador, por eso es que se prefieren los que se encuentran en sangre (Kopplin, 2001).

1.4 Estudios de genotoxicidad

Los estudios de genotoxicidad constituyen un paso importante para la evaluación del potencial tóxico de diferentes contaminantes. La alteración mutagénica del DNA es el evento de iniciación en carcinogénesis causado por diferentes factores que provocan mutaciones a nivel del genoma que pueden afectar la expresión y/o función de un gen importante en el ciclo celular llevando a un crecimiento irregular típico en las células cancerosas. El daño al DNA puede presentarse tanto por



acción de metabolitos de un compuesto tóxico o por la interacción entre ROS o especies reactivas de nitrógeno (RNS) generados durante la bioactivación de esos compuestos (ver CYP2E1 en otro apartado), con las bases del ácido nucleico (Seifried *et al.*, 2007).

La oxidación del DNA dependiente de ROS es sitio-específica e involucra una reacción entre DNA (normalmente con las bases), metales de transición y H₂O₂. Esta oxidación al DNA produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o bien la pérdida de expresión por el daño al gen específico, como los entrecruzamientos de proteínas-DNA, intercambio de cromátidas hermanas, alteración a la estructura de la desoxirribosa fosfato o/y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas.

La oxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena sencilla en las hebras de DNA, lo que puede llevar a la formación de daño citogenético como rompimientos de DNA, intercambio de cromátidas hermanas, las aberraciones cromosómicas o micronúcleos (Ramos *et al.*, 2006).

1.5 Micronucleos (MN)

El sistema de estudio de MN en linfocitos de sangre periférica es un modelo que permite estimar el daño que pudiera ocurrir en tejidos internos a causa de la exposición a sustancias químicas, que se sabe que producen rompimiento o mala segregación de los cromosomas. Por esta razón se consideran biomarcadores, pues la frecuencia espontánea con que ocurren normalmente en los tejidos es muy baja (Montero *et al.*, 2006).

Durante la división celular el material genético (DNA) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a alteraciones durante la replicación y posterior división del DNA, a rompimientos cromosómicos y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado MN. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que



quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica (Zalacain *et al.*, 2005).

El sistema de MN permite la identificación de otros biomarcadores relacionados, productos de daño a cromosomas, como las gemaciones de cromatina y los puentes nucleoplásmicos, que se han asociado con la inestabilidad cromosómica característica del cáncer. Un ejemplo de esto es el estudio que se realizó en el estado de Tlaxcala donde se observó que la población que reside en las comunidades más cercanas a ríos contaminados tienen una mayor frecuencia de daño genotóxico presente en forma de MN, puentes nucleoplásmicos y gemaciones de cromatina (Montero *et al.* 2006).

1.6 Aductos

Los aductos de DNA son enlaces covalentes que se producen cuando las especies químicas electrofílicas atacan sitios nucleofílicos del DNA (Lyons *et al.*, 1999). La guanina es la base que tiene mayor posibilidad de ser atacada por aductos (Poirier *et al.*, 2000).

Los aductos de DNA formados por fuentes endógenas son generalmente considerados como puntos finales de una reacción; en un monitoreo su formación puede proveer información acerca de una exposición genómica a daño oxidante (Charls *et al.*, 2008). Existen pruebas de que los aductos pueden ser responsables de mutaciones específicas en ciertos genes del cáncer como *ras* y *p53*, y que algunos aductos pueden formarse preferentemente en ciertas regiones lábiles del gen. El papel de los aductos en la apoptosis, en la mutagénesis y en la carcinogénesis no se ha entendido claramente, aunque se cree que su aparición y persistencia en el DNA son críticos para el mecanismo de esos procesos (Bo Hang, 2004).



1.6.6 Malondialdehído

En términos cuantitativos el malondialdehído (MDA) es el principal compuesto carbonil producido durante la peroxidación lipídica, que es generado a partir de la mayoría de los ácidos grasos que poseen más de dos enlaces insaturados, aunque también es formado durante la biosíntesis de prostaglandinas. Además de que reacciona con el DNA formando aductos con desoxiguanosina (dG), desoxiadenosina (dA) y desoxicitidina (dC) (Knutson *et al.*, 2008).

Varios estudios han aportado evidencia de que el MDA es importante en toxicología genética. En los estudios iniciales de mutagenicidad fueron confundidos por contaminantes producidos durante ciertas reacciones, pero un trabajo confirmó que MDA es mutagénico en *S. typhimurium* (Burcham, 1998). Esto fue confirmado usando una alta purificación de MDA preparado por tres rutas independientes que contenían impurezas de oligómeros no detectables (Marnett, 2002).

Se ha demostrado en modelos de mamíferos que el MDA induce genotoxicidad incluyendo mutagenicidad en células de linfoma L5178Y de ratón (Yau, 1979), fragmentación de cromosomas y formación de micronúcleos en fibroblastos de piel de rata (Bird *et al.*, 1982), rompimiento de cadena sencilla e intercambio de cromátidas hermanas (Brambilla *et al.*, 1985).

En relación con sus propiedades químicas, se ha encontrado que aunque la reactividad del MDA es máxima bajo condiciones ácidas, esto puede no ocurrir en condiciones biológicas, sin embargo, el MDA tiene la capacidad de ser electrofílico a pH neutral (es decir posee la característica de aceptar electrones de sitios nucleofílicos como el DNA) para generar aductos con las bases nucleicas. Siu y Draper (1982) en un estudio in vivo examinaron el metabolismo y excreción del MDA sugiriendolo como biomarcador de peroxidación lipídica y demostraron que del 9 al 17% es excretado en orina.



1.6.2 Malondialdehído- deoxiguanosina M1dG

El M1dG es una lesión premutagénica y puede inducir transversiones de guanina a timina y transiciones de guanina a adenina.

M1dG fue originalmente detectado en DNA de hígado de individuos saludables con niveles de 5 – 11 aductos por 10^7 del total de bases; se ha detectado en diferentes tejidos quedando en un rango de 0.02 a 21 por 10^7 aductos por bases normales. M1dG es formado después de un ataque oxidante directo al DNA (Leuratti *et al.*, 2002).

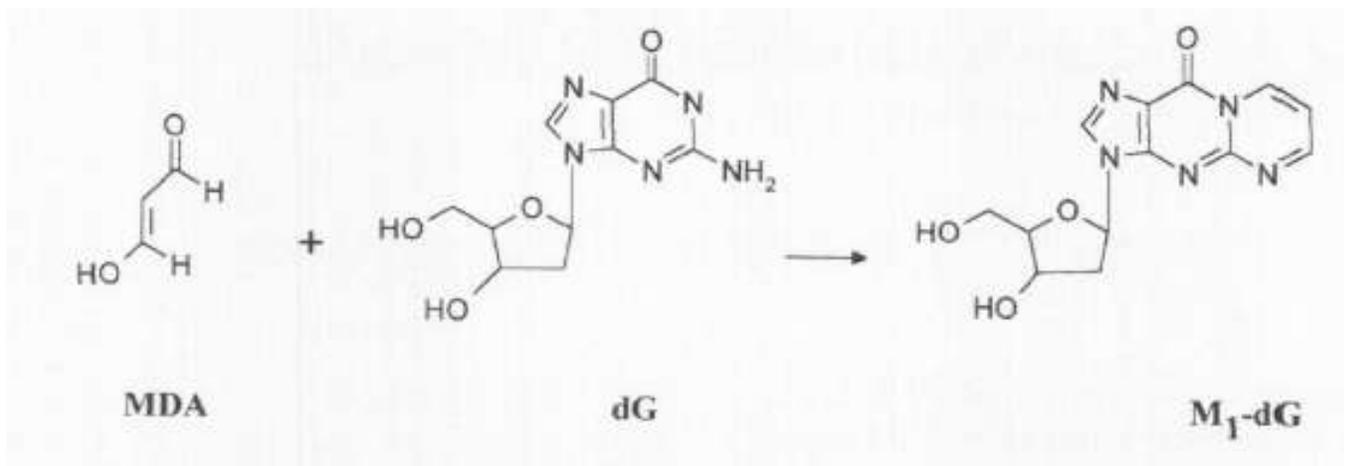


Figura. 5. Aductos de M1dG es formado con el DNA en la unión de malondialdehído con deoxiguanosina (Leuratti 1998).

II. Lugar de estudio

El Estado de Tlaxcala presenta una transición de las actividades rurales a las actividades industriales. El asentamiento de corredores industriales en medio de una zona poco urbanizada y en donde los sistemas de alcantarillado no están separados de los sistemas municipales de las comunidades ha generado un deterioro ambiental importante en el aire y en las aguas de los Ríos Atoyac y Xochiac que corren a lo largo de la zona. Se han encontrado sustancias químicas como cloroformo, cloruro de metileno, índigo, anilina y tolueno, producto de las descargas de las industrias y pequeñas lavanderías o maquiladoras de mezclilla situadas a lo largo de ambos ríos, así como aceites y grasa, además de los residuos orgánicos de origen doméstico (Cuadro II).

Cuadro II. Compuestos Orgánicos Volátiles encontrados en el Río Atoyac (Norma Ambiental)

Agente químico	Características	¿Es un carcinógeno humano?	Norma ambiental
Cloruro de metileno	No se encuentra de forma natural. Se emplea como disolvente industrial, removedor de pintura y como loción limpiadora de metal. Se evapora fácilmente en el aire y su tiempo de vida media es de 127 días.	Probablemente carcinógeno en humanos (IARC, grupo 2B)	No existe una norma.
Cloroformo	Se usa en la producción de otros compuestos y puede formarse durante el tratamiento de agua con cloro. Se evapora fácilmente en el aire donde permanece durante mucho tiempo. Se filtra al aire subterráneo.	Probablemente carcinógeno en humanos (IARC, grupo 2B)	No existe una norma.
Tolueno	Es uno de los componentes de aceites y gasolinas. Se usa ampliamente en la producción de pinturas, lacas, adhesivos y caucho. Se filtra al agua subterránea.	No, sólo es neurotóxico y neurotóxico (IARC, gpo. 3)	No existe una norma.
Índigo y anilina	Tintes naturales y sintéticos. El vapor de anilina es más pesado que el aire por lo que puede acumularse en áreas bajas. El vapor es combustible. La anilina tiene un olor característico aromático a pescado que proporciona una buena advertencia de exposición aguda. La anilina se absorbe rápidamente después de la inhalación e ingestión. La anilina líquida y en vapor es absorbida también a través de la piel, lo que contribuye a una toxicidad sistémica.	La anilina es considerada como un probable carcinógeno en humanos (IARC, grupo 3)	No existe una norma.

Con relación al cuadro II, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) que depende de la organización mundial de la salud, es el organismo responsable de realizar y coordinar los trabajos de investigación sobre las causas del cáncer en seres humanos, los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo de la enfermedad y la formulación de estrategias científicas para su control. Esta agencia publica periódicamente monografías sobre sustancias o procesos industriales concretos, que pueden ser de utilidad en el proceso de evaluación de riesgo.

Existen distintos procedimientos para la clasificación de los compuestos químicos en función de su capacidad para producir cáncer en seres humanos, basados en el uso conjunto de datos epidemiológicos y ensayos en animales.

Cuadro III. Criterios de la IARC para la clasificación de los compuestos cancerígenos.

Grupo	Evidencia	Ejemplo
1. Agente cancerígeno	Suficiente (personas)	Arsénico, aflatoxina B
2A Probablemente cancerígeno	Limitada (personas) Suficiente (animales)	Formaldehído, tricloroetileno, tetracloroetileno
2B Posiblemente cancerígeno	Limitada o inadecuada (personas) Suficiente (animales)	Tetracloruro de carbono, cloroformo, gasolina
3. No clasificable en cuanto a sus efectos cancerígenos	Inadecuada (personas) Inadecuada (animales)	Mercurio y sus compuestos inorgánicos, tolueno
4. Probablemente no cancerígeno	Ausencia de actividad cancerígena en personas y animales	Caprolactam

Habitantes de poblaciones que se distribuyen a lo largo de los ríos Xochiac y Atoyac, han denunciado la presencia de olores y aire irritantes que afectan los ojos, la garganta y causan dolor de cabeza, y se ha registrado la aparición de enfermedades como anemia, púrpura trombocitopénica y leucemia que los pobladores atribuyen a la contaminación de los ríos, la cual se observa por las manifestaciones del color azul, rojo o negro del agua y de los olores penetrantes por tiempos prolongados y de forma cotidiana.

Al mismo tiempo, algunas personas que habitan la región trabajan en las industrias establecidas en la zona, que incluyen una planta petroquímica y numerosas industrias maquiladoras de mezclilla. Las condiciones laborales dentro de algunas de estas industrias constituyen una exposición de riesgo para la salud, sobre todo en la industria textil, ya que los trabajadores no cuentan con un equipo de protección o de ventilación adecuados y se encuentran expuestos a pelusa de algodón y otras fibras, vapores de numerosos agentes tóxicos, sustancias cloradas, hidróxido de sodio, índigo, anilina y altas temperaturas.

En el caso de la petroquímica, aún cuando los trabajadores cuentan con un equipo de protección y atención médica, se produce metanol, además de que la planta maneja sustancias químicas tóxicas como el tolueno y el benceno, éste último un carcinógeno reconocido, y los trabajadores se quejan de vapores y toxinas que causan malestares y en ocasiones intoxicaciones agudas (Morales *et al.*, 2004).

Por otra parte, la agricultura aún se practica en estas poblaciones y los agricultores utilizan plaguicidas algunos de los cuales se consideran peligrosos como el paraquat y el 2,4-D, siendo ambos clastogénicos y el primero de ellos, clasificado como carcinógeno. Los trabajadores solo emplean los plaguicidas por temporada, una o dos veces al año y se protegen usando guantes y botas, pero no máscaras; además, simultáneamente están expuestos al sol y a los canales de riego que llevan agua de los ríos Atoyac y Xochiac (Morales, 2004; Montero *et al.*, 2006).

A la población estudiada se les aplicó un cuestionario que estuvo orientado a identificar los factores que pudieran representar una fuente de peligro a la salud. De los 152 hombres y 153 mujeres incluidos en el estudio inicial, en un rango de edad de 17 a 86 años, el 23.7 % tienen el hábito de fumar de 1 a 10 cigarros al día, 26% tienen el hábito de ingerir alcohol frecuentemente y únicamente el 4% ingiere drogas.

Con respecto a problemas de salud como enfermedades crónicas 57 % de la población encuestada mencionó haber padecido alguna enfermedad crónica, de los cuales el 47% hombres y 53% mujeres; las principales enfermedades mencionadas fueron: gastritis y problemas digestivos, ansiedad, presión alta, alergias en la piel, problemas renales y enfermedades vasculares fueron las mas frecuentes.

Con respecto a las alergias en la piel se encontraron con mayor frecuencia en trabajadores de la industria, agricultura y lavandería (18 – 27%) comparados con las amas de casa y empleados de oficina (10 – 14%) sin embargo no se encontró una diferencia significativa.

Se han registrado 8 enfermedades distintas, de ellas se puede realizar una agrupación inicial de anemia, púrpura trombocitopénica y leucemia, por otra parte se han registrado enfermedades como: asma, sangrado nasal, leucopenia, hidrocefalia, dolores agudos en la cabeza y otros tipos de cáncer.

De los 45 casos registrados de daños a la salud, 24 de ellos son de personas menores de 20 años, la mayor frecuencia se presenta en el grupo de edad entre los 11 y los 15 años. Uno de los aspectos principales de este grupo de personas con casos de daños a la salud, es que en ellos se registran 11 de los 16 casos de leucemia; asimismo en ellos se presentan los dos casos de leucopenia y la mitad de los casos de anemia, púrpura trombocitopénica y asma.

Entre los grupos de edad en adultos, se presentan 11 casos entre adultos jóvenes de entre los 21 y 35 años, con 4 casos de anemia, 4 de púrpura y 1 de leucemia.

Entre los 41 y los 50 años se han presentado tres casos, uno de púrpura y uno de anemia que empezaron a presentar la enfermedad cuando ambos tenían cuarenta años y dos casos de asma.

Respecto a los años en que se han presentado las diversas enfermedades, éstas se pueden considerar como un proceso reciente, en tanto el primero de los casos históricamente registrado se presentó en 1987, a partir de este momento los casos se presentan con irregularidad desde 1989 hasta 1994; es a partir de 1996 cuando estas enfermedades se presentan dentro de un proceso de regularidad con uno o dos casos anuales en la aparición de los casos, registrándose 11 casos en ese año principalmente de leucemia y anemia; para iniciar un decremento a partir de 2001. En un esfuerzo por establecer las incidencias de cáncer infantil en México, Fajardo et al.,2007 mostraron que los estados de Puebla, Chiapas y Guerrero son los que presentan incidencias más elevadas de leucemia y linfoma en niños, con valores que van de 60.2 a 74.2 /millón de niños/año. En Estados Unidos esta incidencia se ha calculado en 48/millón de niños/año. El Estado de Tlaxcala no estuvo incluido en el estudio pues no contaba con hospitales de especialidad que pudieran proporcionar esa información; actualmente está el Hospital de Pediatría el cual aún no cuenta con estudios confiables sobre la incidencia de estas enfermedades en el estado.

I. Planteamiento del estudio

El proceso de urbanización e industrialización en el poniente del Estado de Tlaxcala y los municipios de San Martín Texmelucan y Huejotzingo en el estado de Puebla se inició con la instalación del complejo Petroquímico Independencia y el Corredor Industrial Quetzalcoatl y, a partir del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) en 1994, la región se convirtió en una zona de instalación de maquila para los mercados nacionales e internacionales.

Se inició con ello un cambio en la especialización económica de la región, con énfasis en la industria de manufactura intradomiciliaria del vestido donde la demanda del agua, anteriormente usada sólo para el riego y requerimientos domésticos, y el deterioro de los recursos por una alta contaminación química representa un gran peligro para la salud de las comunidades. Cloroformo, cloruro de metileno, índigo, anilina y tolueno son algunos de los contaminantes químicos encontrados en los ríos Xochiac y Atoyac, mezclados con otros contaminantes como lodos orgánicos y grasas de origen industrial y una gran adición de materiales orgánicos de desecho provenientes de las casas (Navarro *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2006).

Se realizó un estudio con habitantes de esta zona, utilizando como biomarcador de efecto la prueba de micronúcleos, encontrando que la gente que vive más cercana al curso de estos ríos, Atoyac y Xochiac, presentan un mayor daño genotóxico (Montero *et al.*, 2006) en comparación con personas que viven en comunidades más alejadas.

Dos polimorfismos metabólicos fueron estudiados para determinar si esta población podría ser más susceptible de daño al DNA por predisposición genética; se utilizaron dos enzimas de la familia glutatión-S-transferasa que se ha descrito que participan en el metabolismo de compuestos orgánicos volátiles aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) llamadas glutatión transferasa mu 1 (GSTM1) y theta 1 (GSTT1) (Montero *et al.*, 2006)

El polimorfismo de *GSTM1 nulo* no mostró una relación con la susceptibilidad de daño genotóxico. La actividad de la enzima GSTT1 está relacionada con la activación de procancerígenos exógenos como pequeños compuestos halogenados que contribuyen a la respuesta inflamatoria de la mucosa esofágica, que es un factor de riesgo de adenocarcinoma en tracto respiratorio (Beddowes *et al.*, 2003). La presencia de la enzima en los individuos estudiados podría significar que ellos son más susceptibles a los efectos de la exposición a trihalometanos como el cloroformo y probablemente, al cloruro de metileno (Montero *et al.*, 2006).

En el año de 1954, Rebeca Gershman sugirió por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos generadores de enfermedades, debido a la alta inestabilidad atómica de los mismos. Los radicales libres al colisionar con una macromolécula, la oxidan al sustraerle un e^- lo que provoca que pierda su función específica en la célula. Dicho daño puede causar oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos, lo que produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial y apoptosis. (Ramos *et al.*, 2006)

La producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) puede generar la peroxidación de lípidos, principalmente de cadenas poliinsaturadas, que a su vez pueden conducir a la formación de compuestos intermediarios y/o finales altamente reactivos, entre ellos el malondialdehído (MDA) el cual es el producto final de este proceso (Chihuaif y cols., 2001). Aductos de M1dG, por lo tanto, están siendo analizadas en seres humanos y en modelos animales como biomarcadores de exposición a agentes químicos cancerígenos, cuyo mecanismo de acción incluye la inducción de estrés oxidante (Weber-Lotfi *et al.*, 2005).

Los factores ambientales y la susceptibilidad individual juegan un papel importante en algunos tipos de cáncer humanos. La formación de aductos de DNA es un evento crítico en mutagénesis y en la iniciación de carcinogénesis (Poirier *et al.*, 2000), de ahí la importancia de determinar si ciertas condiciones de exposición ocupacional o ambiental causan un incremento en este tipo de daño.

I. HIPOTESIS

Los habitantes de las comunidades cercanas a los cursos de los ríos Atoyac y Xochiac presentarán un incremento de aductos de malondialdehído en su DNA, de la misma manera que presentaron mayor daño genotóxico en forma de micronúcleos.

I. OBJETIVOS

General

Evaluar los niveles de aductos de malondialdehído-desoxiguanosina (M1dG) en una población de residentes de un área agrícola- industrial y analizarlos en relación con factores ambientales y personales.

Particulares

- Estandarizar la técnica de inmunopunto para la evaluación de aductos de M1dG.
- Extraer DNA de las muestras de los donadores.
- Analizar, mediante un modelo lineal generalizado, los factores que pueden influir en los niveles de aductos de MDA, tales como edad, hábito de fumar, género y polimorfismos metabólicos.



VI MATERIAL Y MÉTODOS:

Protocolo para la detección de aductos de M₁-dG por la técnica de Inmunopunto(IDB)

Características de los donadores

Los donadores fueron seleccionados de un grupo de personas que respondieron un cuestionario aplicado en nueve comunidades establecidas a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac en el estado de Tlaxcala y distribuidas en tres regiones:

Región 1.- Poblados situados a la orilla del río Atoyac, donde la planta petroquímica descarga sus desechos.

Región 2.- Los poblados que se encuentran río abajo, ubicados en las descargas de la industria textil, dos de las cuales están próximas a tres descargas de la planta petroquímica y otra a la industria textil (lavandería)

Región 3.- Está constituida por dos poblados alejados de los ríos, su sistema de aguas residuales no está conectado con el mismo sistema de las otras comunidades (Anexo 1).

Las características de inclusión fueron: el rango de edad entre los 19 y 80 años, no presentar diabetes, cáncer o infecciones parasitarias y no tener antecedentes de familiares con cáncer. Se dividieron en diferentes grupos:

Grupo 1 incluye maestros, estudiantes, amas de casa, comerciantes.

Grupo 2 agricultores

Grupo 3 trabajadores de la industria (planta petroquímica, lavanderías, otras industrias como la de producción de adhesivos)

Grupo de referencia que incluye residentes del D.F., fueron seleccionados bajo los mismos criterios de los individuos del área.

Extracción de DNA

De cada individuo se emplearon 500 µl de sangre periférica para extraer el DNA utilizando un kit de BIO-RAD aqua pure genomic DNA. Anexo (4)



Reactivos

- Estándar de DNA con aductos dG₁-MDA (2 pmol/μg DNA).
- DNA de timo de ternera (marca Sigma).
- Agua Ultra Pura libre de DNA y RNA (Gibco BRL).
- Soluciones 1M y 2M de acetato de amonio.
- Solución PBS
- Solución PBS – tween (0.1%)
- Solución PBS – tween (0.1%) – Leche (0.5% ; Bio-Rad)
- Solución reveladora (kodak professional dektol).
- Fijador (Kodak Professional rapid fixer with hardener).
- Anti-M1-dG monoclonal D10A1 (0.3 mg/mL).
- Anti Mouse IgG conjugado con horseradish peroxidase (Pierce).
- Kit de luminol (Pierce).

Procedimiento

➤ Curva estándar

1. Encender el horno al vacío y dejar calentar hasta una temperatura de 80 °C.
2. Descongelar las muestras de DNA, en recipiente con hielo nuevo.
3. Esterilizar el cuarto de cultivo con el manifold desarmado, 2 pinzas planas, tubos eppendorf a usar, 2 recipientes para contener los tubos, micropipetas (1mL, 100μL, 10μL), las puntas a emplear, vórtex, pyrex, H₂O ultrapura, membrana, tijeras y sanitas; en el U.V. por 15 min.
4. Encender baño María a su máxima potencia (94°C).
5. Rompimiento de DNA y armado del manifold:
Una vez que todas las muestras están descongeladas se procede de la siguiente manera:
Tubo 1: 50μL de DNA std + 50μL de DNA TT
Tubo 2: 350μL de DNA TT
Sonicar a una amplitud de 5 durante 2x15seg.
6. Desnaturalización del DNA:



Después de la sonicación, agitar los tubos 1 y 2 durante 30 segundos en el vórtex y meter a baño María a su máxima potencia (94°C) por 5 min.

Sacar los tubos y colocarlos rápidamente en hielo por 10 min

Del tubo 1 tomar 70 μ L y adicionar 70 μ L de acetato de amonio 2M frío y agitar en el vórtex por 30 seg.

7. Mientras pasan los 10 min de baño maría y los 10 min de enfriamiento en hielo, recortar la membrana de nitrocelulosa y limpiar el Manifold con alcohol.

Colocar la membrana y un filtro soporte con cuidado en acetato de amonio 1 M a manera de que floten y dejarlos así por 10 min y al término de este tiempo, hundirlos.

Armar el manifold de la siguiente manera:

- Poner la parte superior al revés y colocar la membrana teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire.

- colocar el papel filtro húmedo y no dejar burbujas de aire.
- colocar el empaque del manifold
- colocar la parte inferior del manifold
- voltear todo el dispositivo y apretar bien, sin trasroscar.

8. Cerrar el Manifold y colocar en cada pozo 20 μ L de acetato de amonio 2 M y encender el vacío a potencia media. Evitar utilizar los pozos tapados y cerrar el vacío una vez que el acetato de amonio sea filtrado.

9. Filtración de muestras en membrana de nitrocelulosa con el manifold:

Para la curva patrón se realizaron diluciones 1:2 de DNA estándar con DNA de timo de ternera (10 - 0.039 fmol/ μ g DNA). El control negativo está conformado por 1 μ g de DNA de timo de ternera. Para el caso de las muestras de los individuos estudiados se colocó 1 μ g de DNA por punto.

10. Después abrir el manifold y sacar la membrana con cuidado, dejarla secar sobre el segundo filtro 3 MM.

11. Fijación de DNA a la membrana de nitrocelulosa.

Colocar la membrana ya seca en un filtro whatman y colocarla dentro del horno al vacío a 80°C durante 90min.



12. Bloqueo con solución PBS – tween (0.1%) – leche (0.5%) dos veces por 10min cada una a T ambiente

13. Primera Incubación.

Preparar el primer anticuerpo: La membrana se incubó con 1AC en una concentración 1:48000 diluido en solución PBS – tween (0.1%) – leche (0.5%) toda la noche a 4° C. Al terminar, hacer lavados con PBS-tween (0.1%); 1 x 1 min y 2 x 5 minutos.

14. Segunda incubación.

Se escurre la membrana del lavado y se le adiciona el segundo anticuerpo con una concentración 1:4000 diluido en solución PBS – tween (0.1%) – leche (0.5%) . Se deja 2 hrs de incubación a temperatura ambiente.

15. Lavados con PBS-tween (0.1%); 1 x 1 min y 2 x 5 minutos

16. Revelado:

El material para el cuarto oscuro es el siguiente: película fotográfica, tijeras, fijador, revelador, puntas de 1mL, micropipeta de 1mL, sanitas, 3 recipientes de plástico, pizeta con alcohol, kit de revelado, lámpara luz roja, pinzas, cassette para revelado.

FASE OSCURA:

- recortar película.
- preparar luminol 1:1 (500 µl de tubo blanco y 500 µl de tubo oscuro).
- incubar en la solución con luminol por 5 min.
- dejar 1 minuto de escurrimiento usando papel absorbente.
- colocar la membrana en un plástico transparente en un cassette de exposición donde se ha colocado la película y cubrir con otro plástico transparente.
- sumergir en revelador 3min, después enjuagar 1min en agua y sumergir en fijador 3min. Enjuagar en agua hasta quitar exceso de sales.



Análisis de MN

El análisis de micronúcleos se llevó a cabo previamente y fueron reportados en Montero et al. (2006); los datos se tomaron para buscar la correlación con los niveles de aductos de M1dG estudiados. La técnica empleada para la identificación de MN se presenta en el anexo (2).

Análisis de polimorfismos

El análisis de polimorfismos de GSTT1, GSTM1 se llevó a cabo previamente y fueron reportados en Montero et al. (2006); para el caso de CYP2E1 y CYP1A1 de igual forma se llevó a cabo previamente por la Bióloga Karen Suarez Larios. Las técnicas empleadas se presentan en el anexo 3.

Análisis estadísticos:

Se cuantificó la concentración de aductos de M1dG en una población de 63 individuos de tres comunidades del Estado de Tlaxcala y del D.F, la cual está bien caracterizada en cuanto al índice de masa corporal (IMC), edad, género, región, actividad laboral, y polimorfismos NQO1, GSTT1 y GSTM1.

La concentración de aductos en las muestras se estimó a partir de la función de la Curva Patrón de luminiscencia. Debido a que los datos de la concentración de aductos no tienen una distribución normal, se aplicó una transformación Log Normal (LogN). Por la naturaleza de los datos y los factores asociados a éstos, se aplicó un modelo multifactorial o Modelo Lineal Generalizado (software R), éste permite el manejo de más de tres factores y sus interacciones, que pudieran tener una asociación con la distribución de aductos en la población. Mediante el principio de parsimonia el análisis partió de un modelo saturado y aplicando la prueba t de Student los factores e interacciones se eliminaron para obtener el modelo de mejor ajuste; se le aplicó una



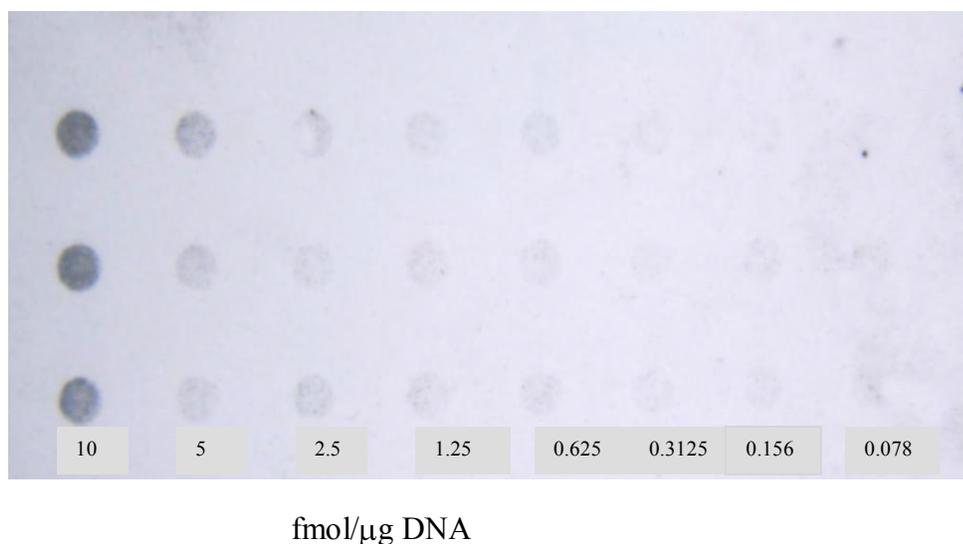
prueba de ANOVA para obtener la significancia de cada variable en el modelo final. El valor de significancia fue $\alpha= 0.05$.



VII Resultados

Estandarización del método para determinar aductos.

La concentración de aductos de M1dG fue analizada utilizando la técnica de inmunopunto en membrana de nitrocelulosa con un límite de detección de ~ 0.0390 fmol/ μ g de DNA. Se obtuvo una curva a partir de DNA estándar con una concentración conocida al cual se le hicieron diluciones 1:2 como se describe en material y métodos; la unión del anticuerpo D10A1 es proporcional a las concentraciones de aductos M1dG de cada muestra (Figura 5); y esto se comprobó haciendo una regresión lineal entre los valores de densidad óptica obtenidos con la ayuda de un analizador de imágenes y las concentraciones conocidas del aducto (Figura 6).



La figura 6 muestra una imagen del inmunopunto en donde los niveles de aductos disminuyen hacia la derecha; cada columna representa el triplicado de cada concentración de DNA estándar que contiene niveles conocidos de M1dG (10 fmol a 0.078 fmol de izquierda a derecha)

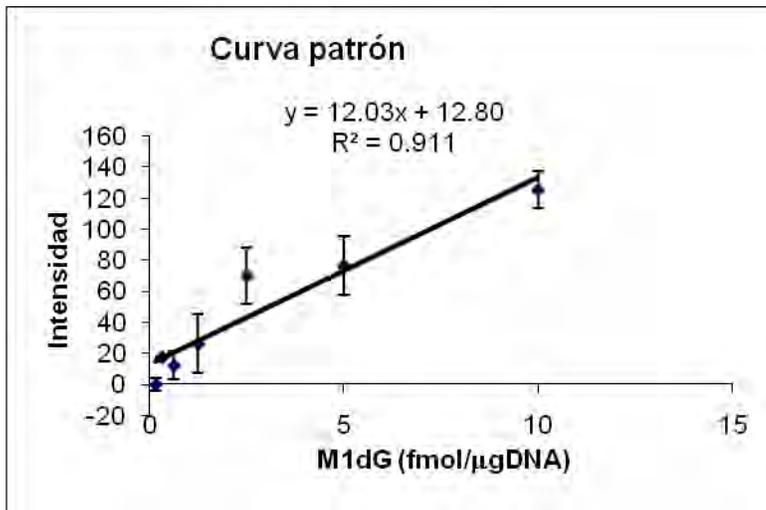


Figura 7.- La gráfica muestra una regresión lineal de los valores de densidad óptica y concentración de aductos de M1dG.

Una vez estandarizada la técnica se procesaron las muestras de los donadores, utilizando su propia curva patrón para determinar la concentración de cada una de ellas, como se observa en la figura 8.

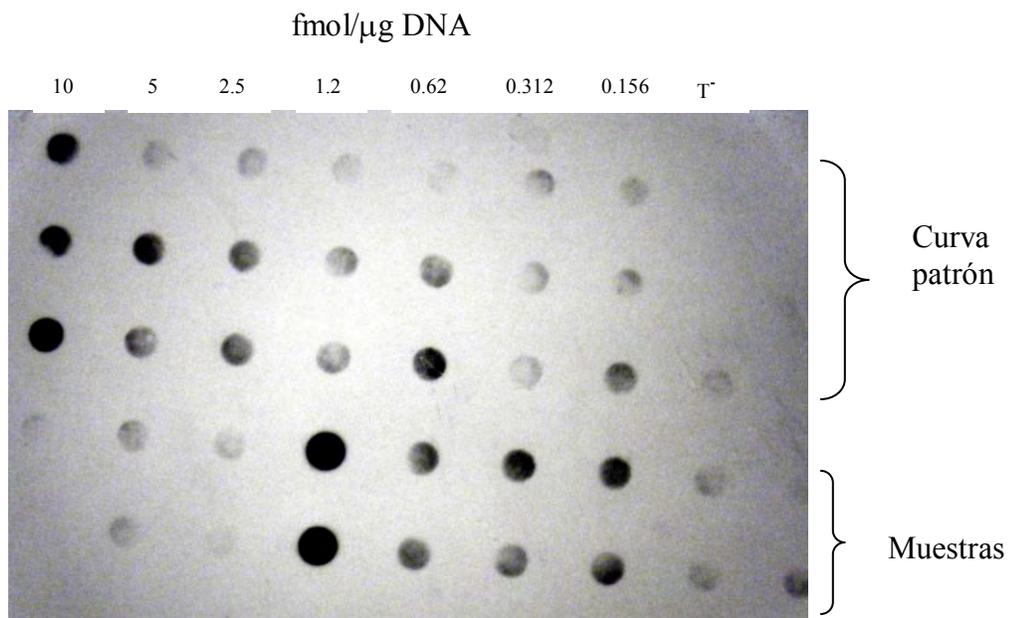




Figura 8. Imagen del inmunopunto en membrana con la curva que contiene un decremento de los niveles de M1dG (10 fmol a 0.039 fmol) y las dos hileras de abajo son muestras por duplicado de DNA de donadores del estado de Tlaxcala.

Una vez que se hizo el análisis de las muestras, se graficaron las diferentes curvas que se usaron como control con el estándar de DNA que contenía niveles conocidos de M1dG, y se analizaron para calcular los intervalos de confianza, los cuales se presentan en la figura 8; sólo dos puntos de estas curvas quedaron fuera del intervalo de confianza y todos los valores de las muestras de los donadores (mostradas como columna en el extremo derecho de la gráfica) se encuentran dentro del rango de los intervalos de confianza. (Figura 9). Son ocho curvas con el estándar en total.

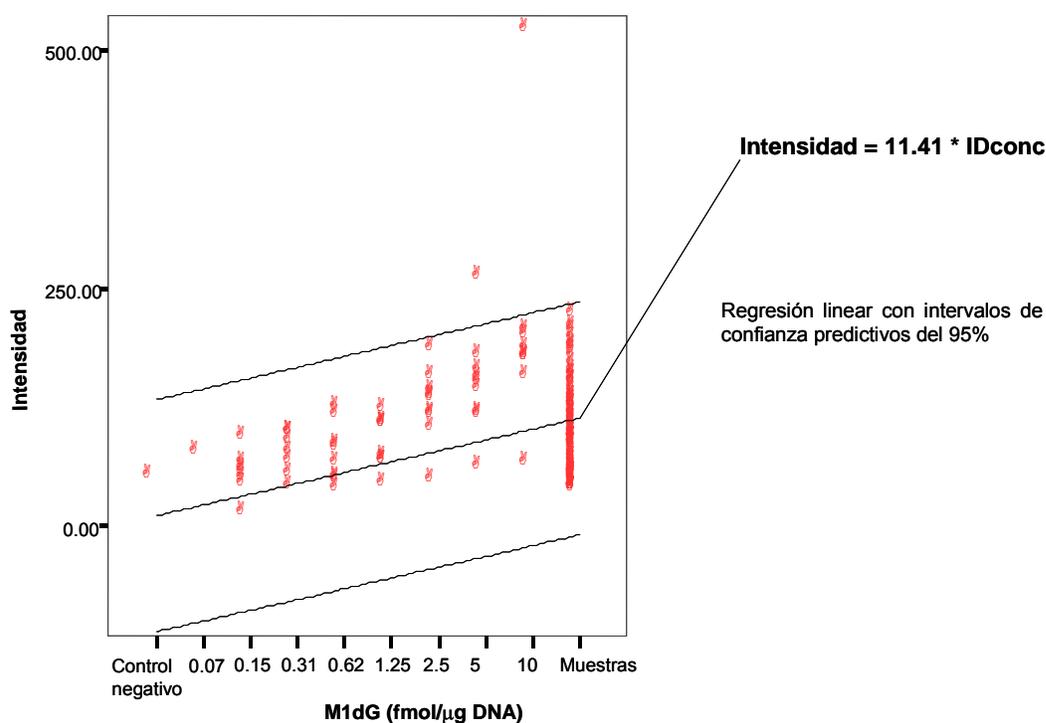


Figura 9. Gráfica que muestra los valores de la intensidad de cada una de las curvas patrón realizadas en cada determinación para estimar los niveles de aductos en las muestras.



Las características de los pobladores del Estado de Tlaxcala que fueron evaluados en el estudio se observan en el cuadro IV; el cual se encuentra dividido en tres poblaciones: Villalta (representa a pobladores de la región 1, es decir, es la región en donde la planta petroquímica descarga sus desechos), Xalmimilulco (región 2 lugar en donde se encuentran las descargas de las industrias textiles), Justina (región 3) y la población testigo que es el D.F.; se observa el porcentaje de género, índice de masa corporal (IMC); así como fumadores y no fumadores.

Cuadro IV. Estructura de la población del Estado de Tlaxcala y el testigo negativo referente a la población de México D.F.

Población	N	Género		Índice de masa corporal				Fumador (%)	No fumador (%)
		Hombre (%)	Mujer (%)	Desnutrición (%)	Normal (%)	Sobrepeso (%)	Obeso (%)		
Villalta	30	53.33	46.66	10	50	36.66	3.33	36.66	63.33
Xalmimilulco	13	46.15	53.84	7.69	23.07	61.53	7.69	-----	100
Justina	9	44.44	55.55	-----	55.55	44.44	-----	11.11	88.88
D.F.	10	50	50	-----	20	60	20	20	80

En el cuadro V se observa la frecuencia genotípica de GSTM1 y las frecuencias alélicas de NQO1, con un total de 62 individuos divididos entre las diferentes poblaciones. Para las frecuencias alélicas de CYP2E1 y CYP1A1 se había determinado en un estudio previo a 31 individuos de las diferentes poblaciones del estado de Tlaxcala, para el caso del D.F. no se tenían muestras para determinar estas frecuencias.

Cuadro V. Frecuencia de genotipos de GSTM1 y de alelos de NQO1, CYP2E1 y CYP1A1*2C en los individuos estudiados.

Población	N	GSTM1		NQO1		N	CYP2E1 Pst1		CYP1A1*2	
		Ausencia	Presencia	Alelo Nativo	Alelo mutante		Alelo Nativo	Alelo Mutante	Alelo Nativo	Alelo Mutante
Villalta	30	0.40	0.60	0.54	0.46	16	0.90	0.10	0.37	0.63
Xalmimilulco	13	0.23	0.77	0.42	0.58	12	0.78	0.22	0.50	0.50
Justina	9	0.22	0.78	0.55	0.45	3	0.80	0.20	0.33	0.67
D.F.	10	0.50	0.50	0.30	0.70	10	0.70	0.30	0.60	0.40



En el cuadro VI se muestra la media de la concentración de aductos de M1dG por población, observando que el D.F. presenta una concentración mayor de aductos a diferencia de las demás regiones; en cuanto a las poblaciones presentes en el Estado de Tlaxcala se observa que Xalmimilulco presenta una menor concentración de aductos.

Cuadro VI. Concentración de aductos de M1dG ($\mu\text{g}/\text{fmol DNA}$) por población

Población	\bar{X} fmol/ μg DNA	E.E
Villalta	3.20	± 1.38
Xalmimilulco	1.84	± 0.45
Justina	3.07	± 1.34
D.F.	4.78	± 1.68

Para determinar la asociación entre el daño como lo es la concentración de aductos y las variables MN, género, fumar, polimorfismos GSTM1, GSTT1, NQO1, índice de masa corporal, región de la población de las diferentes regiones se aplicó un modelo lineal generalizado, debido a que este modelo multivariado permite analizar en un mismo procedimiento variables de respuesta continuas y/o categóricas, así como las interacciones entre ellas. En este estudio se tienen variables categóricas (p.e. género que esta subdividido en hombre y mujer) y continuas (p.e. el índice de masa corporal); el objetivo de utilizar este modelo es determinar cuales son las variables que con mayor probabilidad explican los niveles de aductos encontrados en la población. En el cuadro VI se muestra únicamente las variables que mostraron correlación con los niveles de aductos de M1dG.



Cuadro VII. Resultados del Modelo Lineal Generalizado

Variable	g.l. residuales	Desviación residuales	g.l.	desviación	F	P
Región	54	60.45	-3	-15.33	5.77	0.00176**
Fumar	52	53.24	-1	-8.12	9.18	0.0038**
IMC	54	53.65	-3	-8.52	3.21	0.0304*
Género	53	55.20	-1	-4.83	4.99	0.029*
Género : GSTM1	52	50.36	-1	-5.24	5.93	0.0018*

En el cuadro VII se observa la comparación entre cada una de las categorías de las variables que explican la concentración de aductos en la población. Como se observa, los fumadores tuvieron mayor nivel de aductos, así como los hombres, las personas con bajo peso y los residentes del D.F. y además se encontró una correlación entre ser hombre y portar el polimorfismo nulo de GSTM1.

Cuadro VIII. Comparación entre cada una de las variables.

Variable	t	P
Fuma vs no fuma	2.893	0.005640**
Género - Mujer vs Hombre	-2.941	0.004940**
IMC - Normal vs Desnutrición - Sobrepeso vs Desnutrición - Obeso vs Desnutrición	-2.947 -2.532 -2.259	0.004870** 0.014540* 0.028283*
Región - D.F. vs Villalta, Xalmimilulco y Justina	4.129	0.000112***
Género : GSTM1 -Mujer : GSTM1 vs Hombre : GSTM1 nulo	2.129	0.03810*

P<0.001*** ; P<0.01** ; P<0.05*

Se buscó si existía correlación entre la concentración de aductos de M1dG y la región debido a la presencia de VOC's en los ríos Atoyac y Xochiac por las diferentes descargas de contaminantes provenientes tanto de las industrias textiles y la planta petroquímica, y se



encontró que los habitantes del D.F. presentaron una mayor concentración de aductos a diferencia de los habitantes de las regiones estudiadas en el Edo. de Tlaxcala.

Otro tipo de variable que según el modelo lineal generalizado tuvo una diferencia significativa para explicar la presencia de aductos es el hábito de fumar; las personas fumadoras tienen una mayor concentración de aductos de M1dG a diferencia de las personas no fumadoras.

El índice de masa corporal se clasificó según la organización mundial de salud en desnutrición o infrapeso, normal, sobrepeso y obesidad. Esta fue otra de las variables que se caracterizó en la población y que tuvo diferencia significativa en el Modelo. Las personas que presentan infrapeso o desnutrición tienen una mayor concentración de aductos de M1dG a diferencia de las personas que tienen peso normal, sobrepeso u obesidad (Cuadro VIII).

En cuanto al género es otra de las variables con diferencia significativa que explican la concentración de aductos de M1dG, los hombres presentan una mayor concentración de aductos a diferencia de las mujeres (Cuadro VIII).

En cuanto a la interacción de género: GSTM1 nulo se observa que los hombres presentan mayor daño que las mujeres cuando tienen ausencia de GSTM1, en presencia del gen no se encontró una diferencia significativa entre hombres y mujeres (Cuadro VIII).



VIII Discusión

Es importante evaluar la concentración de los niveles de M1dG en diferentes tipos de tejidos y células ya que pueden ser regulados por la ingesta o consumo de ciertos alimentos así como factores ambientales. Se han utilizado diferentes técnicas como P- post-labelling o HPLC/PPL pero se requiere de una gran cantidad de DNA (10 μg – 1 mg) para cuantificar estos niveles; Leuratti en 1998 implementó la técnica de inmunoslotblot que es altamente sensible ya que se necesita tan solo de unos pocos microgramos de DNA para evaluar bajos niveles de aductos (Leuratti et al., 1998).

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal (D10A1) donado por la Dra. Sharon Moore, del Departamento de Química de la Open University de Walton Hall en Inglaterra, hizo posible el desarrollo de la técnica de inmunopunto para la detección de aductos de malondialdehído (M1dG) en muestras de DNA con tan solo 1 μg de DNA por pozo. Así como se mostró en los resultados se obtuvo una buena estandarización de la técnica de inmunopunto en el laboratorio de toxicología ambiental.

En estudios previos Leuratti y cols. 2002 encontraron que el basal de aductos de M1dG de personas saludables es de 1.6 – 3.52 fmol/ μg DNA; sin embargo para la población de Tlaxcala se encontró un rango de 1.84 – 3.20 fmol/ μg de DNA y para estudiantes del D.F. una concentración de 4.78 ± 1.68 fmol/ μg de DNA, que de acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere que esta concentración se debe al estilo de vida de los habitantes.

Correlación de aductos de M1dG con la frecuencia de MN

Debido al cambio de las actividades rurales a una intensa industrialización del estado de Tlaxcala, los habitantes se han visto afectados por las constantes emisiones de una serie de compuestos químicos y tóxicos al ambiente por parte del complejo petroquímico y las fabricas establecidas en las zonas. La presencia de altas concentraciones de algunos VOC's (cloruro de metileno, cloroformo, tolueno) en el aire y agua de los ríos Atoyac y Xochiac dentro de la zona de estudio (Morales et al. 2004) y el reporte de una alta frecuencia de



daño genotóxico en donadores de las comunidades establecidas a lo largo de estos ríos (Montero et al. 2006) demuestran que los habitantes de esta zona están expuestos a sustancias que tienen la capacidad de dañar su salud. Montero et al. 2006 reportó una alta frecuencia de MN en los pobladores de la región 1 (Villalta) y 2 (Xalmimilulco) del estado de Tlaxcala, regiones que están altamente contaminadas.

Los polimorfismos en las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos puede ocasionar un cambio en los niveles de expresión y de actividad de las enzimas (que puede deberse a una alteración en la estructura de la proteína que ocasione que la enzima incremente o disminuya su actividad, o bien, impedir que sea degradada o inducir su acción) y, por ende, alterar el metabolismo de compuestos químicos carcinogénicos y generar un mayor o menor riesgo a la salud.

La incorporación del estudio de los polimorfismos metabólicos en estudios epidemiológicos es de importancia debido a: a) la identificación de una subpoblación que sea más susceptible a una enfermedad inducida por compuestos químicos puede incrementar la importancia de los estudios; b) la sospecha del papel de un agente etiológico es reforzada por el conocimiento de la enzima implicada en su metabolismo y, c) los polimorfismos pueden ser particularmente significativos en relación a niveles bajos de exposición ya que pueden influir en el proceso de la evaluación de riesgo y en el establecimiento de límites tolerables de exposición que debería tener en cuenta la susceptibilidad individual (Vineis et al. 1999)

Debido a que las enzimas de la familia GST son importantes para la desintoxicación y eliminación de carcinógenos y que protegen a la célula tanto del daño efectuado por distintos xenobióticos así como del estrés oxidante, se decidió incluirlos en este estudio. El polimorfismo GSTM1 nulo se ha relacionado con un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas de trabajadores expuestos a solventes orgánicos (Hoyos et al. 2009). Jain et al. 2006 reportó que las personas fumadoras con GSTM1 nulo tiene un incremento en el riesgo de cáncer esofágico. Por otra parte las enzimas de la superfamilia CYP 450 pueden convertir sustratos a metabolitos reactivos que pueden estimular la



peroxidación lipídica; un ejemplo es que CYP2E1 cataliza la reducción de tetracloruro de carbono al radical triclorometil el cual puede quitar un átomo de hidrógeno a los lípidos y con esto iniciar el proceso de peroxidación lipídica (Zangar et al. 2004).

Ya que los MN son pequeños núcleos constituidos por cromosomas enteros con una o ambas cromátidas, por cromosomas acéntricos o por fragmentos de una cromátida que se han retrasado en la anafase/telofase del ciclo celular y han sido excluidos de ambos núcleos de las células hijas, la prueba de MN se considera una buena herramienta para investigar los efectos clastógenos y aneuploidógenos en exposiciones ambientales y ocupacionales (Ishikawa et al. 2004). Los pobladores de Tlaxcala que presentaron un genotipo de GSTT1 nulo tenían una mayor frecuencia de MN; así como los portadores del alelo c2 de los polimorfismos de la CYP2E1, también mostraron mayor frecuencia de MN, que junto con la presencia de VOC's en el ambiente llevaron a plantear la idea de que la formación de MN podría deberse al estrés oxidante provocado por el contacto de los contaminantes, que pudiera inducir una peroxidación lipídica que se tradujera en daño al DNA y formación de micronúcleos.

Sin embargo en este estudio no se encontró una correlación entre la formación de MN y la concentración de aductos de M1dG en las mismas muestras de sangre, por lo cual se sugiere que la formación de MN podría deberse a otro mecanismo en el cual no está implicada la peroxidación lipídica.

Correlación de aductos de M1dG y estilo de vida

Los niveles en la concentración de aductos de M1dG parecen estar determinados por factores del estilo de vida, es decir, la ingesta de comida rica en ácido graso poliinsaturado, una dieta pobre en antioxidantes, el hábito de fumar, aunado con algunos polimorfismos metabólicos.

La gran variación en la incidencia de diferentes tipos de cáncer y enfermedades comunes sugiere que los factores ambientales y el estilo de vida son potentes modificadores de riesgo.



Una característica del estilo de vida es la dieta, que se ha observado en estudios epidemiológicos que posee un importante papel en la etiología de ciertos tipos de cáncer y enfermedades crónicas (Leuratti *et al.*, 1998).

Los aductos de DNA se consideran parte del proceso de carcinogénesis y pueden ser formados por compuestos genotóxicos exógenos o endógenos, y diversos estudios han comenzado a interesarse en la producción endógena de agentes genotóxicos formados a partir de la dieta (Leuratti *et al.* 1998).

La formación endógena de malondialdehído en humanos y los datos observados en otros estudios de genotoxicidad y mutagénesis sugiere que puede tener un papel significativo en carcinogénesis humana; por lo cual es importante estimar los niveles de M1dG en diferentes tejidos y examinar como pueden ser modificados por la dieta.

Hong demostró que el ayuno induce CYP2E1; sin embargo los mecanismos por los cuales el ayuno y la restricción calórica inducen CYP2E1 es compleja ya que involucran algunas condiciones hormonales y metabólicas. Por ejemplo, la hiperinsulinemia ha sido reportada que disminuye la expresión de CYP2E1 (Peng y Coon 1998). La disminución en los niveles de insulina puede ser inducida por la poca ingesta de glucosa, y al disminuir los niveles de glucosa en el cuerpo se puede observar una inducción de CYP2E1. (Miller y Yang, 1984). También se ha observado que el ayuno de uno o dos días provoca una disminución de los niveles de GSH en hígado de rata y es bien conocido que GSH es uno de los principales antioxidantes que protege de los radicales libres. (Fry y cols. 1999). En el presente estudio podemos observar que las personas con un bajo índice de masa corporal (que se considera asociado con desnutrición) tuvieron mayor daño en forma de aductos de M1dG; si asumimos que ocurre lo que se plantea en los estudios previamente descritos, se podría especular que los niveles de M1dG podrían estar relacionados con un aumento en la actividad de CYP2E1, pues se sabe que esta isoforma genera ROS que puede causar peroxidación lipídica.



Por otro lado, los polimorfismos estudiados de CYP2E1 en grupos humanos se han asociado con diferencias en la actividad de la enzima, pero en nuestro estudio no fue posible analizar la influencia de las variaciones alélicas en los niveles de aductos M1dG ya que el modelo lineal generalizado debe seguir ciertas condiciones una de las cuales es que todas las variables que se incluyan en el modelo deben estar medidas en todos los sujetos de estudio y no se contó con ese dato para todos los individuos estudiados.

Correlación de aductos de M1dG con el hábito de fumar

Otra característica del estilo de vida incluye el hábito de fumar; se ha estudiado que el humo del cigarro contiene cerca de 4700 sustancias químicas, la mayoría de las cuales tienen múltiples efectos nocivos; muchos de estos productos químicos son metabolizados a radicales libres o especies reactivas, capaces de modificar o destruir las estructuras celulares o moleculares, varios autores han observado que la toxicidad del humo del cigarro produce estrés oxidante en fumadores y está acompañado con una débil defensa antioxidante (Edward et al. 2002, Munnia et al. 2006). Sin embargo, estas afirmaciones no son aplicables universalmente ya que no correlaciona el daño inducido por el humo de los cigarrillos con la cantidad de los radicales que induce (Christine et al. 2007).

Sin embargo se ha sugerido que:

- a) El fumar definitivamente reduce la actividad antioxidante total, sugiriendo que existe una mayor generación de radicales libres causados por humo del cigarro. El consumo de una dieta antioxidante podría compensar este proceso.
- b) El fumar incrementa significativamente los niveles de ácido úrico. Los altos niveles de ácido úrico indican que el fumar incrementa la oxidación de purinas y esta oxidación está acompañada por la producción del anión superóxido donde la xantina oxidasa es un potente productor de este anión. La dismutación a oxígeno y peróxido de hidrógeno ocurre muy poco bajo condiciones fisiológicas pero puede ser acelerada por la superóxido dismutasa. Una vez formado el peróxido de hidrógeno y en presencia de cobre, hierro, donadores de electrones como NADPH, hidroquinona o glutatión facilitan la formación del radical hidroxilo; el cual es el



más tóxico de todos los ROS e interactúa con biomoléculas cercanas después de su generación, lo que puede contribuir a la peroxidación lipídica produciendo aldehídos como el Malondialdehído. Esto significa que el fumar incrementa la peroxidación lipídica produciendo aductos como M1dG cuya posible consecuencia es el daño del DNA (Goetz *et al.* 2008).

- c) En personas fumadoras se ha observado que al incrementar los productos de peroxidación lipídica en plasma, el cuerpo tiende a metabolizarlos y excretarlos vía orina, dando como resultado niveles estables en plasma pero una mayor concentración en orina (Jha. *et al* 2007). Sin embargo Lykkesfeldt *et al* 2004 observaron altos niveles de MDA en plasma de fumadores a pesar de que exista un balance del estado antioxidante.

En diversos estudios se ha encontrado diferencia entre los niveles de aductos de MDA de las personas fumadoras y no fumadoras; como ya se mencionó el humo del tabaco contiene un gran número de xenobióticos carcinógenos, los cuales causan producción de radicales libres que puedan atacar bases del DNA y membranas lipídicas. Recientes evidencias sugieren que el estrés oxidante puede contribuir a la inestabilidad genética y promover el incremento de riesgo de cáncer. Munnia *et al.* 2006 confirman que el humo del tabaco tiene una mayor carga oxidante de una variedad de componentes exógenos inhalados. En cuanto al metabolismo se sabe que GSTT1 metaboliza carcinógenos como monohalotanos y óxido de eliteno presente en el humo del cigarro, así como GSTM1 metaboliza hidrocarburos poliaromáticos y benzo[a]pireno.



Correlación de aductos de M1dG con género, región y genotipo: GSTM1 nulo.

En este estudio se encontró la asociación entre la concentración de aductos de M1dG con tres variables de forma independiente: género, región y la interacción entre género: GSTM1 nulo.

En la primera se encontró que los hombres tienen una mayor concentración de aductos de M1dG a comparación de las mujeres mientras que, en la segunda, se halló que en el D.F a diferencia de las otras poblaciones presentó una mayor concentración del aducto. En cuanto al género podría deberse a que los hombres tienen una exposición mayor a los xenobióticos (cloroformo, cloruro de metileno, tolueno, etc) debido a su actividad económica ya que estos individuos trabajan en la agricultura o en la industria de manufactura intradomiciliaria del vestido, por lo cual se sugiere que presentan una mayor activación de enzimas de fase I como CYP2E1, otros autores han sugerido que la inducción de P450 puede incrementar la conversión de compuestos endógenos a metabolitos reactivos y puede ser una fuente de estrés oxidante asociada con el incremento en la expresión de P450 (Nebert *et al.*, 2000) así como que este grupo de enzimas puede convertir sustratos en metabolitos reactivos que pueden estimular la peroxidación lipídica; y en cuanto a la asociación que se tiene con GSTM1 nulo podría deberse a que ya que Glutatión S transferasa son enzimas de la fase II del metabolismo y que es muy importante en la desintoxicación y eliminación de xenobióticos o metabolitos reactivos por conjugación, las personas que presentan el genotipo GSTM1 nulo no tienen actividad de esta enzima, no pueden desintoxicar y por lo tanto tienen mayor daño. Como ya se mencionó, los hombres en la zona de estudio tienen mayor exposición ocupacional y ambiental y es más probable que sufran daño a su DNA que las mujeres y si les falta una enzima importante en procesos de desintoxicación, el daño sería aún mayor.



IX CONCLUSIONES

Se estandarizó de la técnica inmunopunto para la detección de aductos de M1dG en el laboratorio de medicina genómica y toxicología ambiental.

No hubo correlación entre los niveles de aductos de M1dG y la frecuencia de MN.

Se encontró evidencia de que el biomarcador de estrés oxidante, M1dG, se explica mejor por diferentes factores del estilo de vida (p.e. fumar, siendo más susceptible el género masculino), hábitos alimenticios, que por una posible exposición a agentes tóxicos ambientales.



X BIBLIOGRAFIA

- Beddowes E., Faux S., Chipman K 2003. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathion depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* 187 :101-115
- Bird R., Draper H., Basrur P 1982. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 101:237-246
- Boelsterli A 2007. *Mechanistic Toxicology the molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets*. Second edition. Taylor & Francis Group pp. 399
- Bo Hang 2004. Repair of exocyclic DNA adducts: rings of complexity. *BioEssays* 26:1195–1208.
- Bonassi S. Neri M, Puntoni R 2001. Validation of biomarker as early predictors of disease. *Mutation Research* 480:349-358.
- Bonassi. S, William W 2002. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research*. 511: 73-86
- Brambilla G., Bassi A., Faggin P., Ferro M., Finollo R., Martelli A., Sciaba L., Marinari U 1985. Genotoxic effects of lipid peroxidation products. In Poli. G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Slater, T.F *Free Radicals in liver Injury*. IRL Press. Oxford, Uk, pp. 59-70
- Burcham P, Kuhan Y 1998 Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 20: 996-1001.



- Charls G., Paul L., Rosa G., Steven R., Lawrence L. Marnette 2008. Monitoring in Vivo Metabolism and Elimination of the Endogenous DNA Adduct, M1dG {3-(2-Deoxy-β-D- erythro-pentofuranosyl) pyrimido [1,2-α] purin-10 (3H)-one}, by Accelerator Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicology*. 21:1290-1294.
- Cheesman K, Slater T 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Free radicals in medicine*. 10:481-493.
- Chihuailaf. R, Contreras. P, Wittwer. F 2002. Patogénesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health *Vet. Mex.*, 33
- Contreras. G, Meléndez. M, Zúñiga. A, Pasquetti. A 2004. Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 12(4): 199- 206
- Díaz S 2002. Daño oxidativo, radicals libres y antioxidants. *Revista Cubana Medico Militar*. 31(2):126-33
- Edward P, Morrow J, Hudes M, Caan B, Packer L 2002. Factors associated with oxidative stress in human population. *Am J of Epidem* 156: 511-517
- Ernster L 1998. In *phatophysiology of lipid peroxides and elated. Free radicals*. Ed. Yagi K. pp.149-168
- Esterbauer H, Cheesman K, Dianzani M, Poili G, Slater T. 1982. Separation and characterization of the aldehydie products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J*, 208:129-140
- Fajardo G, Juárez O, G, Palma P, Carreón C, Ortega A, Mejía A 2007. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). *BMC Cancer*. 7:68.



-
- Fry J, Sinclair D, Phipper C, Townsend S, Thomas N 1999. Depression of glutathione content, elevation of CYP2E1-dependent activation, and the principal determinant of the fasting-mediated enhancement of 1,3-dichloro-2-propanol hepatotoxicity in the rat. *Food Chem. Toxicol* 37, 351-355.
 - Goetz. M, Luch A 2008. Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2008.02.035
 - Halliwell Barry, Gutteridge John 2007. Free radicals in Biology and medicine. Fourth edition. Biosciences Oxford pp. 851
 - Hoyos-Giraldo L, Carvajal S, Cajas-Salazar N, Ruiz M, Sánchez-Gómez A 2009. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutation Research.* 666(1-2):8-15.
 - Iyanagi T, Yamazaki I 1970. Oxidative stress in tardive dyskinesia: genetic association study and meta-analysis of NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and Superoxide dismutase 2 (SOD2, MnSOD) genes. *Biochim. Biophys. Acta* 216, 282-294
 - Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y, Kawano M, Yamauchi T, Yokoyama K 2004. Evidence of association of the CYP2E1 genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood. *Mutation Research* 546:45-53
 - Jha J, Maharjan B, Adhikari D, Vishwanath P, Akila, Nagamma T, Azhari S, Sing P 2007. Cigarette smoke induced oxidative insult in local population of Pokhara. *Kathmandu University Medical Journal* 5(4): 511-517
 - Joseph D 1997. *Molecular Toxicology.* Oxford University Press. pp 336



-
- Keher J 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit rev Toxicol.* 23:21-48
 - Keshav K. Singh 2006. Oxidative stress. Disease and cancer. Imperial College Press. New York USA pp.1084
 - Kim J, Shin H, Lee J, Lee J 2003. Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis. *Mutation research.* 541:55-61
 - Kwack. S., Mu Lee. B 2000. Correlation between DNA or protein adducts and benzo(a)pyrene diol epoxide I-triglyceride adduct detected in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 21(4):629- 632
 - Klaasen C, Watkins III J 2005. *Fundamentos de toxicología.* McGraw Hill Madrid pp536
 - Kopplin Mike 2001. *Toxicología Ambiental Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental,* The University of Arizona p 750
 - Knutson C. Skipper P, Liberman R, Tannenbaum S, Marnett L 2008. Monitoring in vivo metabolism and elimination of the endogenous DNA adducts, M1dG {3-(2-deoxy- β -D-erythropentofuranosyl)pyrimido[1,2-r]purin-1083H)-one}, by accelerator mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 21:1290-1294
 - Leuratti C, Sing R, Lagneu C, Farmer P, Plastaras J, Marnett L 1998. Determination of malondialdehyde induced DNA damage in human tissues using an immunoslotblot assay. *Carcinogenesis.* 19 (11):1919-1924.
 - Leuratti C, Sing R, Deag E, Griech E, Hughes R, Bingham S, Plastaras J, Marnett L, Shuker D 1999. A sensitive immunoslotblot assay for detection of



malondialdehyde- deoxigunosine in human DNA. IARC Scientific publications 150:197-203

- Leuratti C., Watson M., Deag E., Welch A., Sing R., Gottschalg E., Marnett L., Atkin W., Day N., Shuker D., Bingham S 2002. Detection of Malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 11:267-273.
- Lewis D 2001 *Guide to Cytochromes P450 structure and function*. Taylor & Francis Inc., London, p. 215
- Lewis L, Bankowski B, Miller S, Babus J, Zacur H, Flaws L 2004 Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP450) enzymes and estrogen levels in women *Fertility and Sterility*, Volume 82, Issue null, Pages S314-S314
- Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen H 2004. Plasma malondialdehyde is induced by smoking: a study with balanced antioxidant profiles. *Brit J of Nutr*. 92:203-06.
- Lyons B. P., Stewart C. and Kirby M 1999. The detection of biomarkers of genotoxin exposure in the European flounder (*Platichthys flesus*) collected from the River Tyne Estuary *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 446:(1)111-119
- Marnett L 2002 Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182: 219-222.
- Marczyński B., Preuss R., Mensing T., Angerer J., Seidel A., El Mourabit A., Wilhelm M., Bruning T 2005. Genotoxic risk assessment in white blood cells of occupationally exposed workers before and after alteration of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) profile in the production material: comparison



- with PAH air and urinary metabolite levels *Int Arch Occup Environ Health* 78: 97–108
- Miller K, Yang C 1984. Studies on the mechanisms of induction of N-nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone and ethanol. *Arch Biochem Biophys.*, 229, 483- 491
 - Montero. R, Serrano. L 2006 Increased cytogenic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in periphel blood lymphocytes. *Mutagenesis* 21:335-342
 - Morales S 2004. Ambiente y Derechos Humanos. Documentación y seguimiento de casos de Leucemia y Trombocitopenia por contaminación del río Atoyac Puebla- Tlaxcala. Edit. Centro “Fray Julián Garcés” Derechos Humanos y Desarrollo Local A. C. Tlaxcala pp. 81
 - Moreno Grau 2003. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. Mc Graw Hill. España pp. 370
 - Munnia A, Bonassi S, Neri M, Ceppi M, Verna A, Quaglia R, Pelucco D, Taioli E, Garte S, Peluso M 2006 Bronchial MDA-DNA adducts, tobacco smoking and cyclin D1 G870A polymorphism. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, Volume 47 86-91.
 - Navarro I, Flores E, Valladares R. 2004 Estudio Ambiental. Informe. In: Morales Eduardo (ed.). Ambiente y Derechos Humanos. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local A.C. Tlaxcala, Tlax. Pp. 27-59.
 - Nebert D, Roe A, Dieter M, Solis W, Yang Y, Dalton T 2000 Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65-85.



-
- Orellana Myriam, Guajardo Viviana 2004 Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Revista médica de Chile*. 132(1):85-94.
 - Peng H, Coon M 1998 Regulation of rabbit cytochromo P450 2E1 expression in HeG2 cells by insulin and thyroid hormone. *Mol. Pharmacol.* 54, 740-747
 - Poirier MC, Santella RM, Weston A 2000. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis*; 21:353–359.
 - Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A 2006. Diabetes, estres oxidativo y antioxidants. *Investigación en salud* Vol. 8
 - Raymond Chang 1999. *Química sexta edición ed.* McGraww- Hill Mexico, pp 995
 - Reylli PM, Burkkley GB 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Be J Surg* pp1324
 - Roche E 1994. Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Med Clin* 103:189-96
 - Romero F, Bosch-Morell F, Romero M, Jarelo E, Romero B, Marin N, Roma J 1998. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Hlth Perspect.* 106:1229-1234
 - Sakurai K, Cederbaum A 1998. Oxidative Stress and cytotoxicity induced by ferric-nitriolotriacetate in HepG2 cells that express cytochromo P4502E1. *Molecular Pharmacology* 54:1024-1035
 - Schoket B, Poirier M, Mayer G, Torok. G, Kolozsi-Ringelmann A, Bognar G, Bigbee W, Vincze I 1999 Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutation Research* 445:193–203



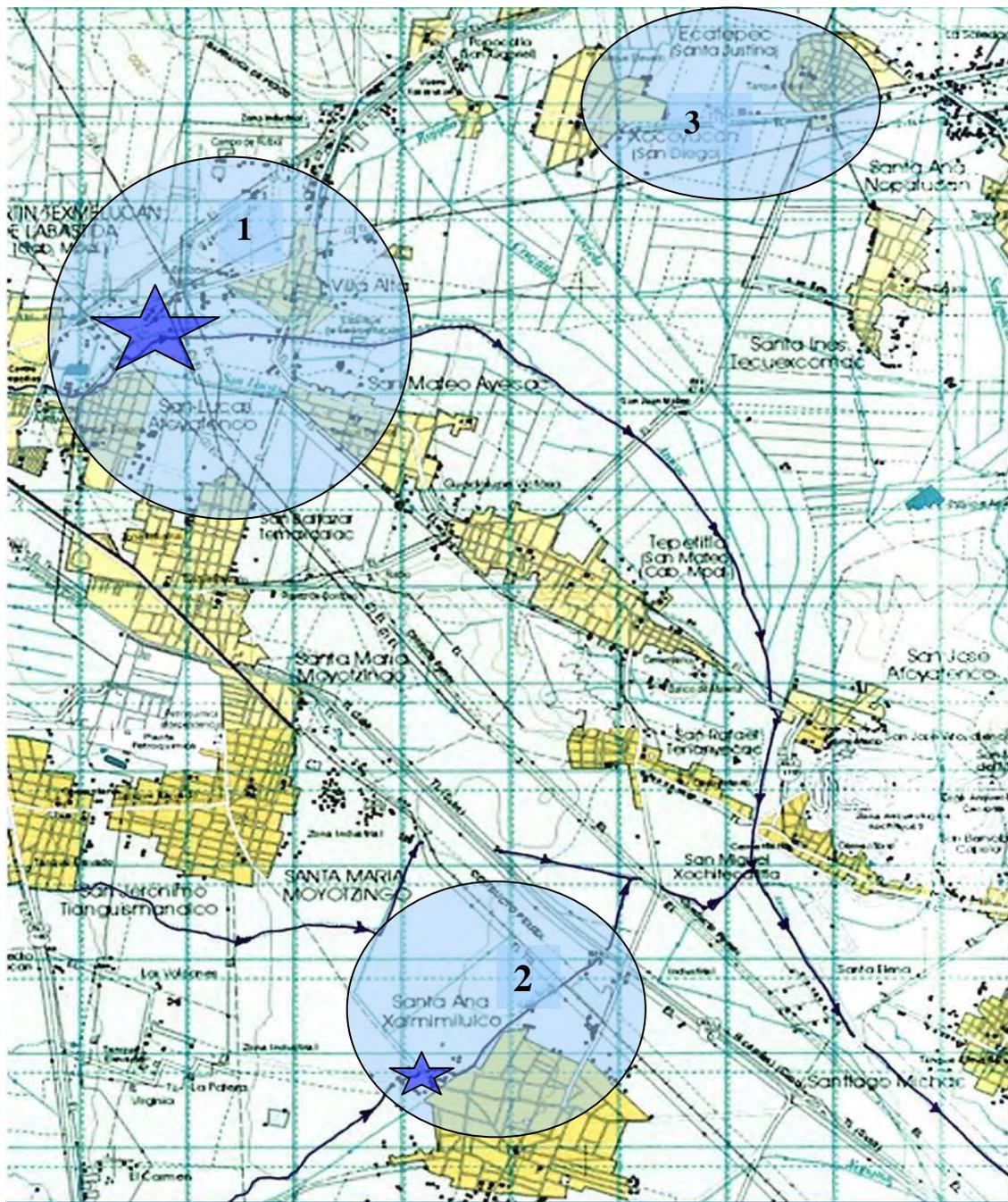
-
- Seifried H 2007 Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention? *J Nutr Biochem.* 18(3):168-71.
 - Serrano-García L, Montero-Montoya R 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38:38-45
 - Siu GM, Draper H 1982. Metabolism of malondealdehyde in vivo and in vitro. *Lipids* 17(5):125
 - Smith M 1999. Benzene, NQO1 and genetic susceptibility to cancer. *Proc. Natl. acad. Sci.* 96:7624-7626
 - Sun F, Hamagawa E, Tsutsi C, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S 2001. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 15:(35) 86-191
 - Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M 2006 Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer *Chemico-Biological Interactions* 160 1–40
 - Vineis, P. et al (Editores) 1999. *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer.* International Agency for Research on Cancer. IARC Scientific Publications No. 148. France. 510 pp
 - Weber-Lotfi F, Obrecht-Pflumio S, Guillemaut P, Kleinpeter J, Dietrich A 2005 Specific plant DNA adducts as molecular biomarkers of genotoxic atmospheric environments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 581:(1-2) 55-67
 - Wiemels J, Smith M 1999 Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. *Free Radical res* 30:93-103



- Yau T 1979. Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyde in mammalian cells. *Mech. Agein Dev* 11:137-144.
- Zangar R, Davydov D, Verma S 2004 Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* 199: 316-331
- Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A 2005. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Mutation Research* 104:420-425



ANEXO 1



Mapa de la zona de estudio. Las líneas gruesas representan los cursos de los ríos Atoyac y Xochiac. Las puntas de las flechas indican la dirección del flujo de los ríos. Las estrellas grandes representan las descargas de la planta petroquímica; las estrellas pequeñas representan las descargas de las industrias textiles (Montero et al. 2006).



ANEXO 2

Técnica para determinar la frecuencia de MN

Cultivo de Linfocitos

El manejo de la sangre y los reactivos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar y cada experimento se manejó por duplicado.

Se tomaron 0.5 mL de sangre entera de cada donador, heparinizada, y se agregaron a 6.5 mL de una mezcla de medio de RPMI-1640, PHA al 2.8% y BrdU 15 μ M (Sigma, México). Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo, cada cultivo se resuspendió en vórtex y se agregó 1 mL de KCl 0.075 M a temperatura ambiente para nuevamente resuspender en el vórtex. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1300 RPM por 7 minutos, se obtuvo el sobrenadante de todos los cultivos hasta una distancia de 3 mm por enzima del paquete celular. Se resuspende cada cultivo y se le agregó a cada uno 10 mL de solución fijadora de Carnoy (metanol- ácido acético 3:1). Cada cultivo se homogenizó en el vórtex y se centrifugó a 1500 RPM por 7 minutos, para después retirar el sobrenadante. Se agregaron 7 mL del fijador y se resuspendió para nuevamente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos. El paso anterior se repitió hasta obtener un paquete celular limpio de color blanco; se agregaron 5 mL de fijador, se resuspendieron y los cultivos se sellaron y se refrigeraron durante al menos 24 horas.

Manejo en laminillas

Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de fijador nuevo. Se resuspendió cada cultivo con una pipeta Pasteur hasta obtener una suspensión homogénea y, para cada cultivo, se preparó una laminilla con 5 gotas de la suspensión que se dejó secar y posteriormente las laminillas se tiñeron mediante un método inmunoquímico (Serrano y Montero, 2001), mediante un anticuerpo primario anti-BrdU y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa; el color café para identificar a los núcleos que incorporaron la



BrdU se obtuvo mediante reacción con peróxido de hidrógeno en presencia de diaminobenzidina. La contratinción de los núcleos de células que no proliferaron durante el cultivo se hizo con Giemsa.

Análisis de MN

Se evaluaron dos cultivos por donador y se contaron 2000 células por cada cultivo. Para el caso de MN, de cada laminilla se evaluó lo siguiente:

- El número de células con un MN
- El número de células con más de un MN
- El número total de células con MN (con uno o más MN).

Posteriormente se calcularon las frecuencias del biomarcador con base a la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia MN} = (\text{Número de MN encontrados}/4000) * 1000$$



ANEXO 3

Técnica para el análisis de polimorfismo CYP 2E1

Amplificación de un fragmento de la región no codificante 5' de CYP2E1

Se amplificaron 102 muestras de los donadores para CYP2E1. Para cada muestra se preparó una mezcla de la siguiente forma: 14 μL de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas, 3 μL del DNA purificado, 2 μL de dNTPs (1.6 mM). 1 μL de oligonucleótido CYP2E1FW (0.2mM), 1 μL del oligonucleótido CYP2E1 rv (0.2 μM), 1.5 mL de la enzima Taq polimerasa recombinante (2.5 U) y 2.5 mL de amortiguador MPCR B (2 mM de MgCl_2) obteniendo un volumen total de 25 mL. La amplificación del fragmento de la región no codificante 5' de CYP2E1 se llevó a cabo en un Mastercycle $\text{\textcircled{R}}$ gradient 5331 de Eppendorf Scientific, Inc. El programa de PCR fue de 30 ciclos, iniciando con un primer paso a una temperatura de 94°C por 3 minutos y ciclos de 30 segundos 94°C, 30 segundos 56°C y 30 segundos a 72°C; al finalizar los ciclos se dejó 3 minutos de extensión a 72°C. El producto de la amplificación por PCR es un fragmento de 410 pb que corresponde a una parte de la región flaqueante 5' de CYP 2E1 y que contiene los sitios polimórficos de PstI y RsaI. Para corroborar la amplificación del producto de PCR del gen se tomaron 5 μL del producto y se corrieron en una electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 85 volts; para visualizar los fragmentos se utilizó tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta.

Determinación de los polimorfismos de CYP2E1 dados por las enzimas de restricción RsaI y PstI

Para conocer la presencia de cada polimorfismo se dividió el producto de PCR tomando 10 μL para determinar el polimorfismo dado por la enzima de restricción RsaI y 10 μL para determinar el dado por la enzima de restricción PstI. Para cada caso. A los 10 μL del producto se les adicionó 1.5 μL de amortiguador de reacción REact $\text{\textcircled{R}}$ (1x del volumen final), 3.4 μL agua destilada libre de DNAsas y RNAsas y 0.1 ml de la enzima de restricción



correspondiente (1 U de RsaI o PstI). Cada tubo se selló con parafilm y se dejaron de 20 a 24 horas a 37°C en la estufa. El producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 3% durante 45 minutos a 90 volts, el cual se tiñió con bromuro de etidio. La presencia / ausencia del polimorfismo dada por la enzima de restricción PstI se determinó de la siguiente manera: el homócigo nativo (PstI-) presentó una banda de 410 pb; el homócigo mutante (PstI+) presentó dos bandas, una de 290 pb y una de 120 pb, y el heterócigo (PstI-/PstI+) presentó tres bandas, una de 410 pb, 290 pb y otra de 120pb.

La presencia / ausencia del polimorfismo dada por la enzima de restricción RsaI se determinó de la siguiente manera: el homócigo mutante (RsaI-) presentó una banda de 410 pb; el homócigo nativo (RsaI+) presentó dos bandas, una de 360 pb y una de 50 pb, y el heterócigo (RsaI-/RsaI+) presentó tres bandas, una de 410 pb, 360 pb y otra de 500pb. Los fragmentos se observaron con una lámpara de luz ultravioleta.

Amplificación de un fragmento que contiene el exón 7 de CYP1A1

Se amplificaron muestras de 101 donadores para determinar el genotipo CYP1A1*2C y para ello se preparó la siguiente mezcla: 16.5 µL de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas, 1 µL del DNA purificado, 1.5 µL de dNTPs (1.6 mM). 1 µL de oligonucleótido C53 (0.2mM), 1 µL del oligonucleótido OJA 10 (0.2µM), 1.5 µL de la enzima Taq Polimerasa Recombinante (2.5 U) y 2.5 mL de amortiguador MPCR B (2 mM de MgCl₂) obteniendo un volumen total de 25 mL. Las amplificaciones se llevaron a cabo un Mastercycler[®] gradient 5331 de Eppendorf Scientific, Inc. El programa de PCR fue de 30 ciclos, iniciando con un primer paso a una temperatura de 94°C por 3 minutos y ciclos de 30 segundos 94°C, 30 segundos 60°C y 45 segundos a 72°C; al finalizar los ciclos se dejó 3 minutos de extensión a 72°C. La amplificación del producto de PCR se comprobó corriendo 5 ml de cada producto en un gel de agarosa al 1.5% durante 45 minutos a 85 volts. El producto de la amplificación es un fragmento de 760 pb que incluye parte de los intrones 7 y 8 y el exón 7 donde se encuentra el polimorfismo CYP1A1*2C y para visualizar los fragmentos se utilizó tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta.



Determinación del polimorfismo Ile/Val

Para determinar la presencia del polimorfismo se tomaron 10 μ l del producto de PCR y se les adicionó 1.5 ml de amortiguador R+, 0.2 ml de la enzima de restricción BsrDI (1U) y 3.3 ml de H₂O para llevarlo a un volumen final de 15 ml. Cada tubo se selló con parafilm y se pusieron a digerir a una temperatura de 65° C en un termoblock durante 20-24 hrs. Una vez digerido el producto, se determinó la presencia del polimorfismo dado por la enzima de restricción BsrDI de la siguiente forma: el homócigo nativo (Ile-Ile) presentó tres bandas, una de 421 pb, 253 pb y 46 pb; el homócigo mutante (Val-Val) presentó dos bandas; 714 pb y 46 pb, y el heterócigo (Ile-Val) presentó cuatro bandas: 714 pb, 461 pb, 253 pb y 46 pb. Para visualizar los fragmentos se utilizó tinción con bromuro de etidio y una lámpara de luz ultravioleta.