



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO Y
CITOTÓXICO POR EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A
CLOROFORMO, DICLOROMETANO Y TOLUENO Y
SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE FASE II
EN RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA PAULINA LÓPEZ GORDILLO



TUTOR:

**QUÍMICO JAVIER ALEJANDRO BELMONT
DÍAZ**

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

López
Gordillo
Ana Paulina
58123210
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304310373

2. Datos del tutor

Químico
Javier Alejandro
Belmont
Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Regina Dorinda
Montero
Montoya

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Victor Manuel
Dávila
Borja

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de daño genotóxico y citotóxico por exposición simultánea a cloroformo, diclorometano y tolueno y su relación con el metabolismo de fase II en rata
60 p
2012

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de la Doctora Regina Montero Montoya, del Departamento de Toxicología Ambiental y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Hago un agradecimiento especial al técnico académico Luis Serrano García por su apoyo para poder culminar el apartado de micronúcleos.

*

También agradezco al técnico académico Pedro Medina Granados por su apoyo experimental en la detección de la proteína Ki-67 por inmunohistoquímica.

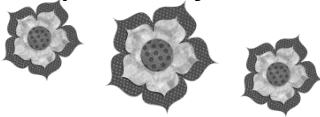
*

Además, doy las gracias a la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas (U.N.A.M.) por haberme brindado su asesoría en la toma de las fotos de tejido hepático que se presentan en este trabajo.

Gracias a la Dra. Regina Montero Montoya por darme la oportunidad de pertenecer al equipo de su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y así poder colaborar con los proyectos que ahí se realizan.

Muestro mi total gratitud a los sinodales que conforman mi jurado y a quienes admiro: Javier Belmont Díaz, Dra. Regina Montero Montoya, Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte, Dr. Víctor Dávila Borja y la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, quienes fueron amables y con sus comentarios me hicieron reflexionar y mejorar el presente trabajo.

Agradezco a los miembros del laboratorio (Luis, Javier, Eunice, Karen, Laura, Sol, Omar, Toño) quienes estuvieron dispuestos a brindarme su apoyo en toda ocasión, y cuyos consejos me permitieron crecer personal y profesionalmente. Sobre todo agradezco el que me hayan hecho sentir rodeada de amigos, lo que armonizó mi ambiente de trabajo y estudio, y me permitió desempeñarme mejor.



La culminación de mis estudios con este trabajo amerita un gran agradecimiento a mis padres, quienes apoyaron mi desarrollo profesional y me dieron libertad total para elegir mi carrera. Gracias mamá por brindarme más ayuda de la que yo podía esperar y ...no puede faltar darle gracias a mi hermano, quien fue mi compañero de estudios y con quien compartí bastante tiempo en trayectos y en desveladas, lo cual permitió que nos aconsejáramos y animáramos.

Dedico esta tesis a mi abuelo Roberto Antonio Gordillo Gordillo, mi abuela Elisa Gálvez Caimí y a mi tío Luis Alberto Gordillo Gálvez, con quienes compartí varias anécdotas de la universidad y mostraron gran interés en que culminara mi carrera, además de apoyarme con lo que fue posible.



A mi novio Iván le doy las gracias, ya que me ha acompañado prácticamente a lo largo de toda la carrera y ha compartido conmigo todo tipo de momentos: de estrés, de tristeza y de triunfo. Gracias por estar ahí y respetar mi dedicación por mis estudios.

« Les enfants désolés on vous laisse la Terre en sale état,
Et bientôt sur notre planète on va se sentir à l'étroit.
Garde vous doutez, vous seuls pourrez nous sortir de là,
L'enfant est un petit adulte qui sait qu'il croit,
L'adulte est un grand enfant qui croit qu'il sait »
Grand Corps Malade

« Il ne sert de rien à l'homme de gagner la lune s'il vient à perdre la Terre. »
Francois Mauriac

Índice

1. Resumen	7
2. Glosario de términos	8
3. Antecedentes	10
3.1. Contaminación ambiental y sus efectos tóxicos en los organismos.....	10
3.2. Compuestos orgánicos volátiles.....	12
3.3. Contaminación por VOC en el Río Atoyac.....	13
3.4. Biomarcadores.....	23
4. Planteamiento del problema y justificación	32
5. Hipótesis y objetivos	33
6. Diseño experimental	34
7. Resultados	46
8. Discusión.....	51
9. Conclusiones.....	55
10. Referencias	56

1. Resumen

En una zona de transición rural-urbana ubicada en la frontera entre los estados de Tlaxcala y Puebla, se descargan desechos industriales, municipales y agrícolas en los ríos Xochiac y Atoyac. En un estudio previo se determinó que los contaminantes en los ríos de mayor abundancia fueron cloroformo, diclorometano y tolueno (Navarro *et al.*, 2004) que por su alta presión de vapor son clasificados como compuestos orgánicos volátiles (VOC).

La presencia de los contaminantes en los ríos ha sido relacionada con un incremento en el daño genotóxico (frecuencia de micronúcleos) en los pobladores de la región (Montero *et al.*, 2006). Con base en estas observaciones en el presente trabajo se diseñó un modelo experimental *in vivo* que incluye una exposición simultánea a los VOC presentes en los ríos, con el objetivo de evaluar su efecto genotóxico, y su efecto a otros niveles de toxicidad, como la proliferación celular y el metabolismo de fase II.

Tres grupos de ratas Wistar, fueron expuestos vía intraperitoneal a distintas dosis de una mezcla de cloroformo, diclorometano y tolueno (Grupos de dosis: baja, media y alta), adicionalmente se utilizó un grupo de ratas control (sin tratamiento). Los biomarcadores utilizados en este estudio fueron los siguientes: la actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa $\theta 1$ (GSTT1-1) se utilizó como indicador de los cambios en el metabolismo de fase II; para determinar el daño genotóxico, se evaluaron micronúcleos en hepatocitos (MNHEP) y en médula ósea (MNPCE); con el objetivo estimar la proliferación en hepatocitos, se consideró la detección de la proteína Ki-67, y en el caso de la médula ósea, la proliferación celular se determinó mediante el porcentaje de eritrocitos policromáticos (%PCE).

Los resultados concernientes al metabolismo de fase II mostraron una inducción en la actividad de GSTT1-1 en la dosis baja. Respecto a la genotoxicidad hepática se observó un incremento de MNHEP en forma dosis dependiente sin ser estadísticamente significativo, por otro lado en la genotoxicidad de médula ósea los resultados mostraron una disminución en los MNPCE, la cual fue significativa en la dosis más alta. Por otra parte, los resultados de proliferación hepática revelaron niveles basales de Ki-67 en los hepatocitos de las ratas expuestas; en lo que respecta a la proliferación en la médula ósea, se observó una disminución en %PCE en la dosis baja.

La inducción de la actividad de GSTT1-1 puede interpretarse como una respuesta de defensa del organismo en dosis bajas de la mezcla, sin embargo al incrementarse la dosis se pierde la capacidad de respuesta. Los resultados negativos en la prueba de MN en ambos tejidos pueden explicarse en términos de proliferación celular, ya que es un evento esencial para la formación de MN. Esta propuesta es apoyada al comparar la frecuencia de MN con la proliferación de su respectivo órgano.

En conclusión, bajo las condiciones experimentales de este estudio, se observó que la exposición simultánea a la mezcla de VOC es capaz de inducir la actividad enzimática de GSTT1-1; sin embargo, bajo el régimen de exposición empleado en este estudio, no hay evidencia de que tal mezcla produzca daño genotóxico. Al haber una posible asociación entre la proliferación hepática y la formación de MN, se propone la incorporación de biomarcadores de proliferación en el protocolo de MNHEP.

2. Glosario de términos

- %PCE: porcentaje de eritrocitos policromáticos
- ABC: Complejo Avidina Biotina
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ADP: Adenín Difosfato
- AhR: Receptor de Aril hidrocarburos
- ARE: elemento de respuesta a antioxidantes (Antioxidant Response Element)
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- ATP: Adenín Trifosfato
- ATSDR: Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)
- Ben: Benceno
- BSA: Albúmina Sérica Bovina
- CLF: Cloroformo
- CO: monóxido de carbono
- CO₂: dióxido de carbono
- CT: controles negativos
- CYP1A2: citocromo P450 isoforma 1A2
- CYP2E1: citocromo P450 isoforma 2E1
- CYP: citocromos P450
- DAB: Diaminobencidina
- DCM: Diclorometano
- DEN: Dietilnitrosamina
- EPA: Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency)
- GSH: Glutación
- GST: Glutación-S-transferasa
- GSTT1-1: Glutación-S-transferasa clase teta isoenzima 1-1
- HAP: contaminantes peligrosos del aire (Hazardous Air Pollutants)
- HCHO: Formaldehído
- HEP: hepatocito(s)
- HPLC: cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography)
- i.p.: intraperitoneal
- IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer)
- Ki-67: proteína Ki-67
- LD50: Dosis letal 50
- LDH: enzima constitutiva Lactato Deshidrogenasa
- LMP: límite máximo permisible
- Mez A: Mezcla dosis alta
- Mez B: Mezcla dosis baja
- Mez M: Mezcla dosis media
- Mit: mitosis
- MN: micronúcleo(s)
- MNHEP: micronúcleos en hepatocitos
- MNPCE: micronúcleos en eritrocitos policromáticos
- MO: médula ósea
- NCE: eritrocitos normocromáticos
- NrF2: nuclear factor- erythroid 2 p45 related factor 2
- NVOC: compuestos orgánicos no volátiles (Non- Volatile Organic Compounds)
- PCE: eritrocitos policromáticos
- ROS: especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
- S9: sobrenadante a 9000 g
- SNC: sistema nervioso central
- SVOC: compuestos orgánicos semivolátiles (Semi-Volatile Organic Compounds)
- TCA: ácido tricloroacético
- TE: eritrocitos totales
- Tol: tolueno
- tSO: *trans*-stilbenoxido.
- UPD: uridina 5'-difosfato
- VOC: compuestos orgánicos volátiles (Volatile Organic Compounds)

- VVOC: compuestos orgánicos muy volátiles (Very- Volatile Organic Compounds)
- XRE: elemento de respuesta a xenobióticos (Xenobiotic Response Element)
- BaP-dG: Benzo [a] pireno-desoxiguanosina

3. Antecedentes

3.1. Contaminación ambiental y sus efectos tóxicos en los organismos

3.1.a. Definición de contaminación

El término contaminación o degradación ambiental puede referirse a la alteración de las propiedades de los ecosistemas, debido a que la entrada de contaminantes como sustancias, organismos o formas de energía, rebasan la capacidad del ecosistema para asimilarlas o degradarlas (Albert, 2004). Al disminuir las propiedades ecosistémicas, se pueden transformar los ciclos naturales y su funcionamiento (Navarro *et al.*, 2004).

La contaminación natural, como las erupciones volcánicas y la erosión, ha existido por mucho tiempo; sin embargo, los niveles de contaminación producidos por el humano se han incrementado notablemente a partir de la Revolución Industrial y la Segunda Guerra Mundial, ya que aumentó el consumo de energía, la extracción, producción y/o uso de diversas sustancias que no pueden ser degradadas o asimiladas (Albert, 2004). Por lo tanto, los efectos adversos de la contaminación antropogénica a largo plazo son mayores.

3.1.b. Distribución y efectos tóxicos

Contaminantes de diversos tipos y orígenes pueden acumularse simultáneamente en un medio o sustrato en particular (suelo, agua, aire, alimentos, organismos) o pasar de un medio a otro, por lo que pueden hallarse al mismo tiempo en varios medios (Walker *et al.*, 2006). Según su distribución, los contaminantes pueden producir efectos macroambientales (lejanos al origen del contaminante), microambientales (cerca del origen del contaminante), ecotóxicos (en el ecosistema) o tóxicos (en organismos) (Albert, 2004).

El potencial tóxico de un contaminante depende de su disposición en el interior de un organismo (Lehman-McKeeman, 2008). Los procesos que determinan la disposición de un contaminante (**Fig. 3.1.bi**) considerados como toxicológicamente importantes son la absorción (entrada al torrente sanguíneo), metabolismo (mediante enzimas desintoxicantes), la acción (interacción con una macromolécula endógena), el almacenamiento (en lípidos, membranas, lipoproteínas) y la excreción (en heces u orina) (Walker *et al.*, 2006). Las diferencias en la operación de estos procesos entre las especies, es lo que conllevará a una toxicidad selectiva.

Un organismo puede estar expuesto a los contaminantes mediante diversas vías (ingestión, inhalación, cutánea o en forma combinada) (Lehman-McKeeman, 2008), lo cual repercute en el efecto que los contaminantes pueden tener en la salud del organismo expuesto. Otros aspectos que también influyen en el efecto mencionado son: tiempo y dosis de exposición (exposición aguda, crónica), las características físico-químicas del contaminante y el estado del organismo expuesto (edad, nutrición, sistema inmune, rasgos hereditarios) (Suárez, 2008).

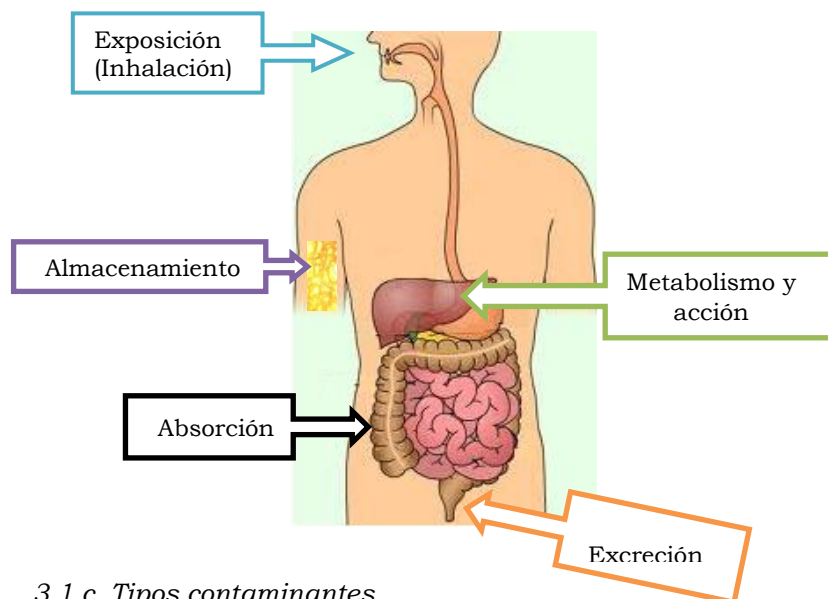


Figura 3.1.bi. Esquema que muestra las ubicaciones representativas en las cuales se llevan a cabo los diversos procesos determinantes de la disposición de un contaminante.

3.1.c. Tipos contaminantes

Algunos ejemplos de contaminantes comunes de origen antropogénico (**Tabla 3.1.ci**) son productos de: combustión (compuestos aromáticos policíclicos), utilizados en la agricultura (plaguicidas), minería (metales pesados), actividades del hogar (detergentes) e industrias (compuestos orgánicos volátiles) (Albert, 2004; Suárez, 2008).

Tabla 3.1.ci. Ejemplos de contaminantes representativos con sus estructuras según el tipo al que pertenecen.

Tipo de contaminante	Contaminante representativo	Estructura
Compuesto aromático policíclico	Benzo (a) pireno	
Plaguicidas	p,p'- DDT	
Metales pesados	Mercurio Cadmio Plomo Arsénico	Me-Hg Cd ²⁺ Pb ²⁺ Arsina (H ₃ As), arsenito (As ⁺³)
Detergente	Alquilsulfonato de sodio	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{O}^- \text{Na}^+$
Compuesto orgánico volátil	Benceno	

3.2 VOC

3.2.a. Propiedades fisicoquímicas

Los compuestos orgánicos forman parte de los contaminantes peligrosos del aire (HAP) y pueden clasificarse como muy volátiles (VVOC), volátiles (VOC), semivolátiles (SVOC) y no volátiles (NVOC) según la presión de vapor que presenten (**Tabla 3.2.ai**). Los SVOC y VOC son los contaminantes más abundantes dentro de los HAP (Spicer *et al.*, 2002).

Tabla 3.2.ai. Características de los compuestos orgánicos clasificados según su volatilidad. *Tomado y modificado de Spicer et al., 2002.*

Clase de volatilidad	Rango de presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Presentación en atmósfera	Número de HAP incluidos en la clase de volatilidad	Ejemplos
VVOC	>380	Vapor	15	Acetaldehído Diclorometano
VOC	0.1 a 380	Vapor	82	Tolueno Cloroformo
SVOC	10 ⁻⁷ a 0.1	Vapor o partícula	63	Bifenilo Naftaleno
NVOC	< 10 ⁻⁷	partícula	5	2-Acetilaminofluoreno

Los VOC son contaminantes comunes del aire, cuya característica más importante desde el punto de vista toxicológico es su alta presión de vapor, la cual les permite evaporarse con rapidez; debido a que estas sustancias llegan al aire con facilidad, son numerosas las posibilidades de exposición a ellos, así como su absorción en cantidades importantes por vía inhalatoria o dérmica, e incluso pueden producir efectos macroambientales (Albert, 2004). La mayoría de los VOC que se encuentran en el aire consisten en hidrocarburos e hidrocarburos oxigenados, así como compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Spicer *et al.*, 2002).

Además de la alta volatilidad, los VOC son lipofílicos, con estructuras formadas con enlaces covalentes; algunos tienen bajos puntos de ebullición e ignición y son inflamables o explosivos, lo cual contribuye a su peligrosidad (Albert, 2004).

3.2.b. Importancia y usos

Muchos de los VOC han estado ligados al desarrollo de la industria petrolera desde mediados del siglo XIX. Actualmente gran variedad de VOC son producidos en la industria, además de los que son generados por el empleo de combustibles fósiles y la desinfección de las aguas (Albert, 2004). A pesar de la gran gama de aplicaciones que tienen los VOC (**Tabla 3.2.bi**), éstos contaminan el ambiente y se conoce que pueden causar graves daños al humano, como: hematotoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y dermatitis por lo cual su estudio es de gran relevancia.

Tabla 3.2.bi. Principales usos de los VOC y sus aplicaciones en distintas actividades

Uso	Aplicación
Disolventes	En pinturas y adhesivos
Intermediarios	Obtención de plásticos, colorantes, pigmentos, tintas, barnices, lacas, resinas, fibras, hules y tiner Formulación de plaguicidas Fabricación de calzado
Componentes	En combustibles y plaguicidas
Limpiadores	Desengrasante de metales Lavado en seco en tintorerías
Extractores	De aceites, grasas, materiales medicinales
Estándares analíticos o reactivos	Laboratorios de investigación y análisis

3.3 Contaminación por VOC en el Río Atoyac

El caso de la contaminación del río Atoyac ejemplifica el impacto que algunos VOC pueden llegar a tener en los organismos que se encuentran expuestos.

Los ríos Atoyac y Xochiac se ubican en la subregión de la Cuenca del Alto Atoyac perteneciente a la región hidrológica del Balsas; a su vez, estos ríos atraviesan los estados de Puebla y Tlaxcala en la subregión del alto Balsas (**Fig. 3.3i**) (DOF,26/01/2011).Dicha región se caracteriza por ser una zona de transición rural-urbana, en la cual se llevan a cabo tanto actividades industriales (empresas textiles, fábricas de productos químicos aromáticos para la industria alimenticia, actividades metalúrgicas) como agrícolas que requieren gran cantidad de agua (Navarro *et al.*, 2004).

Las principales fuentes de contaminación (**Fig.3.3ii**) en la Cuenca Alta del Atoyac proceden de las descargas de origen doméstico y público que constituyen las aguas residuales de origen municipal, residuos sólidos (basura) y las descargas de aguas residuales de origen industrial (de los corredores industriales Quetzalcóatl, Huejotzingo e Ixtacuixtla) (Dictamen de la Cámara de Diputados, expediente 792).

Mediante la elaboración de un monitoreo ambiental se constató la existencia de problemas de contaminación en la Cuenca del Alto Río Atoyac (Navarro *et al.*, 2004). Entre los contaminantes que se identificaron en el río se encuentran: grasas y aceites por encima de los límites permitidos; sólidos suspendidos y sedimentados y una demanda bioquímica de oxígeno que supera los límites máximos; compuestos como fluoruros, diclorometano (DCM), tolueno (Tol) y cloroformo (CLF) en concentraciones elevadas; también materia orgánica (**Tabla 3.3i**). Lo que en conjunto disminuye el oxígeno necesario para la vida acuática normal (Dictamen de la Cámara de Diputados, expediente 792).

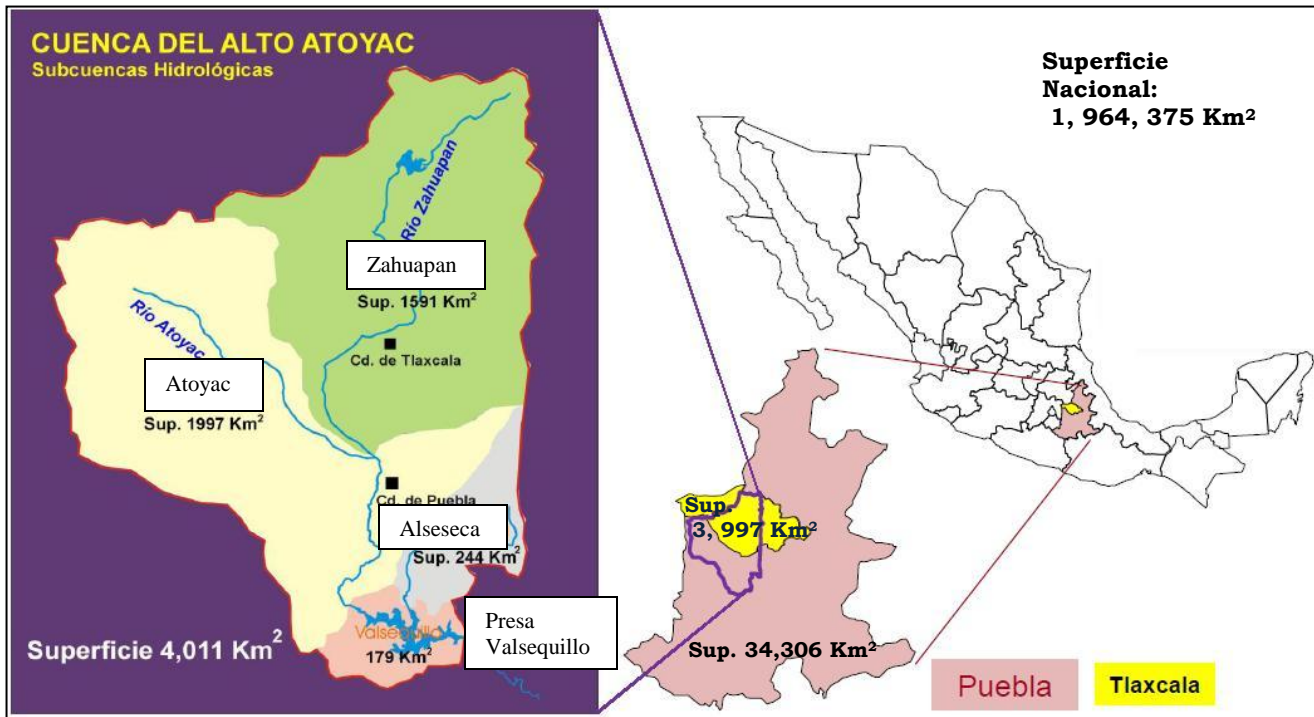


Figura 3.3i. Representación de las áreas de los estados de Puebla y Tlaxcala pertenecientes a la subregión de la Cuenca del Alto Atoyac, así como la ubicación aproximada del Río Atoyac. Tomado y modificado de CONAGUA, 2011.

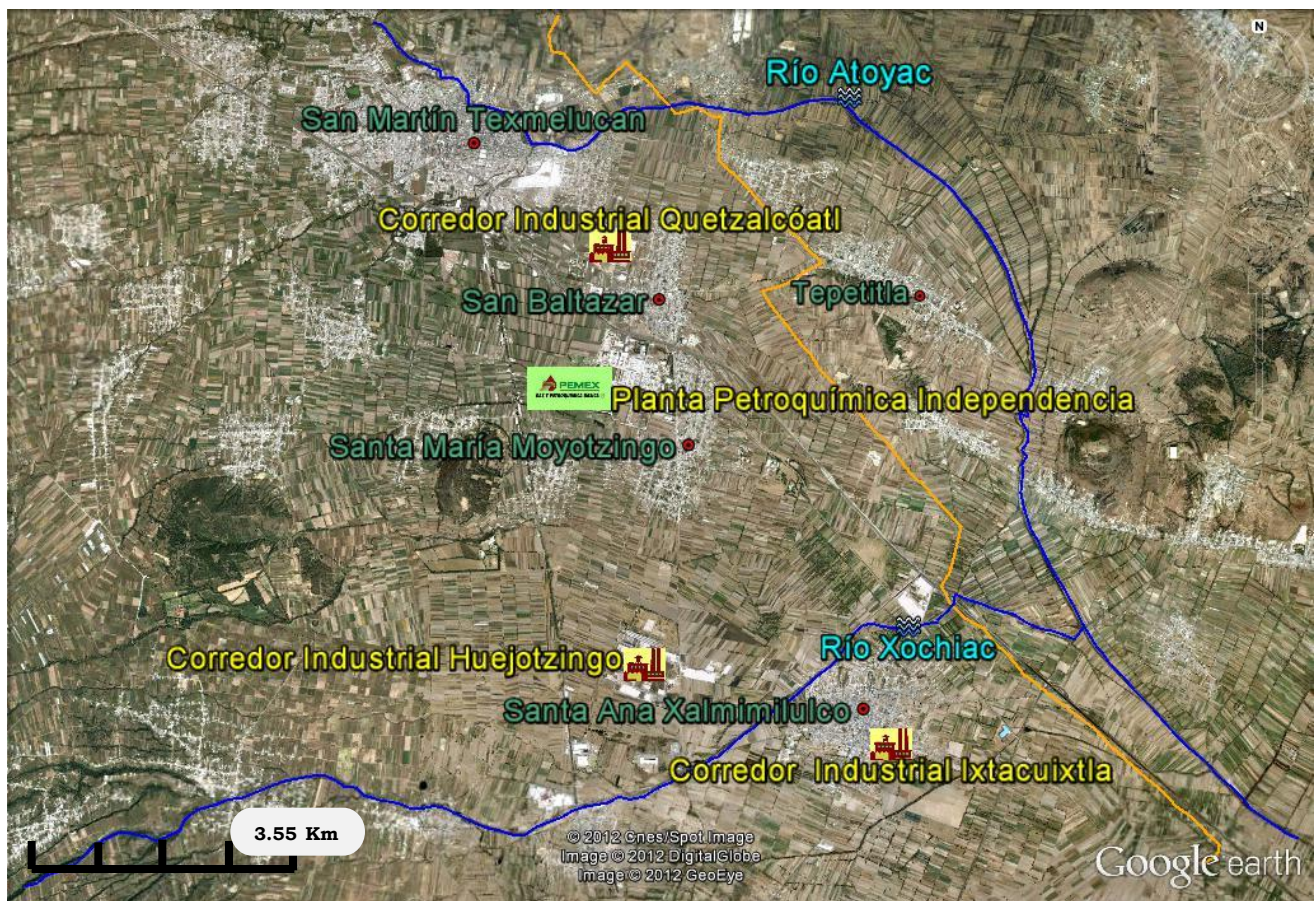


Figura 3.3ii. Imagen satelital en la cual se muestra la ubicación de las principales fuentes de contaminación industrial (títulos en amarillo) de los ríos Atoyac y Xochiac en la zona de la Cuenca Alta del Atoyac. Adicionalmente se indican los nombres de las poblaciones vecinas (títulos en verde). La línea naranja indica el límite político entre Puebla (lado izquierdo) y Tlaxcala (lado derecho).

Tabla 3.3i. Rangos de los valores de parámetros que fueron encontrados en niveles elevados en la Cuenca del Alto Atoyac y sus límites máximos permisibles (LMP) establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996. SST= Sólidos Suspendidos Totales; SS= Sólidos Sedimentables; DBO= Demanda Biológica de Oxígeno; CLF= Cloroformo; DCM= Diclorometano; Tol= Tolueno.
Tomado y modificado de Navarro et al., 2004.

Parámetros	Grasas y aceites (mg/L)	LMP	SST (mg/L)	LMP	SS (mg/L)	LMP	DBO (mg/L)	LMP	Fluoruros (mg/L)	LMP	CLF (µl/L)	LMP	DCM (µl/L)	LMP	Tol (µl/L)	LMP
Rango hallado	25-74	25	135-236	125	3.5-5	2	162-961	150	0.218-0.631	-	6.58-73.88	-	20.36-47.2	-	2.73-21.6	-

A través de un biomonitorio realizado con los habitantes de algunas poblaciones cercanas a las zonas de descarga industrial sobre los ríos Atoyac y Xochiac (Montero *et al.*, 2006) se detectó incremento en el daño genotóxico (daño al material genético) (**Tabla 3.3ii**). Lo anterior reveló asociación positiva entre la exposición ambiental a los contaminantes presentes en los ríos y el daño genotóxico evaluado (micronúcleos). Como los VOC CLF, DCM y Tol se presentaron con una alta frecuencia a lo largo de los ríos, surgió un particular interés en el estudio tanto de sus características fisicoquímicas como tóxicas.

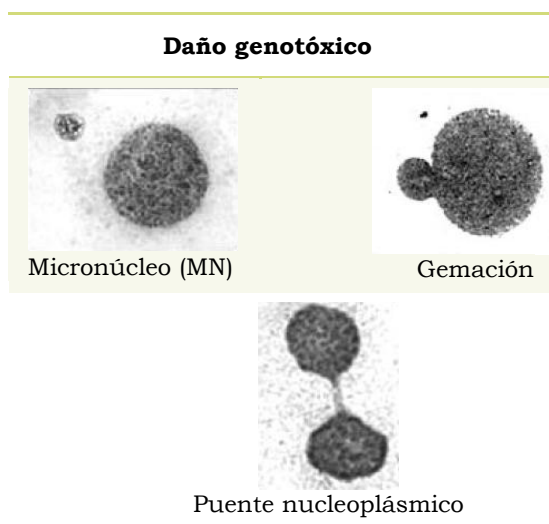


Tabla 3.3ii. Imágenes de algunos tipos de daños genotóxicos (1000X) identificados en la evaluación de linfocitos de los habitantes con viviendas cercanas a los ríos Atoyac y Xochiac. Tomado y modificado de Montero *et al.*, 2006.

3.3.a. Propiedades de los VOC hallados en el río Atoyac

✚ **Cloroformo**

Propiedades fisicoquímicas

El cloroformo es un compuesto halogenado tóxico, volátil y estable que se forma al desinfectar el agua principalmente con hipoclorito (Albert, 2004). Algunas de sus características fisicoquímicas se muestran en la **tabla 3.3.ai**.

Tabla 3.3.ai. Descripción de algunas características fisicoquímicas del cloroformo. Tomado de Spicer *et al.*, 2002.

Fórmula química	Peso Molecular	Fuentes	Clase Química	Clase de volatilidad	Presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L a 25°C)
CHCl ₃	119.4	Cloración de agua; Industria química	Hidrocarburos halogenados	VOC	197	62	8

Efectos tóxicos

La IARC y la EPA clasifican al cloroformo como posible carcinógeno humano (Grupo 2B) ya que existen evidencias suficientes de cáncer de hígado y riñón para roedores (Chou, 1997). Los principales efectos tóxicos que causa el cloroformo se muestran en la **tabla 3.3.a.ii**.

Tabla 3.3.iii. Clasificación de algunos efectos que causa la exposición a cloroformo.

Tipo de efecto	Alteración
Cancerígeno	Produce cáncer de colon y vejiga; así como quistes en hígado y carcinoma hepático en animales (Chou, 1997).
Sistémico	En humanos se ve afectado el sistema nervioso central (SNC), el hígado y los riñones. Además causa fatiga, mareos, dolor de cabeza (Chou, 1997) y arresto respiratorio (Szajewski y Praski, 1990). Se asocia con bajo peso al nacer, así como muerte o malformaciones congénitas (Albert, 2004). Hepatitis tóxica en hijos de mujeres expuestas (Chou, 1997).

Toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

El CLF se halla presente en el ambiente como resultado de la actividad industrial y la cloración del agua, por lo tanto el cloroformo se encuentra principalmente en agua potable, piscinas, descargas municipales e industriales (Chou, 1997). Una vez ocurrida la exposición, el CLF llega a torrente sanguíneo (proceso de absorción), mediante la vía oral (ingestión), inhalatoria (ducha) o dérmica (natación), distribuyéndose en todo el organismo, principalmente en tejido adiposo, hígado y riñón (Albert, 2004). Los últimos dos son considerados como órganos blanco (Watts *et al.*, 2004).

El CLF puede ser biotransformado (metabolizado) en otros compuestos químicos (metabolitos), a través de reacciones mediadas por enzimas en los diferentes órganos. El hígado es el principal donde se lleva a cabo el metabolismo del CLF (**Fig.3.3.ai**) por enzimas denominadas citocromos P450 (CYP), las cuales se caracterizan por realizar reacciones de óxido-reducción (metabolismo de fase I). El fosgeno es un metabolito del CLF que posee una alta reactividad y puede causar efectos tóxicos al unirse covalentemente a biomoléculas como proteínas, lípidos, glutatión, entre otras (Chou, 1997 y Albert, 2004). Algunos otros metabolitos del cloroformo pueden ser excretados del cuerpo mediante la exhalación, y sólo una menor parte mediante orina y heces (Chou, 1997).

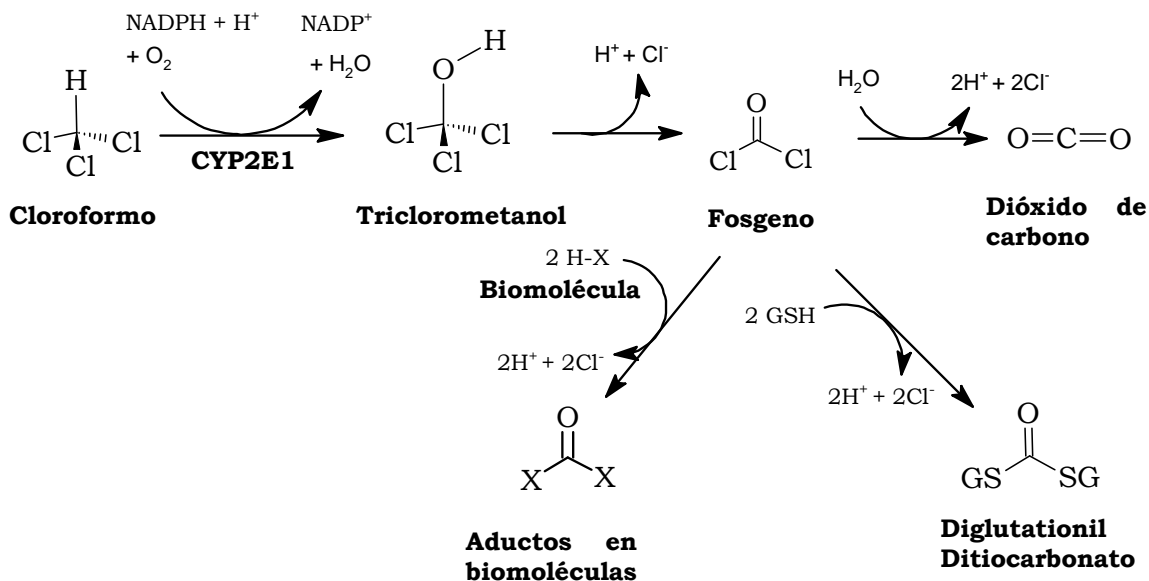


Figura 3.3.ai. Biotransformación del cloroformo a fosgeno: El cloroformo es transformado en triclorometanol por la familia de enzimas CYP, principalmente por la isoforma CYP2E1 y posteriormente sufre una deshalogenación espontánea para producir fosgeno, el cual al hidrolizarse

produce dióxido de carbono (CO₂) que se elimina por exhalación. La proporción de fosgeno que no se convierte en CO₂ puede unirse a proteínas y lípidos. Sin embargo tras tener una deshalogenación reductora puede formar conjugados con el glutatión (GSH), generando así intermediarios mutagénicos como el diglutatiónil ditiocarbonato. *Tomado y modificado de Chou, 1997 y Albert, 2004.*

☒ **Diclorometano**

Propiedades fisicoquímicas

El diclorometano es un compuesto orgánico cuya presencia en el ambiente se atribuye principalmente a la actividad industrial. Entre sus características fisicoquímicas (**Tabla 3.3.a.iii**), la que determina su rango de uso es su propiedad como disolvente (ROC, 2011).

Tabla 3.3.a.iii. Descripción de algunas características fisicoquímicas del diclorometano. *Tomado de Spicer et al., 2002.*

Fórmula química	Peso Molecular	Fuentes	Clase química	Clase de volatilidad	Presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L a 25°C)
CH ₂ Cl ₂	84.9	Industria química: remoción del disolvente en pinturas	Hidrocarburos halogenados	VVOC	435	40	13.2

Efectos tóxicos

El diclorometano es una sustancia tóxica clasificada por la IARC como posible carcinógeno humano (Grupo 2B) debido a que se cuenta con evidencias suficientes para roedores (ROC, 2011). Los principales efectos tóxicos que causa el diclorometano se muestran en la **tabla 3.3.a.iv**.

Tabla 3.3.a.iv. Clasificación de algunos efectos que causa la exposición a diclorometano.

Tipo de efecto	Alteración
Cancerígeno	Produce carcinoma hepático en animales (Albert, 2004).
Sistémico	Afecta el SNC, la actividad motora, la estructura hepática (infiltración grasa); disminuye la respiración (WHO, 2000). En humanos causa mareos, náusea, entumecimiento y adormecimiento de los dedos de pies y manos, entorpecimiento, embriaguez, pérdida de la consciencia, irritación y quemaduras de los ojos y daño a la córnea (Wilson <i>et al.</i> , 2000). También produce aumento de la enfermedad coronaria e infartos al miocardio, así como un aumento de carboxihemoglobina (Albert, 2004). Produce anormalidades de los espermatozoides y disminución en la calidad del semen (Albert, 2004). Provoca pequeños efectos en peso materno y del feto (WHO, 2000).

Toxicocinética: administración, distribución, metabolismo y excreción

La vía de exposición más común para el diclorometano es la inhalatoria, aunque también puede ser dérmica o por ingestión. En general, la absorción sucede de manera rápida y la

distribución se dirige mayoritariamente al hígado, tejido graso, riñón, cerebro y pulmones; sin embargo, no se presenta acumulación significativa en los tejidos (bioacumulación) (Wilson *et al.*, 2000).

En cuanto al metabolismo de éste VOC es relevante mencionar que puede ser biotransformado mediante las enzimas CYP (en particular CYP2E1) o a través de la enzima Glutación-S-Transferasa θ 1 (**Fig.3.3.aii**). Ambas vías producen metabolitos tóxicos (Ej. dióxido de carbono, monóxido de carbono y formaldehído) (Wilson *et al.*, 2000). La preferencia por la vía metabólica depende de las concentraciones a las que el organismo se encuentre expuesto. La vía de CYP ocurre con mayor frecuencia a bajas concentraciones (<500ppm \approx 2mmol/kg), pero al aumentar la concentración (>500ppm), ésta se satura y se activa la vía de GSTT1-1 (Thier *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000).

Al final, tanto el diclorometano como sus metabolitos son excretados del cuerpo mayoritariamente mediante la exhalación y en una menor proporción mediante la orina y heces (Wilson *et al.*, 2000).

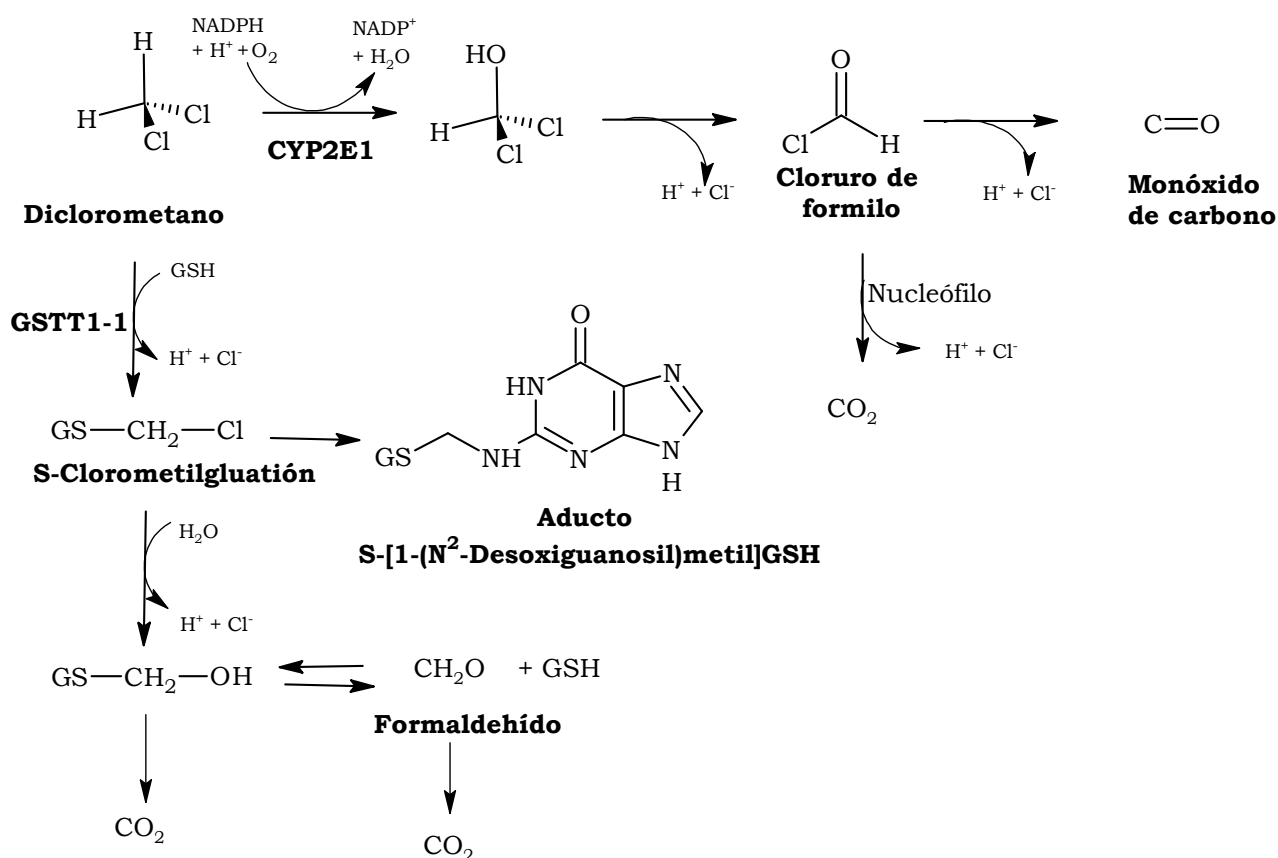


Figura 3.3.aii. Metabolismo del DCM mediante la vía de CYP y de GSTT1-1: 1) La isoforma CYP2E1 metaboliza el DCM en monóxido de carbono (CO) y CO_2 a través de un intermediario reactivo: el cloruro de formilo. 2) La GSTT1-1 interviene en el metabolismo de fase II (reacciones de conjugación) ya que conjuga al GSH con DCM para formar S-clorometil glutación, el cual al ser deshalogenado origina formaldehído; a partir de éste se produce CO_2 , el cual a su vez será excretado del cuerpo. Tomado y modificado de Wilson *et al.*, 2000 y WHO, 2000.

☒ Tolueno

Propiedades fisicoquímicas

El tolueno es una sustancia incolora y con un olor distintivo, el cual es producido en el proceso de obtención de gasolinas y otros combustibles (Dorsey *et al.*, 2000). A continuación se muestra la **tabla 3.3.av** con algunas características fisicoquímicas de este VOC.

Tabla 3.3.av. Descripción de algunas características fisicoquímicas del tolueno. *Tomado de Spicer et al., 2002.*

Fórmula química	Peso Molecular	Fuentes	Clase química	Clase de volatilidad	Presión de vapor (mm Hg a 25°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L a 25°C)
C ₇ H ₈	92.1	-Petróleo -disolventes -gasolina	Hidrocarburos aromáticos	VOC	28.6	111	0.53

Efectos tóxicos

La IARC considera al tolueno en el grupo 3, no clasificable como carcinógeno para el hombre (IARC, 1999). La EPA determinó que el tolueno no es clasificable por su carcinogenicidad (Dorsey *et al.*, 2000). Los principales efectos tóxicos que causa el tolueno se describen en la **tabla 3.3.avi**.

Tabla 3.3.avi. Clasificación de algunos efectos que causa la exposición a tolueno.

Tipo de efecto	Alteración
Cancerígeno	No hay efectos cancerígenos (WHO, 2000; Dorsey <i>et al.</i> , 2000).
Sistémico	El principal efecto es daño al cerebro. Ocasiona dolor de cabeza, mareos, somnolencia, incapacidad de concentración, confusión, debilidad, náusea, problemas para hablar, oír y ver; pérdida de memoria y del apetito; falta de control motriz (Dorsey <i>et al.</i> , 2000). Causa irritación en las mucosas de nariz y garganta, así como en las conjuntivas oculares; provoca albuminuria y daño renal (Albert, 2004). Incremento de riesgo en abortos espontáneos; disminución de la hormona luteinizante, folículo estimulante y testosterona en machos (Dorsey <i>et al.</i> , 2000).

Toxicocinética: administración, distribución, metabolismo y excreción

La manera más común en que el tolueno puede ingresar al organismo es después de haber una exposición por inhalación, contacto dérmico e ingestión de comida o agua contaminada (WHO, 2000). Cuando este VOC es absorbido, se concentra principalmente en tejido adiposo, cerebro, pulmón y médula ósea; también se distribuye en hígado y riñón en menor concentración (Dorsey *et al.*, 2000). La bioacumulación se presenta en el tejido adiposo y médula ósea (WHO, 2000).

Generalmente, el organismo metaboliza al tolueno en compuestos químicos menos dañinos (Ej. ácido hipúrico) mediante enzimas de fase I (CYP) y fase II (Ej. Glutación-S-transferasas o GST) (**Fig.3.3.iii**). El ácido hipúrico es el metabolito mayoritario del Tol, mientras que los metabolitos minoritarios según su orden decreciente en abundancia son: el conjugado glucuronil del ácido benzoico, los conjugados de sulfatos y glucurónidos del cresol, el ácido S-bencilmercaptúrico, y el ácido S-p-toluilmercaptúrico. Un 75% del tolueno absorbido y sus metabolitos son excretados dentro de las siguientes 12 horas mediante exhalación u orina (Dorsey *et al.*, 2000).

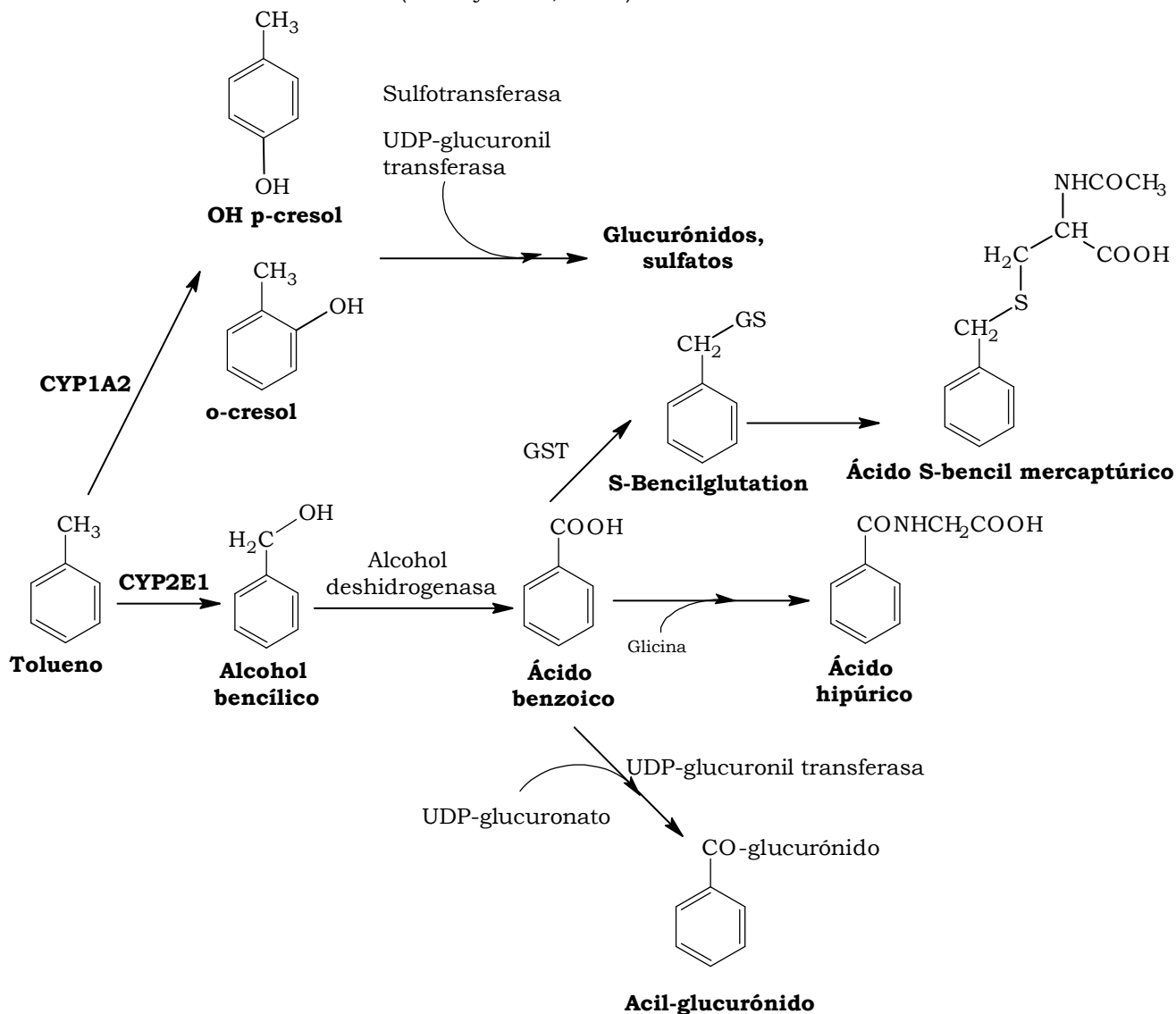


Figura 3.3.iii. Metabolismo del tolueno: El primer paso de la vía metabólica ocurre mediante CYP2E1 que produce alcohol bencílico, el cual posteriormente originará al ácido benzoico. La mayoría de este ácido es conjugado con glicina para formar el ácido hipúrico, y una pequeña porción puede conjugarse con el UDP-glucuronato para constituir el acil-glucurónido. Entre el 1-5% del Tol absorbido es convertido en cresol por la isoforma CYP1A2, el cual es conjugado con sulfatos o glucuronatos para ser eliminados vía orina. Tomado y modificado de Dorsey *et al.*, 2000.

3.3.b. Estudios de genotoxicidad

En la **tabla 3.3.bi** se presentan algunos efectos genotóxicos reportados para el cloroformo, diclorometano y tolueno. De acuerdo a los datos de genotoxicidad conocidos para estos VOCs, se determina que:

- El cloroformo es un mutágeno débil con un bajo potencial de interacción con el ADN (Chou, 1997), pues la mayoría de los ensayos de genotoxicidad tienen resultados negativos. Los resultados positivos de genotoxicidad se deben a la producción de metabolitos reactivos y a la alteración de la proliferación celular (Watts *et al.*, 2004).
- El diclorometano se considera como un mutágeno débil en mamíferos (WHO, 2000). Su genotoxicidad depende de la capacidad que tenga cada tejido para metabolizar al DCM; ya que el metabolismo puede ocurrir por vía de GSTT1-1, los efectos genotóxicos serán diferentes dependiendo del fenotipo de GSTT1-1 (Wilson *et al.*, 2000).
- El tolueno se considera como no mutagénico y no genotóxico según la mayoría de resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* (Dorsey *et al.*, 2000).

Tabla 3.3.bi. Efectos genotóxicos en humanos y animales (*in vitro* e *in vivo*) que son causados por los principales VOCs encontrados a lo largo del río Atoyac, Tlaxcala.

VOC	Organismo	Tipo de estudio	Efecto
Cloroformo	Humano	<i>In vivo</i>	Sin datos
		<i>In vitro</i>	Incremento de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos (Chou, 1997).
	Animal (ratones, Saltamontes, rata)	<i>In vivo</i>	Incremento en frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en células de médula ósea de ratón; arresto mitótico en embriones de saltamontes (Chou, 1997). Inducción de micronúcleos en riñón e hígado de rata; daño cromosómico en médula ósea de rata (Watts <i>et al.</i> , 2004).
		<i>In vitro</i>	Mutaciones en células de linfoma ante activación metabólica (Chou, 1997).
Diclorometano	Humano	<i>In vivo</i>	Sin datos
		<i>In vitro</i>	Formación dosis-dependiente de aductos de formaldehído con ARN en hepatocitos (Wilson <i>et al.</i> , 2000).
	Animal (Hámster chino, ratones, rata)	<i>In vivo</i>	Detección de rompimiento de ADN en hígado y pulmón de ratones; rompimiento de ADN en hígado de rata; intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos periféricos y células pulmonares de ratón; Producción de micronúcleos en eritrocitos periféricos de ratón; aberraciones cromosómicas en células de médula ósea y pulmón en ratón (Wilson <i>et al.</i> , 2000).
		<i>In vitro</i>	Inducción de rompimiento del ADN en células ováricas de hámster y en hepatocitos de ratón; formación de aductos de formaldehído con ARN en hepatocitos de ratón, rata y hámster; aberraciones cromosómicas en hámster chino y en linfoma de ratón (Wilson <i>et al.</i> , 2000).
Tolueno	Humano	<i>In vivo</i>	Incremento en la incidencia de rompimiento de cromátidas hermanas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas en trabajadores expuestos a tolueno y a otros compuestos; aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos (Dorsey <i>et al.</i> , 2000).
		<i>In vitro</i>	Sin resultados positivos
	Animal (saltamontes, rata)	<i>In vivo</i>	Arresto mitótico en saltamontes; aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de rata (Dorsey <i>et al.</i> , 2000). Inducción de micronúcleos en médula ósea en rata (Mohtashampur <i>et al.</i> , 1985).
		<i>In vitro</i>	Sin resultados positivos

3.4 Biomarcadores

Un biomarcador es cualquier respuesta biológica a un compuesto químico que demuestra un alejamiento del estatus normal (Walker *et al.*, 2006); es considerado como biomarcador la sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en un organismo, por ejemplo: las señales o eventos bioquímicos, moleculares, genéticos, inmunológicos o fisiológicos (Stern *et al.*, 2001). El uso de un biomarcador permite mejorar la evaluación de la exposición ante cualquier compuesto, así como vislumbrar un panorama del mecanismo de los efectos que dichos compuestos producen (Rothman *et al.*, 1995) y permite la predicción de la incidencia de una enfermedad en particular (Stern *et al.*, 2001).

El esquema de clasificación de biomarcadores elaborado por el Comité de Marcadores Biológicos, incluye las siguientes categorías: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad (CBMNRC, 1987). En la **tabla 3.4i** se muestran más detalles de los diferentes tipos de biomarcadores.

Tabla 3.4i. Esquema de clasificación de biomarcadores: biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad.

Categoría	Definición	Ejemplo
Exposición	Indican si el organismo estuvo expuesto a algún compuesto químico, pero no dan información sobre el grado del efecto adverso causado (Stern <i>et al.</i> , 2001). Incluye a sustancias exógenas en el interior de un individuo, metabolitos o cualquier otro evento relacionado con la exposición (CBMNRC, 1987).	Formación de aductos (Ej. aducto de BaP-dG). Metabolitos excretados (Ej. ácido hipúrico).
Efecto o respuesta	Indica un componente endógeno del sistema biológico, una medida de una capacidad funcional del sistema, o un estado alterado del sistema que es predictivo de un deterioro en la salud producido por una exposición (CBMNRC, 1987). Incluye precursores tempranos de un proceso de enfermedad.	Alteración de actividad enzimática (Ej. las GST, CYP). Daño genotóxico (Ej. MN). Alteración en proliferación celular
Susceptibilidad	Indica si la salud en un organismo es especialmente sensible ante la exposición a un xenobiótico (CBMNRC, 1987).	Estado nutricional Presencia de polimorfismos (Ej. GSTT1-1 nulo).

3.4.a. GST

◆ Función y mecanismo de acción

Las GST son una familia de enzimas ubicuas cuya actividad catalítica fue descubierta en 1961 (Armstrong, 1997) en tejidos de mamíferos (Zimniak y Singh, 2007). Sus funciones han sido clasificadas en dos categorías:

1. La función principal es fungir como proteínas de unión y catalizar la conjugación de compuestos electrofilicos e hidrofóbicos con el tripéptido GSH, con lo que participan en el metabolismo de fase II. Dicha conjugación

se relaciona con la neutralización o desintoxicación de compuestos dañinos exógenos (plaguicidas, herbicidas, carcinógenos, etc).

- La otra gran función es proteger contra compuestos endógenos producidos durante el daño oxidante a los lípidos (Ej. acroleína, crotonaldehído, 4-hidroxinonenal) y ácidos nucleicos (bases propenales ADN) (Chiang *et al.*, 2007).

La información estructural de las GST ha permitido comprender los mecanismos catalíticos de su participación en la desintoxicación de electrófilos. De manera general, las GST catalizan la siguiente reacción (**Fig.3.4.ai**), donde **R** representa un compuesto con un centro electrofílico y **X** un grupo saliente:



Figura 3.4.ai. Mecanismo de reacción entre GSH y un compuesto electrofílico que es mediado por GST. La mayoría de las GST presentan un residuo de tirosina que les permite llevar a cabo la conjugación entre el GSH y el compuesto electrofílico.

◆ Inducción

La inducción en la expresión de las GST puede ser influenciada por compuestos naturales de la dieta, antioxidantes sintéticos, agentes depresores de GSH y agentes quimiopreventivos (Sherrat *et al.*, 1998). Se considera que dicha expresión forma parte de un proceso de adaptación que permite a la célula sobrevivir a la exposición a xenobióticos dañinos y productos de estrés oxidante que pueden ser carcinogénicos (Jowsey y Hayes, 2007).

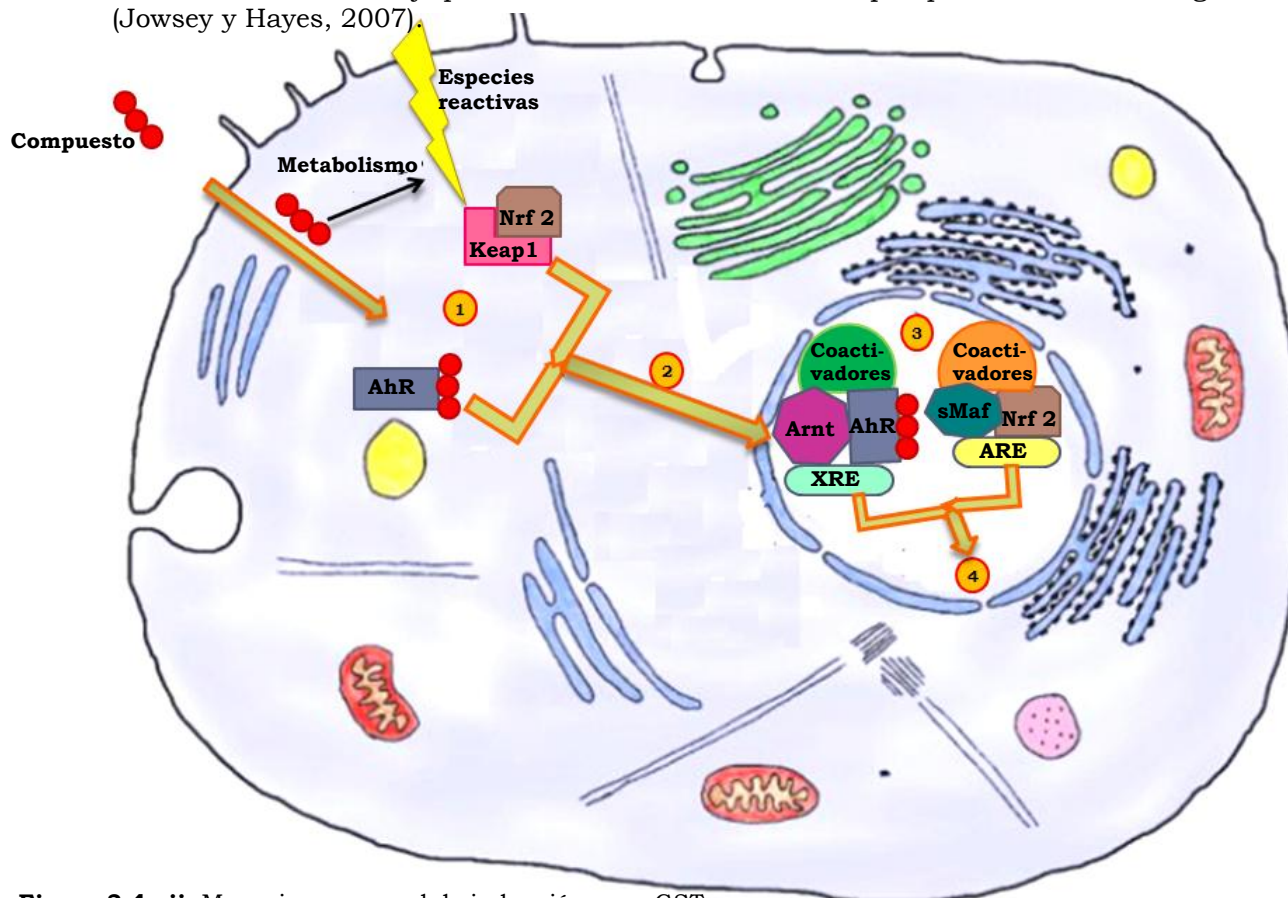


Figura 3.4.ii. Mecanismo general de inducción para GSTs:

- Activación del factor de transcripción (Nrf2, AhR [ver inducción de GSTT1-1]);
- Translocación del receptor al núcleo;
- Interacción de factor de transcripción con elementos de respuesta (ARE, XRE [ver inducción de GSTT1-1]);
- Transcripción del gen (GST). Tomado y modificado de Wakabayashi *et al.*, 2010.

En cuanto a la inducción de las GST en ratas ante condiciones de estrés oxidante (desbalance entre especies oxidantes y antioxidantes) y la exposición a distintos xenobióticos (de los cuales la mayoría cuentan con un centro electrofílico), se sabe que el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la modulación de la transcripción es a través del factor de transcripción NrF2 (nuclear factor- erythroid 2 p45 related factor 2) y del elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) (Jowsey y Hayes, 2007). En la **fig.3.4.iii** se representa el mecanismo general de inducción.

◆ Clasificación

La mayoría de las GST y las más estudiadas, se encuentran en el citosol; sin embargo, también se pueden localizar unidas a membranas (retículo endoplásmico) (Armstrong, 1997). Las GST citosólicas se encuentran en forma de homodímeros o heterodímeros con subunidades de 26 kDa aproximadamente (Raza *et al.*, 2002); sin embargo los heterodímeros se conforman entre subunidades de la misma clase (Armstrong, 1997).

Las GST canónica o citosólicas se dividen en clases (**Tabla 3.4.ai**) según su similitud en la secuencia de aminoácidos, por lo que enzimas pertenecientes a la misma clase presentan un 40% o más de similitud en su secuencia (Zimniak y Singh, 2007). Existen por lo menos siete clases de GSTs citosólicas (Hayes *et al.*, 2005) que pueden distinguirse en los humanos (alfa (α), mu (μ), pi (π), sigma (σ), theta (θ), zeta (ζ) y omega (ω)).

Tabla 3.4.ai. Clases de GST citosólicas, sus isoformas y sustratos representativos. Tomado de Ketterer, 1998 ^c, Hayes *et al.*, 2005 ^b y Zimniak y Singh, 2007 ^a.

Clases	Isoformas de GSTs	Sustrato representativo
Alfa ^{ab}	GSTA1-1 ^a , GSTA2-2 ^c , GSTA3-3 ^c , GSTA4-4 ^a , GSTA5-5 ^c	4-hidroxi non-2-enal
Mu ^{ab}	GSTM1-1 ^c , GSTM2-2 ^c , GSTM3-3 ^c , GSTM4-4 ^c , GSTM5-5 ^c	Cloruro de 4-nitrobencilo
Omega ^{ab}	GSTO1-1 ^b , GSTO2-2 ^b	Ácido dehidroascórbico
Pi ^b	GSTP1-1 ^c	Acroleína
Sigma ^{ab}	GSTS1-1 ^b	4-hidroxi nonenal
Theta ^b	GSTT1-1 ^c , GSTT2-2 ^c	Diclorometano
Zeta ^{ab}	GSTZ1-1 ^c	Dicloroacetato

◆ Nomenclatura

La nomenclatura de las GST citosólicas en vertebrados se describe a continuación: los monómeros de las GST son nombrados por una letra mayúscula que designa la clase, seguida por un número arábigo que determina el orden cronológico en el que fue reportada la secuencia de la subunidad dentro de su clase (por ejemplo: GSTA1 y GSTA2). Para denotar el tipo de dímero se usa un guión y el número 1 (ej. GSTA1-1) si se trata de un homodímero, y un guión y el número 2 si es un heterodímero (ej. GSTA1-2) (**Tabla 3.4.ai**) (Zimniak y Singh, 2007).

◆ Isoforma GSTT1-1

GSTT1-1 es una enzima homodimérica (**Fig.3.4.iii**) que se expresa en hígado, pulmón, riñón, cerebro, músculo esquelético, corazón, intestino delgado, bazo, eritrocitos (Chiang *et al.*, 2007), pero no en los linfocitos (Juronen *et al.*, 1996). Esta enzima metaboliza productos endógenos de estrés oxidante (peroxidación lipídica y del ADN), así como xenobióticos y sus metabolitos (Ej. compuestos volátiles carcinógenos) (Sherrat *et al.*, 1997). La contribución de la GSTT1-1 al metabolismo de los productos derivados de estrés oxidante depende del perfil y concentración enzimática del tejido en cuestión (Ketterer, 1998). Algunos sustratos que metaboliza GSTT1-1 se presentan en la **tabla 3.4.iii**.

Algunos compuestos que inducen a GSTT1-1 son agentes quimiopreventivos de cáncer tanto sintéticos (Ej. etoxiquina, hidroxianisol butilado, oltipraz), como naturales (Ej. cumarina, bencil isotiocianato) (Sherrat *et al.*, 1998), dicha inducción se puede medir a nivel de ARN mensajero (ARNm), de la cantidad de la subunidad de la enzima y de la actividad catalítica (Mainwaring *et al.*, 1996; Sherrat *et al.*, 1998).

Esta isoforma tiene una expresión génica determinada por mecanismos distintos a aquellos que regulan a las otras GST. El hecho de que GSTT1-1 es inducible por antioxidantes y xenobióticos sugiere que su mecanismo de inducción incluye un ARE. Además, se conoce que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el metabolismo de algunos xenobióticos (Ej. oltipraz), induce a GSTT1-1 (Sherrat *et al.*, 1998) por el mecanismo de ARE; sin embargo, existe evidencia que indica que el mecanismo de inducción de esta isoforma incluye al receptor de aril hidrocarburos (AhR), el cual se une con el xenobiótico para activar al elemento de respuesta a xenobióticos (XRE).

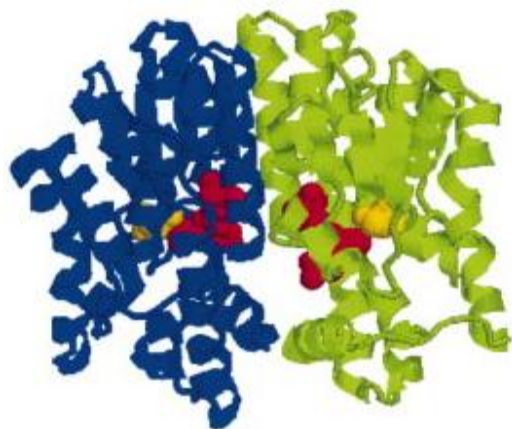


Figura 3.4.iii. Estructura homodimérica de la GST clase Theta de humano. Las subunidades se distinguen en color verde y azul. En esta clase hay un residuo de serina representado en color amarillo, que es esencial catalíticamente. El sitio activo se encuentra identificado con rojo. Tomado de Sheehan *et al.*, 2001.

Tabla 3.4.iii. Sustratos endógenos y exógenos (xenobióticos) que metaboliza GSTT1-1, así como su procedencia. Tomado de Sherrat *et al.*, 1997^a; Sherrat *et al.*, 1998^b y Ketterer, 1998^c.

Sustrato	Tipo de sustrato
1,2,3,4-diepoxibutano butadieno ^a	xenobiótico
Óxido de etileno ^c	Producto de estrés oxidante
Hidroperóxido de cumeno ^{ac}	Producto de estrés oxidante
DCM ^a	Xenobiótico (dihaloalcano)
Dibromoetano ^a	Xenobiótico (dihaloalcano)
Dibromometano ^a	Xenobiótico (dihaloalcano)
Óxido trans-stilbeno (tSO) ^b	Inductor modelo, sintético

◆ Bioactivación por GSTT1-1 y su relación con genotoxicidad

La conjugación de GSH con xenobióticos comúnmente genera productos relativamente inactivos que son eliminados por la célula. En ciertos casos, el conjugado formado es bioactivo, es decir, el conjugado producido es más reactivo que el compuesto padre. La mayoría de los compuestos químicos que presentan bioactivación mediante GST son pequeños electrófilos como: metanos, etanos o butanos que contienen haluros o epóxidos; por ejemplo, los dihaloalcanos como: diclorometano (DCM), dibromometano y dibromoetano (Sherrat *et al.*, 1997), los cuales son metabolizados por GSTT1-1 (**Fig.3.4.aiv**).

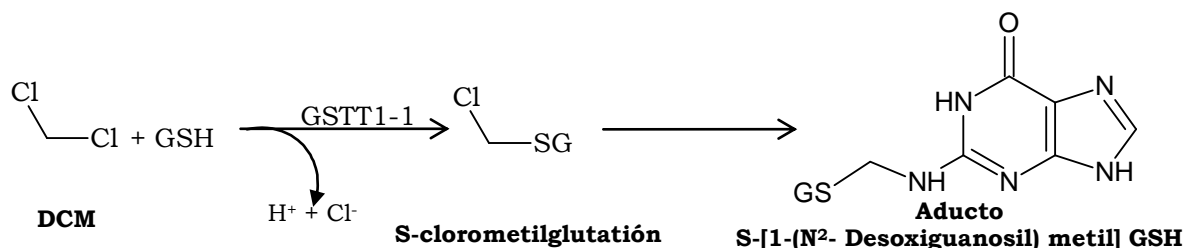


Figura 3.4.aiv. Conjugación del DCM con GSH que desemboca en una bioactivación del conjugado y una subsecuente formación de aductos con bases del ADN.

Cuando se constituye un conjugado reactivo (Ej. S-clorometilglutatión), éste tiende a reaccionar con macromoléculas; en el caso de reaccionar con el ADN, el conjugado produce daño genotóxico, pues ataca las bases de los nucleótidos y forma aductos (Sherrat *et al.*, 1997). Debido a lo anterior, se piensa que la GSTT1-1 juega un papel crítico en el desarrollo de susceptibilidad ante efectos carcinogénicos (Sherrat *et al.*, 1998).

3.4.b. Micronúcleos (MN)

➤ Concepto y mecanismo de formación

Los MN son pequeños núcleos constituidos de algún cromosoma entero o fragmentos cromosómicos que se rezagaron en la división celular y por lo tanto no pudieron incorporarse al núcleo de la célula hija (Norppa, 2004). Desde inicios del siglo XX los científicos realizaron descripciones de estas estructuras, a las cuales en un inicio se les denominó como cuerpos de Howell-Jolly; sin embargo, fue hasta la década de los 70s que se sugirió por primera vez el término MN por Boller y Schmidt (Decodier, 2006).

La formación de los MN se atribuye a dos mecanismos (**Fig.3.4.bi**): el rompimiento de cromosomas (clastogénesis) y la alteración de la maquinaria de la segregación cromosómica (aneugénesis) (Müller y Streffer, 1994); la clastogénesis origina MN con fragmentos cromosómicos, y la aneugénesis da lugar a MN con cromosomas enteros. Es importante remarcar que la división mitótica o meiótica es necesaria para que se formen los MN, por lo que cuando se realiza una evaluación de MN ante la exposición de una sustancia de estudio, se considera obligatorio el uso de un tejido en proliferación (Suzuki *et al.*, 2004) y la evaluación de la división celular (Decodier, 2006).

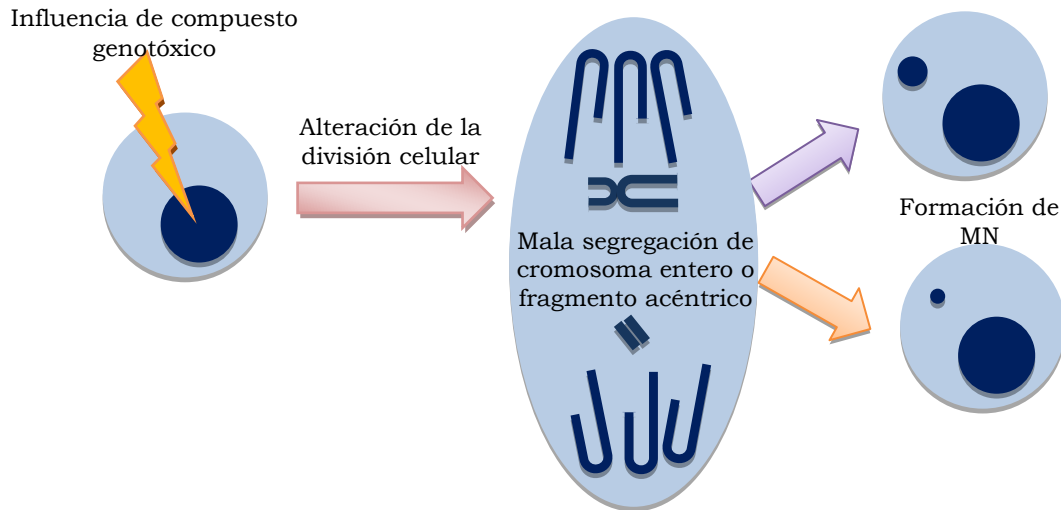


Figura 3.4.bi. Mecanismos de formación de MN. Un compuesto genotóxico puede provocar la clastogénesis o aneugénesis cromosómica y así promover la producción de MN.

➤ **Importancia**

Algunos compuestos carcinógenos son también genotóxicos (ej. benceno), lo cual genera grandes sospechas sobre la existencia de una relación causal entre genotoxicidad y carcinogenicidad, pues cuando se dividen las células que tienen daño genético, se pueden originar células mutantes (Walker *et al.*, 2006).

Para poder evaluar la exposición a agentes genotóxicos y potencialmente carcinógenos se realizan pruebas de genotoxicidad como la de MN (CBMNR, 1987). Se considera que una elevación significativa de los niveles de este biomarcador es un fuerte indicativo de que hubo una exposición a sustancias potencialmente clastogénicas (Parton y Garriot, 1997) y probablemente carcinogénicas (Norppa, 2004).

Algunos estudios epidemiológicos que sustentan la predicción de cáncer cuando existe incremento en la frecuencia de MN (Bonassi *et al.*, 2007; Bonassi *et al.*, 2011) han empleado linfocitos de sangre periférica.

➤ **Modelos utilizados**

La evaluación de MN se puede realizar en modelos *in vitro* e *in vivo*. Para estudios sobre efectos en humanos, el tejido más utilizado son los linfocitos de sangre periférica (Decodier, 2006); sin embargo, para detectar la genotoxicidad de mutágenos posterior a una exposición *in vivo* en mamíferos, el tejido que se utiliza con mayor frecuencia es la médula ósea (MO) (Parton y Garriot, 1997), pues es un tejido que se encuentra en constante proliferación (Suzuki *et al.*, 2004). La **tabla 3.4.bi** enlista algunos otros tipos celulares que se utilizan para evaluar MN.

Tabla 3.4.bi. Ejemplos de células y órganos utilizados para la evaluación de MN y el tipo de modelo al que corresponden.

Modelo	Tejidos u órganos que se utilizan
In vivo	Eritrocitos policromáticos de médula ósea (Krishna y Hayashi, 2000); hepatocitos (Parton y Garriot, 1997); riñón (Watts <i>et al.</i> , 2004); eritrocitos periféricos (Wilson <i>et al.</i> , 2000); espermátidas (Cliet <i>et al.</i> , 1993); células de mucosa bucal (Angelieri <i>et al.</i> , 2010), linfocitos de sangre periférica (Fenech, 2006).
In vitro	Linfocitos de sangre periférica (Decodier, 2006); hepatocitos (Suzuki <i>et al.</i> , 2004), entre otros.

La evaluación *in vivo* de la frecuencia de MN es especialmente relevante debido a que incluye factores como el metabolismo, la farmacocinética, y los procesos de reparación de ADN, así como también es útil en investigación complementaria de los efectos mutagénicos detectados en ensayos de genotoxicidad *in vitro* (Krishna y Hayashi, 2000). Además, los ensayos *in vivo* son recomendados por agencias reguladoras alrededor del mundo para evaluar la seguridad de ciertos productos.

En el ensayo de MN en MO, las células que se evalúan son los eritrocitos policromáticos (PCE) (**Fig.3.4.bii**), los cuales se ubican, en el proceso de maduración de eritrocitos (eritropoyesis), inmediatamente después del proceso de enucleación (expulsión del núcleo). Los PCE son eritrocitos jóvenes que aún contienen RNA, por lo que se tiñen ligeramente de azul con el colorante Giemsa (Krishna y Hayashi, 2000).

Debido a que algunos compuestos clastogénicos y sus metabolitos reactivos son de tiempo de vida media muy corto y no llegan a la MO o llegan en una concentración insuficiente como para inducir MN, se ha sugerido al hígado como tejido alternativo para detectar la inducción de MN. Desde 1980 se comenzó a utilizar el ensayo de MN en hepatocitos (MNHEP) (Suzuki *et al.*, 2004). No obstante, ni el ensayo de MN en MO ni el de MNHEP son totalmente predictivos de una actividad clastogénica. Cuando se realiza la evaluación de ambos tejidos utilizando el mismo animal, puede obtenerse un perfil clastogénico más completo del compuesto en cuestión (Parton y Garriot, 1997).

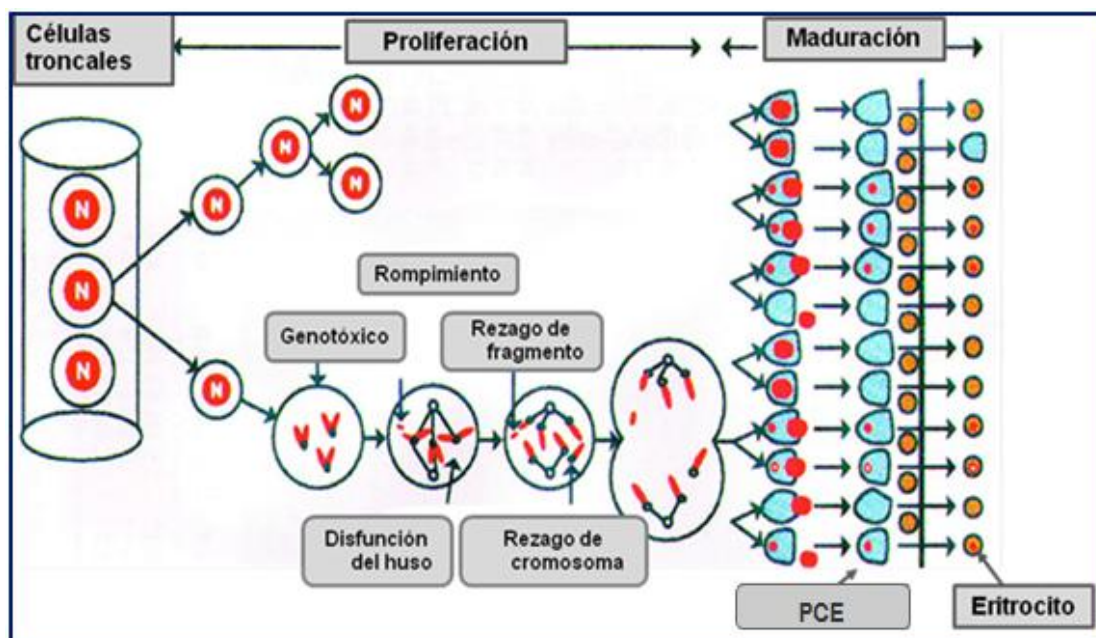


Figura 3.4.bii. Mecanismo de formación de MN en MO *in vivo*. Las células de la MO se encuentran en constante proliferación durante la cual algún compuesto genotóxico puede ejercer un efecto clastogénico o aneugénico y originar MN en los eritroblastos, los cuales se convierten en PCE al expulsar el núcleo en su proceso de maduración. Los MN en PCE (MNPCE) son utilizados como prueba de genotoxicidad. Traducido de Krishna y Hayashi, 2000.

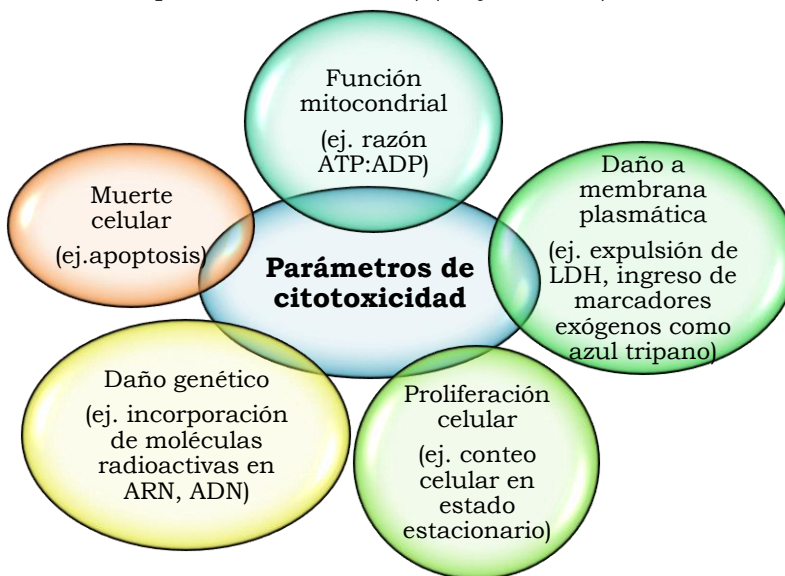
3.4.c. Proliferación

La proliferación celular se refiere al aumento del número de células en una población mediante la división celular. Se considera que una célula está en proliferación durante todas las etapas activas de la división celular (G_1 , S, G_2 y mitosis (Mit)), si por alguna

razón la célula entra en estado de arresto celular (G_0), se asume que ha dejado de proliferar (Scholzen y Gerdes, 2000).

Los cambios proliferativos asociados con una exposición a compuestos tóxicos son una herramienta útil para la toxicología, ya que pueden ser considerados como indicadores de citotoxicidad (toxicidad en las células). Los parámetros para medir la citotoxicidad (**Fig.3.4.ci**) pueden ser propiedades relacionadas con la pérdida de funciones vitales (ej. determinación de la proliferación celular) (Meyer, 2001).

Figura 3.4.ci. Diagrama en el cual se presentan algunos parámetros que se utilizan para evaluar la citotoxicidad (Meyer, 2001).



Existen varias maneras de determinar la proliferación celular, pero según el objetivo y el tipo de muestra de cada estudio se selecciona la técnica más adecuada. A continuación se describen dos parámetros comúnmente utilizados para determinar la proliferación celular en hígado y médula ósea:

■ Detección de la proteína Ki-67

En 1983 se hizo referencia por primera vez a Ki-67 como un antígeno nuclear detectado con el anticuerpo monoclonal correspondiente (Kaita *et al.*, 1997). Posteriormente se advirtió que Ki-67 es una proteína nuclear no histónica que se presenta exclusivamente en las células que se encuentran en proceso de proliferación (en la fase G_1 , S, G_2 y Mit), por lo tanto se le considera como un marcador nuclear de proliferación. La tinción máxima de Ki-67 ocurre en las fases G_2 y Mit, pero en esta última la tinción se detecta en la superficie de los cromosomas (Scholzen y Gerdes, 2000).

Si bien la proteína Ki-67 se encuentra caracterizada a nivel molecular y es ampliamente utilizada como marcador de proliferación, su significado biológico permanece incierto, pero todo indica que es un requisito absoluto para la progresión entre las fases del ciclo celular (Scholzen y Gerdes, 2000).

La obtención del índice de marcaje de Ki-67 (células que presentan Ki-67/campo) a través de técnicas de inmunodetección es útil para evaluar la proliferación tisular. Al presentarse un incremento en dicho índice, se considera que existe una mayor proliferación en el tejido estudiado (Kaita *et al.*, 1997; Scholzen y Gerdes, 2000).

La aplicación de ésta técnica es muy útil cuando no se dispone de tejido fresco, y las muestras de tejido están fijadas en formalina (Kaita *et al.*, 1997). Además, Ki-67 refleja todas las etapas del ciclo celular que no serán captadas por técnicas donde sólo se marca el ADN recién sintetizado (Scholzen y Gerdes, 2000).

■ Porcentaje de eritrocitos policromáticos (% PCE)

Esta forma de estimar la proliferación celular se refiere a calcular la proporción de PCE con relación a los eritrocitos totales (TE) presentes en laminillas preparadas con muestras de MO. Particularmente, esta evaluación de la proliferación celular se lleva a cabo en ensayos de MN en MO, en los que se compara el %PCE del grupo control con la del grupo tratado (Krishna y Hayashi, 2000).

La disminución en el %PCE representa la existencia de alguna perturbación en el proceso hematopoyético como resultado de algún tratamiento (Gollapudi y Mc Fadden, 1995); es decir, sirve como índice de citotoxicidad (Romagna y Staniforth, 1989).

4. Planteamiento del problema y justificación

Los ríos Atoyac y Xochiac, ubicados en el estado de Tlaxcala y Puebla, han sido punto de descargas provenientes de los corredores industriales Quetzalcóatl, Huejotzingo e Ixtacuixtla, así como de la planta petroquímica Independencia, de industrias textiles y pequeñas lavanderías intraurbanas.

En un análisis para evaluar la calidad del agua se reportó que dentro de los contaminantes encontrados a lo largo de ambos ríos, aquellos que tienen una mayor frecuencia son el cloroformo, diclorometano y tolueno (Navarro *et al.*, 2004), compuestos que, por su alta presión de vapor son clasificados dentro de los VOC (Spicer *et al.*, 2002).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la contaminación en los ríos sobre las poblaciones cercanas a estos, se realizó un estudio de biomonitorio utilizando a los MN como biomarcadores de daño genotóxico. Como resultado de este estudio, se determinó que los pobladores que habitaban más cerca de los ríos presentaron una mayor frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica (Montero *et al.*, 2006). Tal asociación sugiere que los contaminantes cloroformo, diclorometano y tolueno son los responsables del daño genotóxico hallado en los pobladores.

A partir de los resultados obtenidos en el biomonitorio, surgió la necesidad de plantear un modelo experimental que permitiera entender el papel que los VOC hallados en el río tienen en la genotoxicidad observada (MN) en las poblaciones expuestas. En el modelo experimental de este trabajo se propone la medición de los efectos tóxicos inducidos por la mezcla de VOC en tres parámetros distintos:

Actividad enzimática

La actividad de enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos como los VOC encontrados en el río, puede llegar a repercutir en los niveles de daño genotóxico si se altera la velocidad de bioactivación de un agente tóxico (Levi y Hodgson, 2001). La enzima GSTT1-1 es capaz de producir metabolitos reactivos a partir de compuestos halogenados (Sherrat *et al.*, 1998) como el diclorometano, por lo que es de relevancia estudiar si presenta cambios en su actividad ante la exposición a los VOC hallados en el río.

Genotoxicidad

La prueba de MN ha sido ampliamente utilizada para estimar el daño genotóxico producido por diversas sustancias químicas (Preston y Hoffmann, 2001). Debido a que en diversos estudios se sugiere la evaluación de MN en hígado y en médula ósea como pruebas complementarias para determinar con mayor contundencia la genotoxicidad (Parton y Garriot, 1997), en este trabajo se realizó la evaluación de MN en ambos tejidos.

Proliferación

La formación de MN es dependiente de la proliferación celular (Müller y Streffer, 1994), por lo tanto la cuantificación de biomarcadores de proliferación es posible usarla como sustento en la interpretación de los resultados de daño genotóxico (Suzuki *et al.*, 2004). En este diseño experimental se planteó hacer la detección de la proteína Ki-67 y contar %PCE como biomarcadores de proliferación en hígado y médula ósea, respectivamente.

5.H hipótesis

- # Se sabe que la exposición a ciertos compuestos orgánicos es capaz de inducir enzimas del metabolismo de xenobióticos, por lo tanto se espera que la mezcla de cloroformo, diclorometano y tolueno induzcan la actividad de GSTT1-1, ya que es la principal enzima de fase II encargada del metabolismo de los dos primeros.
- # La contaminación en los ríos Atoyac y Xochiac ha sido relacionada con un incremento en la frecuencia de MN en los pobladores de la región, al ser el cloroformo, diclorometano y tolueno los contaminantes más frecuentes en los ríos, se infiere que la mezcla de estos VOC será capaz de inducir daño genotóxico *in vivo*.
- # Debido a que GSTT1-1 es la enzima responsable de la bioactivación de compuestos halogenados, la genotoxicidad y citotoxicidad causadas por la mezcla podrían estar relacionada con la actividad de esta enzima de fase II.

Objetivos generales

- ▣ Identificar si ocurre inducción en la actividad enzimática de GSTT1-1 debido a la exposición a VOC.
- ▣ Determinar si la exposición a cloroformo, diclorometano y tolueno produce daño genotóxico en hígado y/o médula ósea utilizando los micronúcleos como biomarcador.
- ▣ Evaluar biomarcadores de proliferación hepática y de la médula ósea para complementar los datos de genotoxicidad.

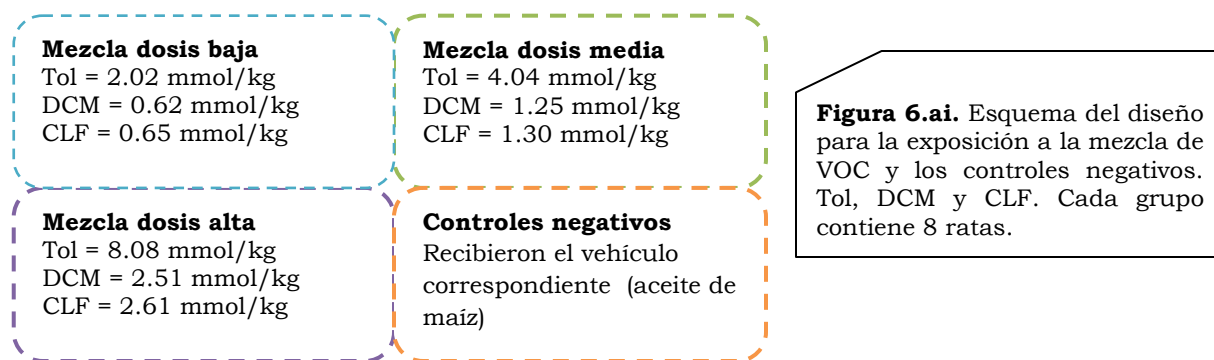
Objetivos particulares

- ◆ Obtener fracción citosólica hepática para la medición de la actividad de GSTT1-1.
- ◆ Realizar la medición de la actividad hepática de GSTT1-1 en las distintas dosis de la mezcla de VOC.
- ◆ Registrar la frecuencia de micronúcleos producidos por distintas dosis de la mezcla de VOC en HEP y en PCE.
- ◆ Evaluar marcadores de proliferación: %PCE para médula ósea y la cuantificación del índice de núcleos de marcados con la proteína Ki-67 para HEP.
- ◆ Establecer si existe una relación entre la proliferación y la genotoxicidad respectiva de cada órgano.
- ◆ Estimar la posible relación entre la actividad de GSTT1-1 y la genotoxicidad hepática, así como con la relación de la primera con la proliferación hepática.

6. Diseño experimental

6.a. Tratamiento

Un total de 43 ratas macho Wistar de tres semanas de edad (70-120 g) fueron distribuidas en cinco grupos de tratamiento. Las ratas de cada grupo tuvieron aclimatación durante una semana (temperatura de 20 ± 2 °C con ciclos de 12 horas luz/oscuridad y humedad relativa de $56 \pm 3\%$) en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. A la cuarta semana de edad, cada grupo se expuso al tratamiento correspondiente cada 24 horas durante tres días consecutivos. A continuación se mencionan los grupos: Mezcla dosis baja, mezcla dosis media, mezcla dosis alta, controles negativos (**Fig.6.ai**), controles positivos (**Tabla 6.ai**): dietilnitrosamina (DEN), Benceno (Ben) y tSO.



La concentración de la dosis baja de la mezcla se calculó a partir del 2.5% del LD50 oral de cada compuesto; con base en este valor, se puso el doble de concentración a la siguiente dosis de la mezcla.

Tabla 6.ai. Tabla con detalles del grupo de los controles positivos. Se presenta la función, dosis, número de animales tratados con cada compuesto, así como el régimen de exposición.

Sustancia	Dosis (mmol/kg)	No. de animales	Vía y tiempo de administración	Característica toxicológica
Benceno	128	4	Oral durante 2 días	Inductor de MN en médula ósea
Dietilnitrosamina	0.979	4	i.p. durante 2 días	Generador de MN en hepatocitos
trans-stilbenoxido	2.03	3	i.p. durante 3 días	Inductor de GSTT1-1

6.b. Obtención de muestra

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 24 horas después del último día de tratamiento. El hígado fue extirpado y enjuagado con solución fisiológica (KCl) para quitar el exceso de sangre; dicho órgano se utilizó para evaluar MNHEP, la proliferación hepática con Ki-67 y la actividad enzimática de GSTT1-1. Adicionalmente, se extrajeron los dos fémures para evaluar MNPCE de la médula ósea (**Fig.6.bi**).

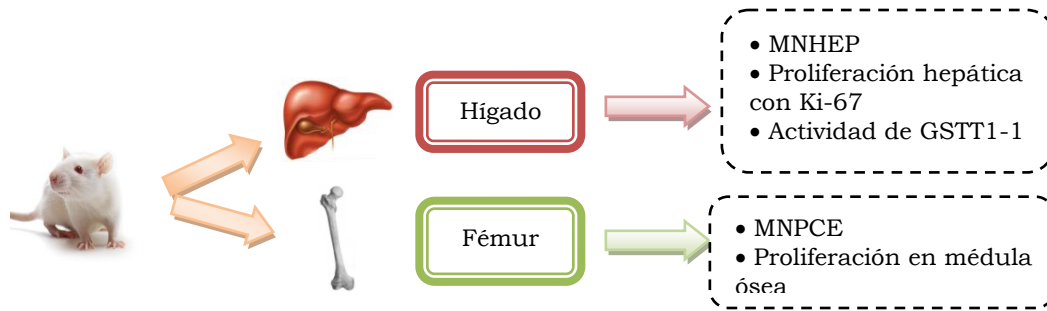


Figura 6.bi. Representación de los órganos que se extrajeron de cada rata tratada y los biomarcadores que fueron evaluados.

6.c. Fracción citosólica

Lista de reactivos

- Tris/HCl (BioRad)
- KCl (J.T. Baker)
- EDTA (Sigma)

Procedimiento:

La fracción citosólica del hígado se obtuvo de acuerdo al protocolo de Guengerich F.P. (2001) (**Fig.6.ci**). El hígado de cada rata se homogeneizó en un volumen de 3mL de 20 mM Tris/HCl, 150 mM de KCl y 1mM EDTA pH 7.4 por gramo de tejido. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 9000g, a 4°C durante 10 min; el sobrenadante (S-9), se centrifugó a 100,000g durante 60 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante (fracción citosólica), el cual fue almacenado en alícuotas a -80°C. Antes del uso de la fracción citosólica, se realizó una centrifugación a 3,100 rpm por 10 min para eliminar el exceso de lípidos.

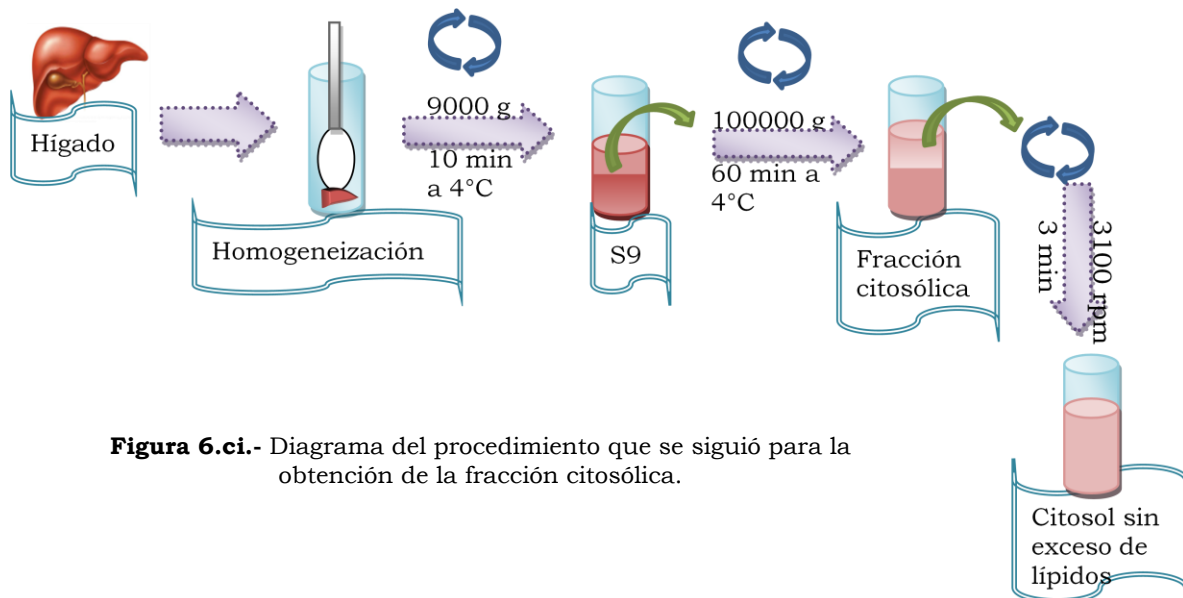


Figura 6.ci.- Diagrama del procedimiento que se siguió para la obtención de la fracción citosólica.

6.d. Cuantificación de proteína

Lista de reactivos:

- Albúmina (Sigma)
- Agua mili Q (Millipore Q-Gard 1)
- Reactivo de Bradford (BioRad)

Procedimiento:

La cuantificación de proteínas de las alícuotas de citosol, se hizo utilizando el método de Bradford (Compton y Jones, 1985), el cual se basa en la formación de un complejo entre el reactivo de Bradford y los residuos aminoácidos básicos de las proteínas presentes en un medio ácido; dicho complejo, torna de color azul al medio debido al enlace con el azul brillante de coomassie y puede ser detectado a los 595 nm.

El procedimiento utilizado se describe a continuación: se realizó una curva patrón de 0 mg/mL a 0.5 mg/mL a partir de un stock de albúmina de 1.23 mg/mL; se colocaron 10 µL de cada una de las cinco concentraciones de albúmina en una placa con 96 pozos (un pozo por concentración). Enseguida, se preparó el citosol de las alícuotas: cada uno se diluyó 1:100 con agua mili Q; de cada alícuota diluida se colocaron 10 µL por pozo de la placa antes usada. Después, a cada pozo se le agregaron 200 µL del reactivo de Bradford, el cual se homogeneizó con la proteína (de la alícuota o albúmina). Una vez preparados los pozos a usar, se realizó la lectura de la placa con el lector DTX 880 Multimode Detector; los valores obtenidos se utilizaron para calcular la concentración de proteína de cada alícuota.

6.e. Actividad enzimática de GSTT1-1

Lista de reactivos:

- Diclorometano grado HPLC (Honeywell)
- Tris/HCl (BioRad)
- GSH (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Sigma)
- Acetato de amonio (J.T. Baker)
- Acetilacetona (BioRad)
- Ácido acético (J.T. Baker)
- Agua mili Q (Millipore Q-Gard 1)

Procedimiento:

La actividad hepática de la enzima GSTT1-1 fue determinada utilizando el método descrito por Mannervik y Jemth (1999); esta técnica se basa en la cuantificación de formaldehído (HCHO) como producto del metabolismo del DCM por GSTT1-1 (**Fig.6.ei**).

El procedimiento experimental (**Fig.6.eii**) se describe a continuación: el amortiguador de reacción (TRIS/HCl 0.1 M pH 7.4) con GSH 0.1 M se mezcló con 0.34 mg proteína /mL del citosol. Esta mezcla se preincubó a 37°C en un vial ámbar en baño María durante 5 minutos; enseguida se agregaron 8 µL de DCM grado HPLC, resultando en un volumen total de 3 mL, y se incubó el vial a 37°C el tiempo correspondiente (5, 12 y 20 min). Se agregaron 300 µL de TCA 50 % p/v para detener la reacción; 2 mL de la reacción detenida se centrifugaron a 16 000 g por 2 min en tubos eppendorf. Del sobrenadante obtenido se tomaron 1.5 mL que se distribuyeron equitativamente en tres tubos eppendorf (cada tubo con 0.5 mL de sobrenadante). A cada uno de estos tubos se le agregó 0.5 mL del reactivo de Nash (acetato de amonio 2M, acetilacetona 20 mM, ácido acético 50 mM diluidos en agua mili Q) y se incubaron a 42 °C durante 30 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 412 nm en el espectrofotómetro de doble haz UV- visible Camspec modelo M350. Con los datos obtenidos se calculó la actividad enzimática con la ecuación mostrada en la **figura 6.eiii**.

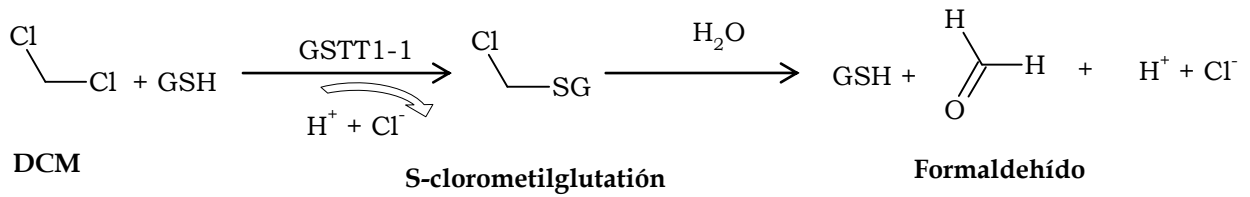


Figura 6.ei. Reacción entre el DCM y GSH mediada por GSTT1-1, la cual resulta en la formación de S-clorometilglutación y HCHO.

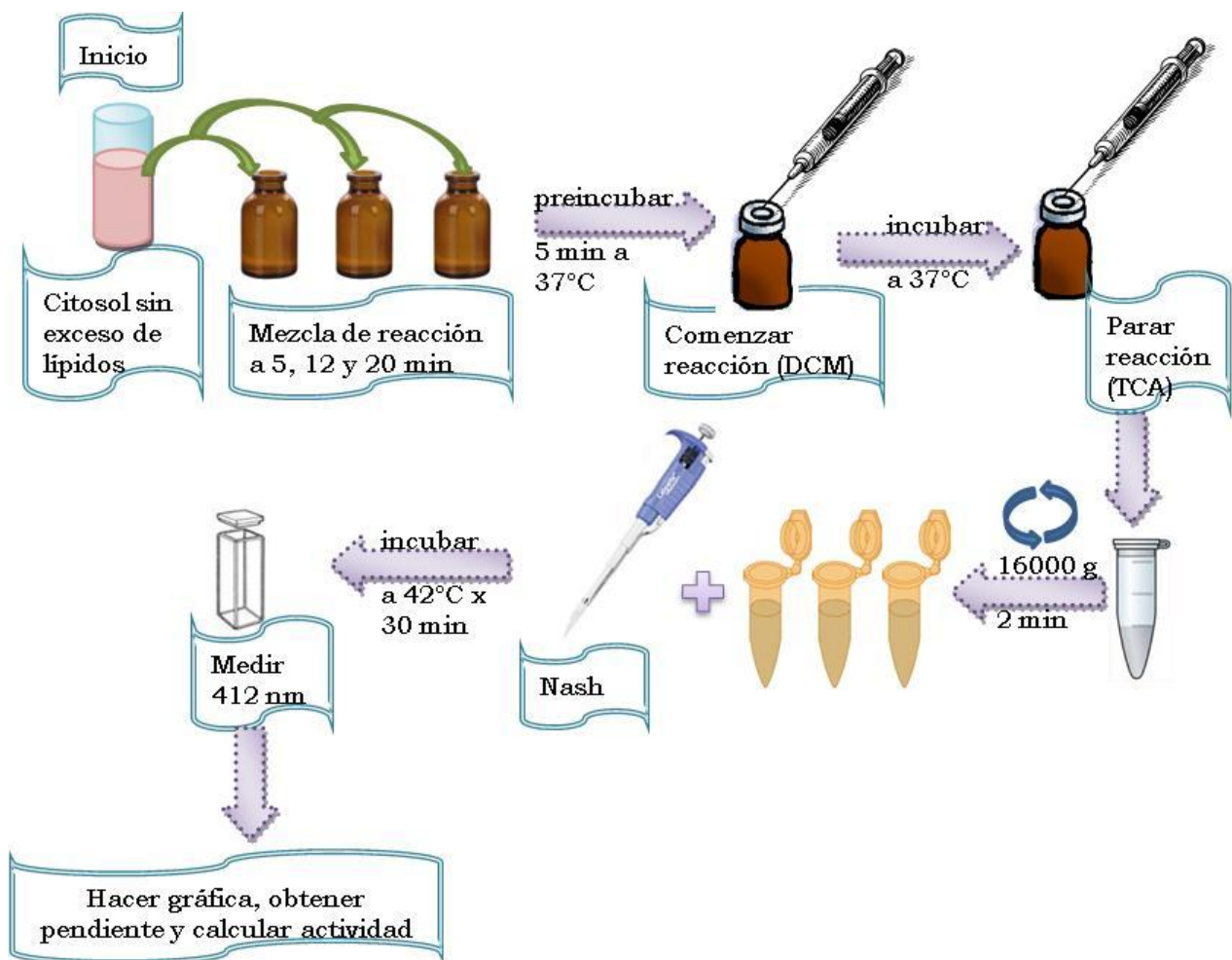


Figura 6.eii. Diagrama del procedimiento que se siguió para la medición de actividad enzimática GSTT1-1.

$$\text{Actividad GSTT1} - 1 \text{ (}\mu\text{mol/min/mg proteina)} = \frac{\left(\frac{\text{Pendiente } \left(\frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min}} \right)}{8 \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1})} \right) \times \frac{2.2}{3\text{mL}}}{0.34 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

Diagram illustrating the calculation of GSTT1-1 activity. The equation is annotated with arrows pointing to its components:

- Coefficiente de extinción molar del DCM:** Points to the denominator constant 8 (mM⁻¹cm⁻¹).
- Factor de dilución:** Points to the fraction 2.2/3mL.
- Volumen final de la mezcla de reacción:** Points to the denominator 0.34 (mg/mL).
- Concentración de proteína en la mezcla de reacción:** Points to the denominator 0.34 (mg/mL).

Figura 6.eiii. Ecuación utilizada para calcular la actividad enzimática de GSTT1-1 hepática. Tomado y modificado de Mannervik y Jemth, 1999.

6.f. Técnica de MNHEP

Lista de reactivos:

- Formaldehído al 37% (J.T. Baker)
- Metanol (Honeywell)
- Fosfato de sodio dibásico (J.T. Baker)
- Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker)
- KOH (J.T. Baker)
- Ácido acético (J.T. Baker)
- Solución Wright (Sigma)
- Giemsa (Sigma)
- Entellán (Merck)

Procedimiento:

La genotoxicidad de los tratamientos en hígado, fue evaluada utilizando la prueba MNHEP descrita por Parton y Garriot (1997); en esta técnica se utilizaron hepatocitos aislados a partir de tejido fijado en formalina. El procedimiento consta de cuatro pasos: obtención de hepatocitos, frotis celular, tinción y evaluación (**Fig.6.fi**).

1. Obtención de hepatocitos:

De cada rata se disecaron dos fragmentos de hígado de 0.25 g aproximadamente, y ambos fragmentos se colocaron en un frasco con 7 mL de formalina al 10 %. Después de siete días, uno de los dos fragmentos se removió de la formalina y se lavó sobre un tamizador con agua destilada durante 30 segundos. Posteriormente, se colocó en un frasco con 7mL de KOH 12 N y se dejó en agitación por 16 horas, a temperatura ambiente. Para remover el KOH de cada pedazo de hígado, se vació este sobre un tamizador; enseguida se enjuagó con agua destilada y se disoció con ayuda de un pistilo. El tejido disociado se lavó a través del tamizador con agua destilada y se colectó en un tubo cónico de 50 mL; una vez colectado el tejido disociado, se completó el volumen a 50 mL con agua destilada. La suspensión de hepatocitos se centrifugó a 400 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con agua destilada; se repitió dos veces este paso. Después de la tercera centrifugación, se resuspendió el botón celular en 3 mL de solución fijadora Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) y se almacenó a 4°C para posteriormente hacer preparaciones.

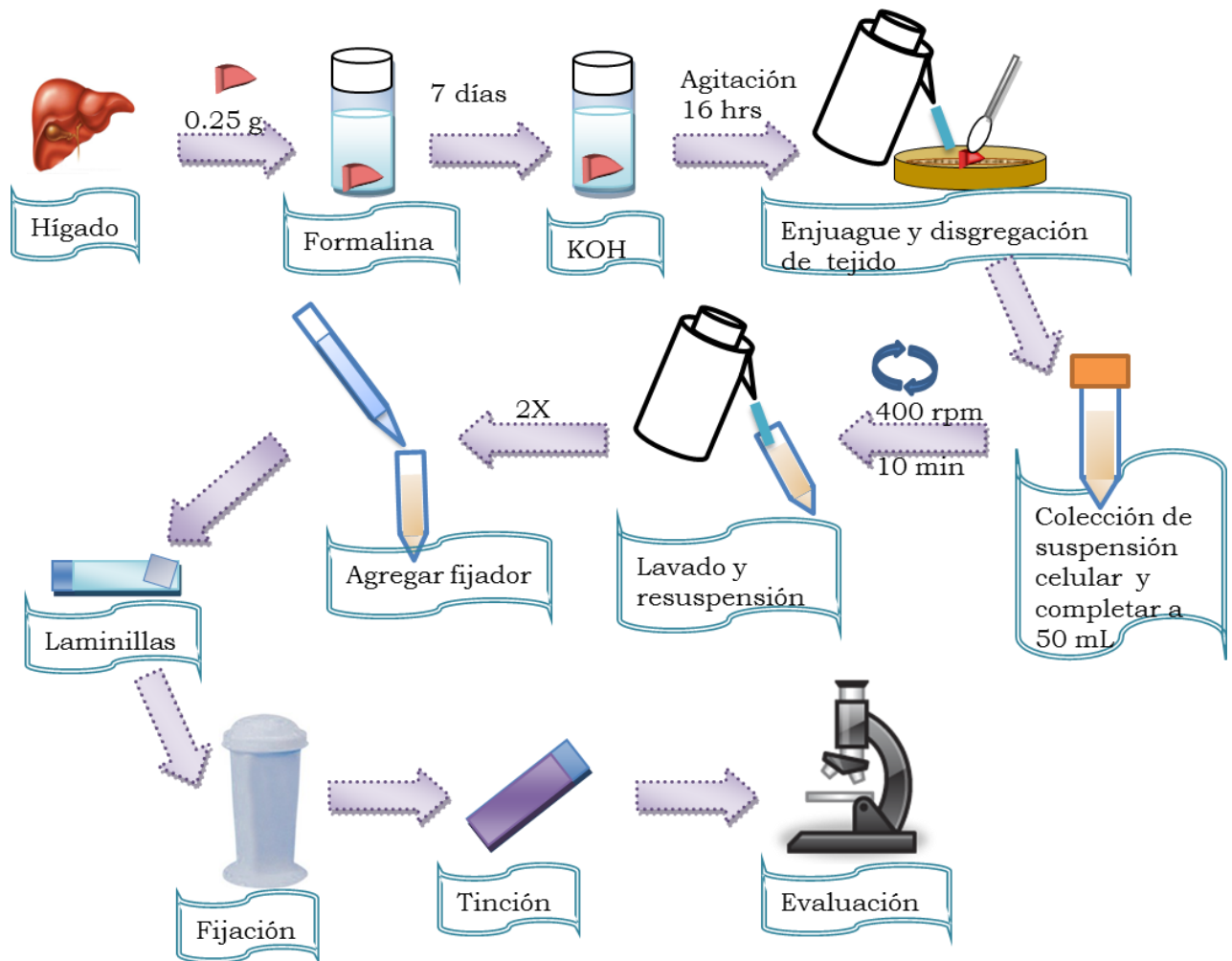


Figura 6.fi. Diagrama del procedimiento utilizado en la técnica de MNHEP.

2. Frotis celular

Para hacer las laminillas, se homogenizó la suspensión de células con una pipeta Pasteur y se tomaron alrededor de 2-4 μL , los cuales se colocaron sobre el portaobjetos; de inmediato, se hizo un frotis con ayuda de un cubreobjetos. Después de que se secaron las laminillas, se les fijó con metanol al 100 % durante 10 min.

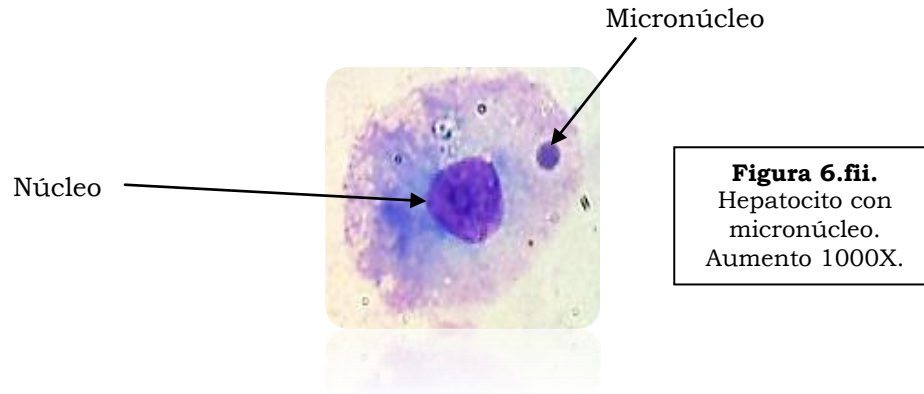
3. Tinción

La tinción de las laminillas se realizó siguiendo el método descrito por Dávila (2002). La tinción consiste en seis pasos utilizando seis cámaras Coplin: se sumergió la laminilla 1 min en solución de Wright 10 % en etanol absoluto; 1 min en Wright 50 % en Sörensen pH 6.8; 15 min en Giemsa 14 % en Sörensen pH 6.7; 10 seg. en Sörensen pH 6.7; 10 seg. en Sörensen pH 6.8; 10 seg. en agua destilada. Después de verificar la tinción, se montaron con Entellán.

4. Evaluación

Con el microscopio Nikon type 120, se evaluaron 2000 hepatocitos (HEP) con aumento 100X, con citoplasma conservado, por rata para obtener la frecuencia de MN. Los criterios utilizados para seleccionar los HEP y MN fueron: citoplasma bien definido contrastante con el núcleo; núcleo redondo y con nucléolo bien definido; micronúcleo teñido en el

mismo tono del núcleo y cercano a él; misma textura y forma que el núcleo, y que sea de un tamaño no mayor a una tercera parte del núcleo del cual proviene (**Fig.6.fii**).



6.g. Método de proliferación hepática con Ki-67

Lista de reactivos:

- Xilol (J.T. Baker)
- Citrato de sodio (Dako)
- Tween 20 (BioRad)
- BSA (Sigma)
- Anticuerpo primario MIB5 anti Ki-67 (Dako)
- Anticuerpo secundario biotinilado (Dako)
- Complejo Avidina Biotina (Amersham)
- Diaminobencidina (Dako)
- Peróxido de hidrógeno (J.T. Baker)
- Hematoxilina (Sigma)

Procedimiento:

La medición de la proliferación en hepatocitos se realizó con base en el método de detección de la proteína nuclear Ki-67 mediante inmunohistoquímica, el cual consiste en cuatro fases: el procesamiento de las muestras hepáticas, desparafinación, la inmunohistoquímica y la evaluación (**Fig.6.gi**).

1. Procesamiento de muestras:

Se tomó uno de los fragmentos de hígado que se encontraba en formalina al 10 % y se lavó con PBS 0.1M. con cuatro cambios de 30 min cada uno. A continuación, se pasó el segmento hepático al histoqueineta para incluirlo en parafina. Una vez embebido el tejido, se realizaron cortes de cinco micrómetros de grosor por cada trozo. Enseguida, se colocaron los cortes (cuatro cortes por laminilla) sobre laminillas gelatinizadas que se encontraban en baño María con agua destilada.

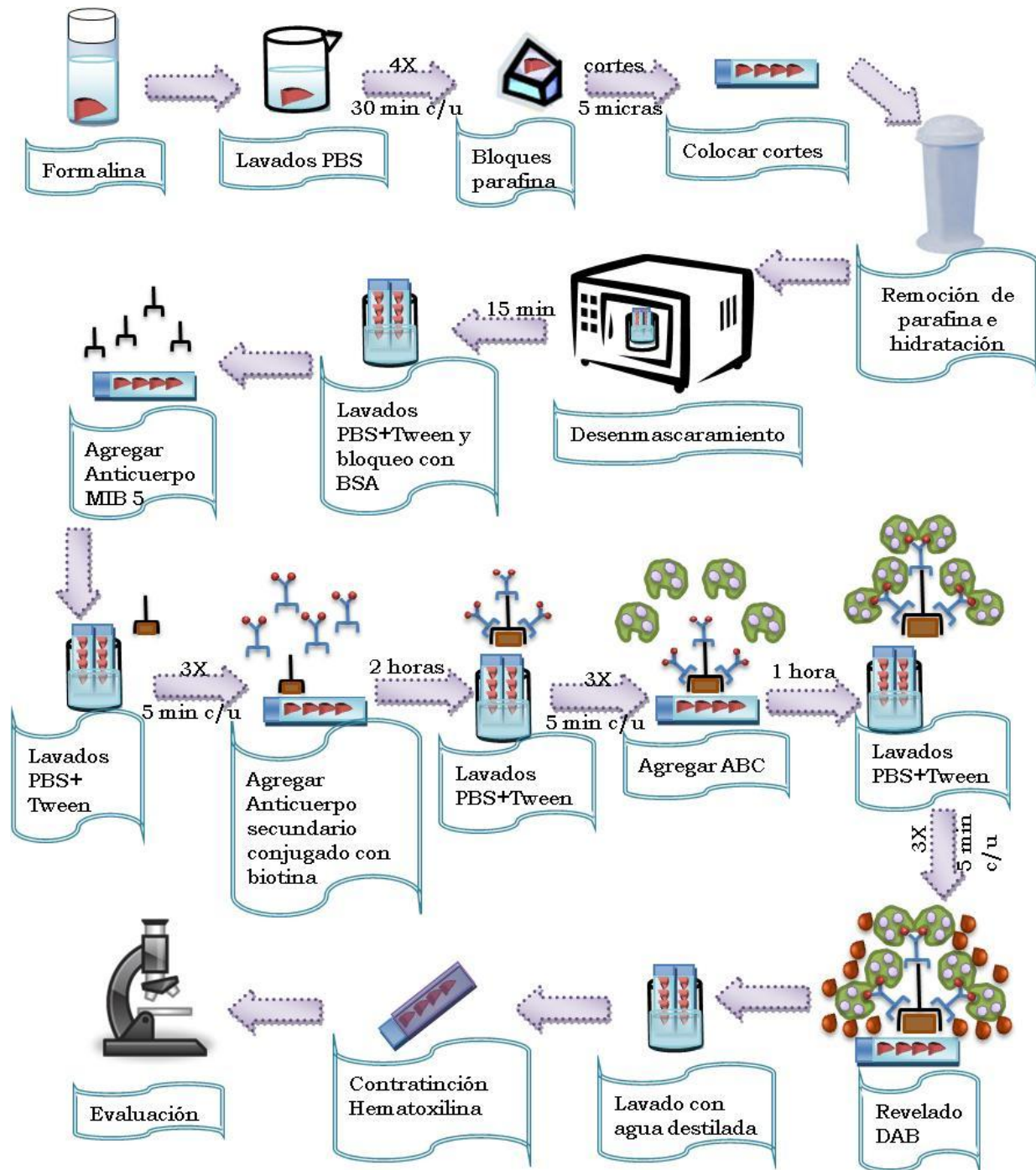


Figura 6.gi. Diagrama del procedimiento que se siguió para la medición de núcleos marcados con ki67 como biomarcador de proliferación (Ver explicación detallada en el texto).

2. Desparafinación y rehidratación

Para proceder con la remoción de parafina de los cortes ubicados en las laminillas, se comenzó por su exposición en una estufa a 60°C durante 30 min y después se trataron con Xilol (durante 10 min y 5 min) y etanol-Xilol (5 min). Para rehidratar los cortes, las laminillas fueron sumergidas por 1min en distintas concentraciones de etanol (100 %, 96 % y 70 %) y en agua destilada durante 5 min.

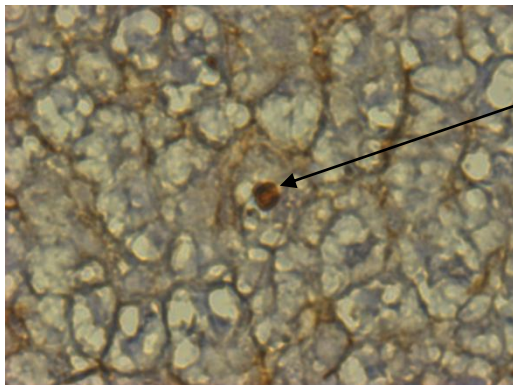
3. Inicio de la Inmunohistoquímica

Para el desmascaramiento, se colocaron las laminillas rehidratadas en un recipiente con amortiguador de citrato de sodio 10 mM, pH 6.0 y se calentó en baño María en el horno de microondas durante 15 minutos. Cada cinco minutos se agregó citrato para compensar la evaporación causada por el calentamiento. Después se dejaron enfriar en el recipiente por 20 min.

A continuación se les trató con varias sustancias en el siguiente orden: agua destilada (5 min), PBS+Tween 20 al 0.1 % (10 min), PBS (10min) y BSA al 5% +PBS/Tween 20 al 0.1% durante dos horas para el bloqueo. En seguida se les añadió el anticuerpo primario MIB5 anti Ki-67 (1:100) y se les dejó por 24 horas. Al día siguiente, se les expuso secuencialmente a: PBS/Tween 20 al 0.1 %. (tres lavados de 5 min), anticuerpo secundario biotinilado (1:200) por 2hrs, PBS/Tween 20 al 0.1 % (tres lavados de 5min), Complejo Avidina Biotina (ABC) (1 hora) y PBS/Tween 20 al 0.1 % (tres lavados de 5min). Para realizar el revelado se utilizó diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno, seguidos de un lavado con agua destilada. Adicionalmente se realizó una contratinción con Hematoxilina para facilitar la evaluación y las preparaciones fueron deshidratadas con xilol durante cinco minutos. Una vez secas las laminillas, se montaron con Entellán.

4. Evaluación

Por cada laminilla se evaluó la cantidad de núcleos marcados con Ki-67 en 20 campos por corte a 1562.5X con un microscopio Carl Zeiss 472083 (se evaluaron 3 cortes por cada laminilla) (**Fig.6.gii**). Posteriormente se reportaron los resultados con el número de núcleos marcados por campo. Las fotos concernientes a Ki-67 fueron tomadas en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM con el microscopio invertido Olympus IX71 y la cámara Evolution VF.



Núcleo marcado con
Ki-67

Figura 6.gii. Corte histológico hepático con núcleos marcados con Ki-67. Aumento 40X.

6.h. Técnica de MNPCE

Lista de reactivos:

- Suero Neonatal Bovino (GIBCO)
- EDTA (Sigma)
- α celulosa (Sigma)
- Celulosa microcristalina (Sigma)
- Solución de Hank (HBSS)
- Metanol (Honeywell)
- Giemsa (Sigma)
- Solución Wright (Sigma)
- Entellán (Merck)

Procedimiento:

La genotoxicidad de los tratamientos en la médula ósea, fue evaluada utilizando la prueba de MNPCE descrita por Romagna y Staniforth (1989); en la que se utilizaron eritrocitos policromáticos aislados a partir de los fémures (**Fig.6.hi**). El procedimiento consta de cinco pasos: obtención de médula ósea, aislamiento de eritrocitos, frotis celular, tinción y evaluación.

1. Obtención de médula ósea

La médula ósea se obtuvo del fémur de los animales. Ambos fémures se cortaron por el extremo proximal. Posteriormente, el extremo distal fue abierto con una aguja. Se ajustó una jeringa con aguja en el extremo proximal del hueso y el extremo distal se sumergió en un tubo que contenía 3 mL de suero neonatal bovino, 25 mM EDTA. Entonces, se aspiró la médula dentro de la jeringa.

2. Aislamiento de eritrocitos

Con el propósito de remover las células nucleadas y obtener sólo PCE y normocromáticos (NCE), se preparó una columna de celulosa que retuvo a las células nucleadas. La columna se preparó en una jeringa de 20 mL (sin aguja ni émbolo). A continuación, se colocó en el fondo de la columna un círculo de 20 mm de papel de seda, que sirvió como soporte de la columna. Posteriormente se mezclaron cantidades iguales en peso de α celulosa y celulosa microcristalina Sigmacell tipo 50; se colocaron 1.5 g de la mezcla en la jeringa. Para empacar adecuadamente la columna, se dejó caer la jeringa de manera vertical (desde una altura de 1 cm) por veinte veces. En seguida, se ejerció una pequeña presión sobre la mezcla de celulosa hasta que ésta llegó a la marca de 4.5 mL en la jeringa. Por último se colocó un filtro de policarbonato de 10 μ m con ayuda de un sujetador.

Una vez preparada la columna, se homogeneizó la médula aspirada y se vertieron por goteo 3 mL en el centro de la columna; de inmediato, se agregaron 25 mL de solución de Hank para eluir la médula homogeneizada. Al final de la columna se colocó un tubo cónico de 50 mL, en el que se recogieron ambos tipos de eritrocitos. Los tubos cónicos se centrifugaron a 2200 rpm durante 10 min y se hizo un lavado con 20 mL de solución Hank. Este paso se repitió una vez. En seguida se recuperó el botón y se resuspendió en un volumen mínimo de solución de Hank.

3. Frotis celular

Para hacer las laminillas, se tomaron 5 μ L de la suspensión de eritrocitos y se colocaron sobre un portaobjetos. Posteriormente, se hizo un frotis con ayuda de un cubreobjetos. Después de que se secaron las laminillas, se les fijó con metanol al 100 % durante 10 min.

4. Tinción

Los frotis de eritrocitos fueron teñidos por el método de Dávila (2002), como se explicó en el apartado de tinción de MNHEP.

5. Evaluación

La frecuencia de MNPCE se obtuvo de la evaluación de 2000 PCE por animal con un aumento de 1562.5X en un microscopio Carl Zeiss 472083. Los criterios utilizados para determinar un micronúcleo son: cuerpo redondo o ligeramente ovalado; color azul intenso y que se encuentren dentro de la célula en el mismo plano (**Fig.6.hii**).

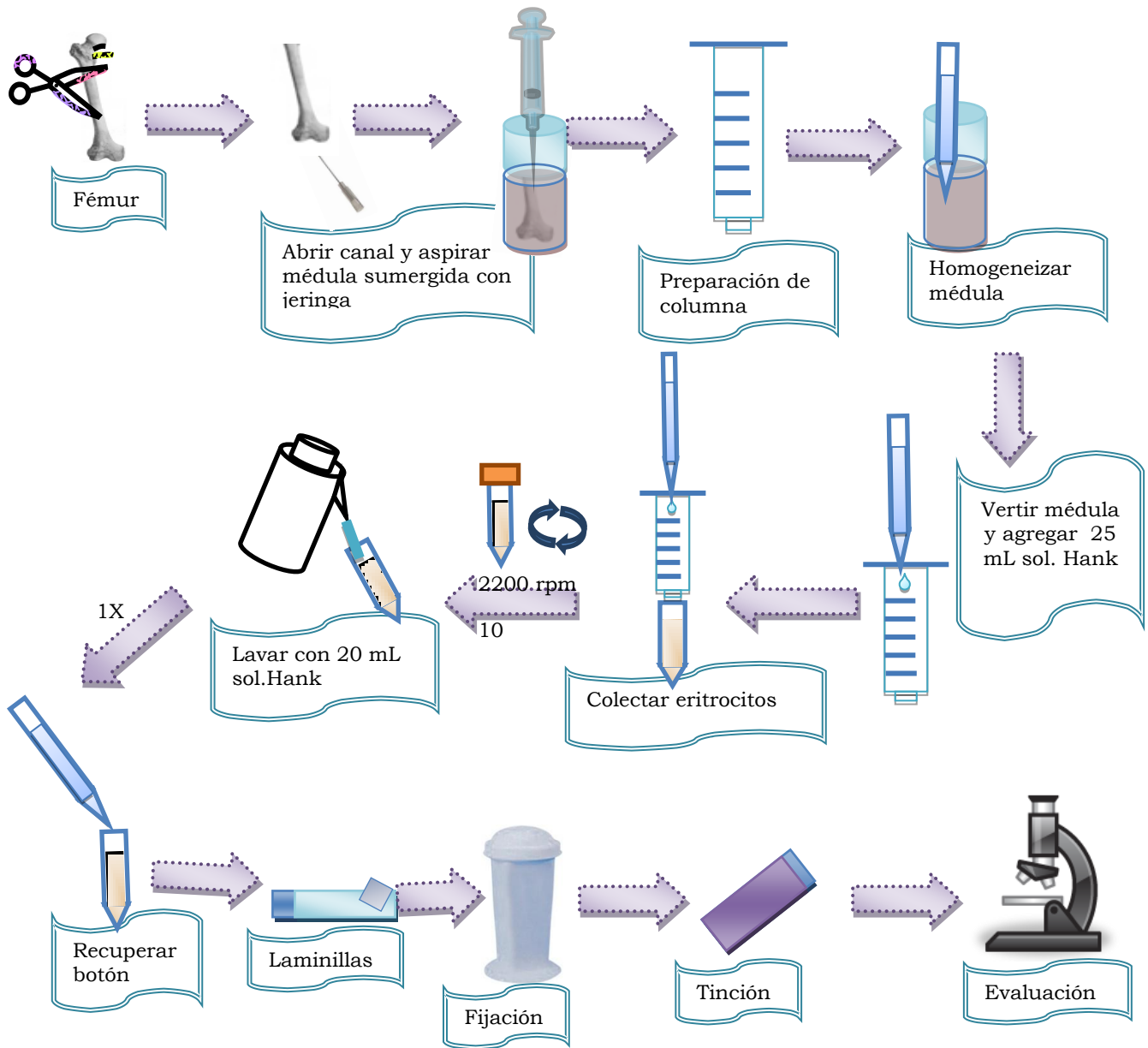


Figura 6.hi. Diagrama del procedimiento utilizado en la técnica de evaluación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea.

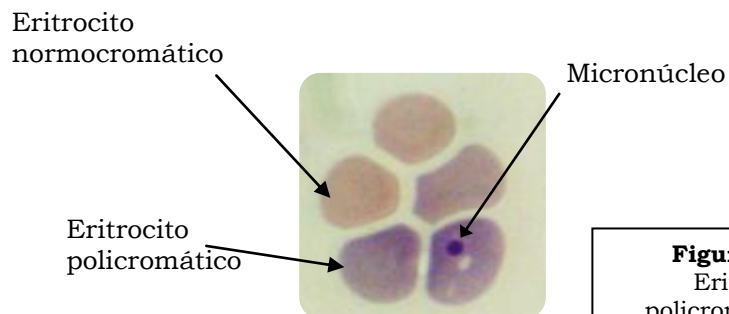


Figura 6.hii.
Eritrocito policromático con micronúcleo.
Aumento 1000x.

6.I. Método de proliferación en médula ósea

Para obtener los datos de proliferación en médula ósea, se usó el método descrito por Krishna y Hayashi (2000), el cual consiste en la determinación del %PCE del total de eritrocitos presentes en la médula. En esta prueba, se considera que una disminución en %PCE refleja eventos de citotoxicidad.

Las laminillas que se utilizaron para evaluar MNPCE se usaron también para evaluar la citotoxicidad. En total se registraron 1000 eritrocitos por animal con un aumento de 1562.5X en un microscopio Carl Zeiss 472083, para obtener el %PCE en la médula ósea (**Fig.6.Ii**).

$$\% \text{ PCE} = \left(\frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}} \right) \times 100$$

Figura 6.I i. Ecuación utilizada para calcular la proliferación en médula ósea (%PCE)

6.j. Análisis estadístico

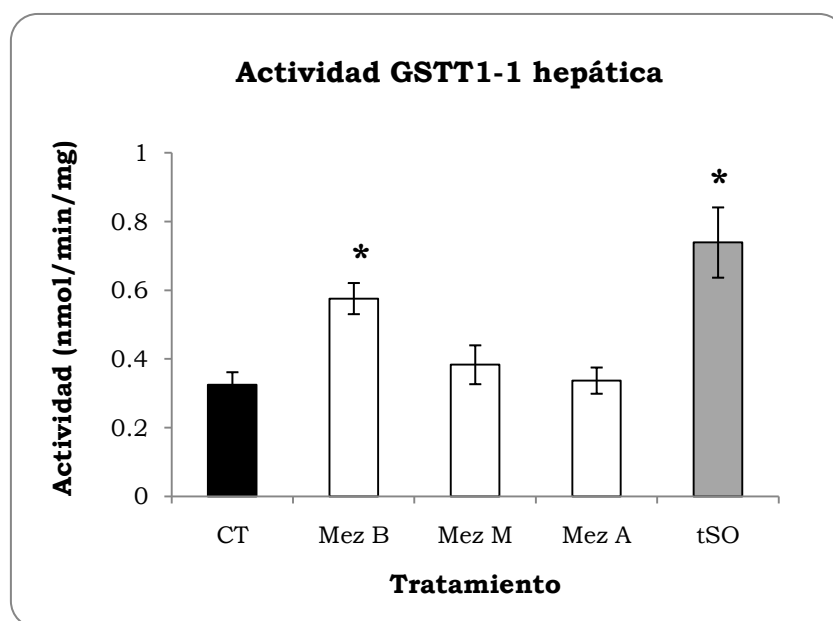
Los datos fueron ordenados en Excel y analizados en el programa de estadística SPSS. Con el objeto de establecer la normalidad de los datos se aplicó una prueba (Kolmogorov-Smirnov) y dependiendo del resultado, se aplicaron pruebas paramétricas (ANOVA) o no paramétricas (U-Mann Whitney). Adicionalmente, para identificar los factores que alteran la frecuencia se MN, se realizaron análisis de regresión lineal y para determinar la significancia se utilizó la correlación de Pearson.

7. Resultados

7.a. Medición de actividad enzimática de GSTT1-1

El ensayo para la actividad de GSTT1-1 realizado en este estudio (ver Diseño experimental en apartado 6.e) utiliza al DCM como sustrato específico de esta isoforma, evitando la interferencia de la actividad de otras GST presentes en el hígado (Sherrat *et al.*, 1998).

En la **gráfica 7.ai** se presentan los promedios de la actividad hepática de GSTT1-1 en ratas tratadas con diferentes dosis de la mezcla de tolueno, cloroformo y diclorometano, adicionalmente, se usó un grupo de ratas tratadas con tSO como control positivo.

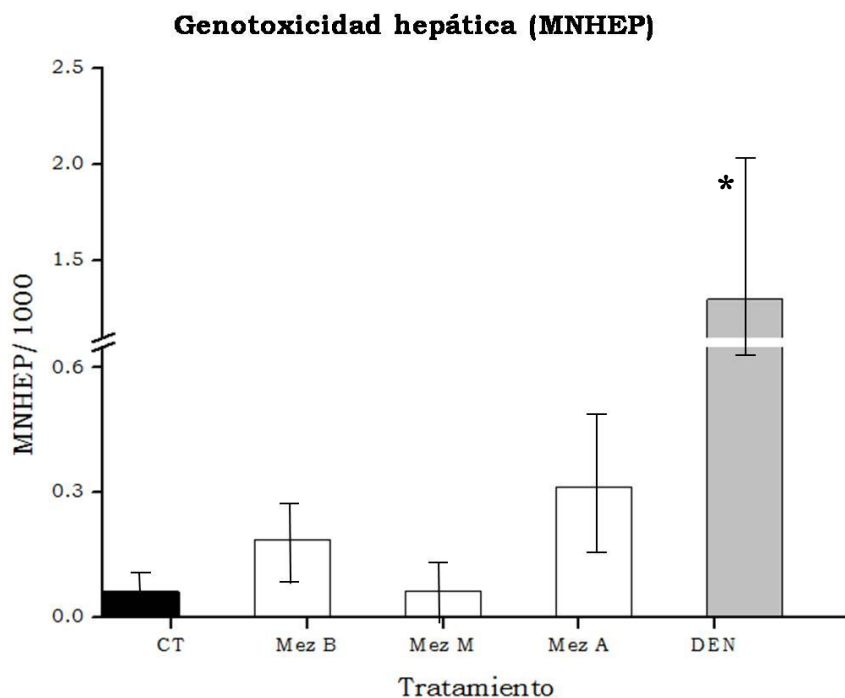


Gráfica 7.ai. Resultados de actividad enzimática en nmol/min/mg de proteína para cada tratamiento. El rango de la actividad va de 0.32 a 0.73. CT= controles; Mez B= Mezcla dosis baja; Mez M= Mezcla dosis media; Mez A= Mezcla dosis alta; tSO= ácido stilbenóxido. (ANOVA, * $p < 0.05$).

Con los valores obtenidos de actividad, se observa que los tratamientos de la dosis baja de la mezcla y el control positivo tSO tienen una inducción significativa en la actividad de GSTT1-1. En la Mez B se observa que hay una inducción de 1.77 veces con respecto a la actividad enzimática de los controles, la cual no se ve alterada en las dosis media y alta.

7.b. Genotoxicidad en hepatocitos

La determinación de MNHEP es una técnica que permite evaluar la genotoxicidad de xenobióticos que muestren potencial genotóxico después de ser bioactivados. En la **gráfica 7.bi** se presentan los promedios de MN por cada 1000 HEP en las ratas tratadas con diferentes dosis de la mezcla de VOC y como control positivo se utilizaron ratas tratadas con DEN.



Gráfica 7.bi. Frecuencias de MN/1000 HEP de acuerdo con su tratamiento. El rango de la frecuencia va de 0.06 a 1.3 MN. CT= controles; Mez B= Mezcla dosis baja; Mez M= Mezcla dosis media; Mez A= Mezcla dosis alta; DEN= Dietilnitrosamina. (U-Mann Whitney, * $p < 0.05$).

La mezcla produjo un incremento de MNHEP de 3 veces en la mezcla dosis baja hasta llegar a un incremento de 5 veces en la dosis alta de la mezcla, sin embargo esta tendencia al incremento de MN no es estadísticamente significativa.

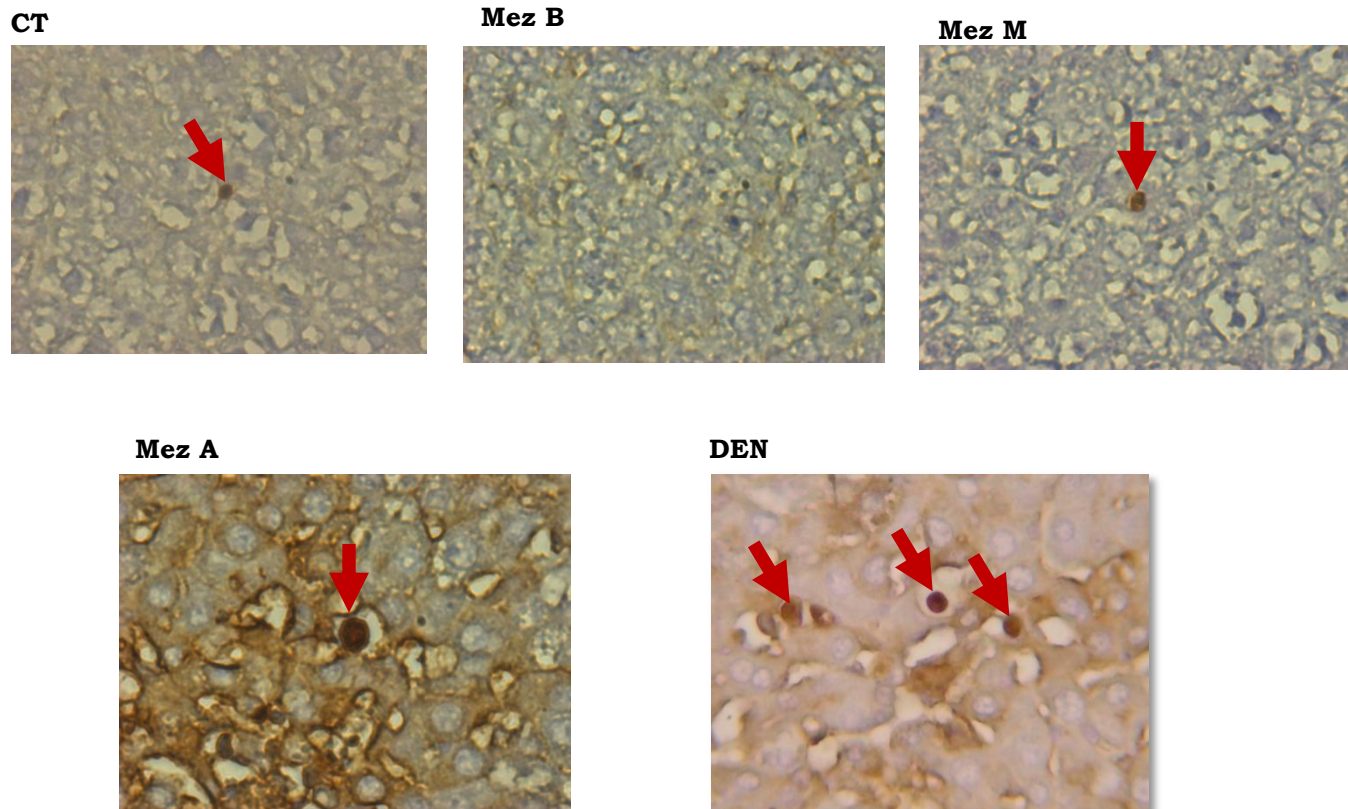
7.c. Proliferación hepática

Como respuesta de proliferación hepática, se utilizó a la proteína nuclear Ki-67 ya que esta se expresa en todas las fases del ciclo celular. En la **figura 7.ci** se presentan los resultados correspondientes.

En la **figura 7.ci A)** se muestran fotografías de la detección inmunohistoquímica de Ki-67, los núcleos con tinción café fueron considerados como positivos para el biomarcador de proliferación y se señalan con flechas en rojo. En estas fotografías se puede apreciar que la mezcla de VOC no altera la proliferación hepática, por otro lado, el tratamiento con DEN incrementa el número de células en proliferación, lo que contrasta con el control positivo.

En la **figura 7.ci B)** se muestra el promedio de núcleos proliferando por campo en los distintos tratamientos y se observa que aunque la proliferación tiende a disminuir, la mezcla de VOC no modifica significativamente la proliferación en ninguna dosis con respecto a los controles.

A)



B)

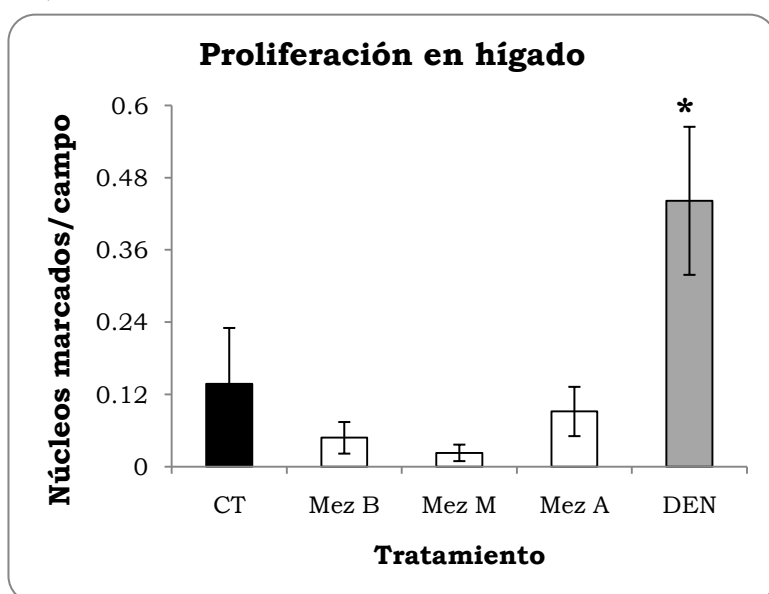
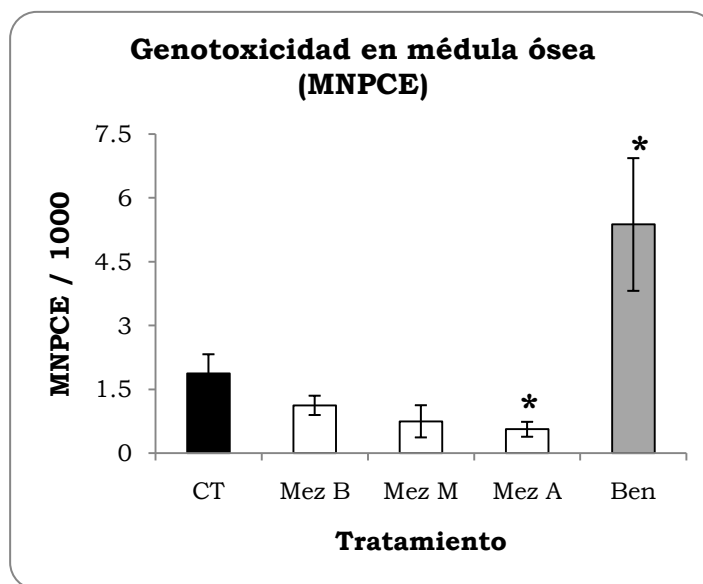


Figura 7.ci. A) Fotos de cortes hepáticos de los distintos tratamientos utilizados; los núcleos marcados con Ki-67 se señalan con flechas. Aumento 40X. CT= controles; Mez B= Mezcla dosis baja; Mez M= Mezcla dosis media; Mez A= Mezcla dosis alta; DEN= Dietilnitrosamina.

B) Gráfica de los promedios de las frecuencias de núcleos marcados con Ki-67 por campo y de acuerdo con su tratamiento (control, mezclas y DEN como control positivo). (U Mann Whitney, * $p < 0.05$).

7.d. Genotoxicidad en eritrocitos policromáticos

La médula ósea se ha utilizado como tejido para evaluar la genotoxicidad de diversos xenobióticos debido a su constante proliferación, de tal forma que es posible observar MN en PCE a partir de las 24 hrs de exposición. Los promedios de las frecuencias obtenidas de MNPCE para cada tratamiento (control, mezclas y su control positivo Ben) se muestran en la **gráfica 7.di**.

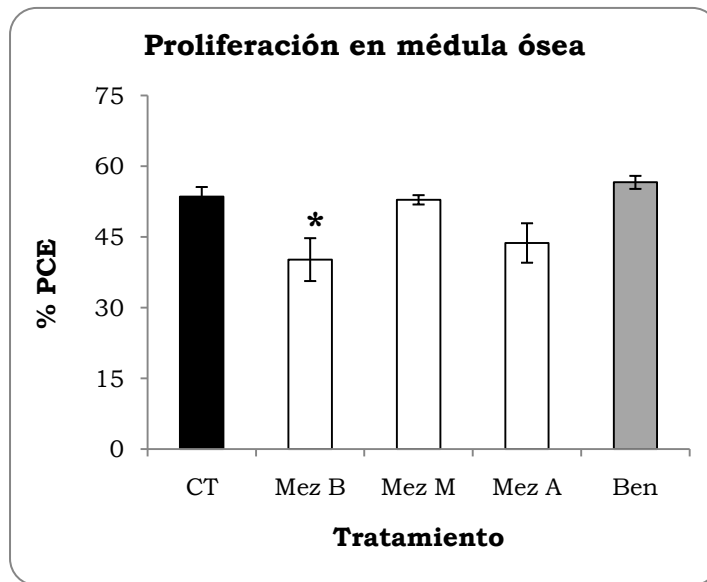


Gráfica 7.di. Frecuencias de MN/1000 PCE de acuerdo con su tratamiento. El rango de la frecuencia va de 0.56 a 5.37 MN. CT= controles; Mez B= Mezcla dosis baja; Mez M= Mezcla dosis media; Mez A= Mezcla dosis alta; Ben= Benceno. (U Mann Whitney, * $p < 0.05$).

Se observa una disminución dosis dependiente que llega a ser estadísticamente significativa en la mezcla dosis alta (70%).

7.e. Proliferación en médula ósea

La proporción de PCE respecto a la cantidad de eritrocitos totales (%PCE) es un biomarcador de proliferación de esta estirpe celular en médula ósea; una disminución en esta proporción se interpreta como una baja en la proliferación, de la misma manera que un incremento en %PCE indica una mayor proliferación celular. En la **gráfica 7.ei** se presentan los resultados correspondientes a este parámetro en las distintas dosis de la mezcla de VOC y en el tratamiento con Ben.



Gráfica 7.ei. Promedio de las frecuencias de PCE (%) de acuerdo con su tratamiento (control, mezclas y su control positivo Ben). CT= controles; Mez B= Mezcla dosis baja; Mez M= Mezcla dosis media; Mez A= Mezcla dosis alta; Ben= Benceno. (U Mann Whitney, * $p < 0.05$)

Se observa que el tratamiento de Mez B tiene una disminución significativa en la frecuencia de PCE respecto a los controles; la proporción de PCE en la mezcla baja disminuye significativamente un 25% y el de la mezcla alta disminuye 19%, sin embargo ésta no es significativa.

8.Discusión

8.a. Inducción de GSTT1-1

Debido a que los cambios en la actividad de enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos forman parte de la respuesta que los organismos establecen cuando se enfrentan ante compuestos químicos externos (Sherrat *et al.*, 1998; Dorsey *et al.*, 2000), era de esperar que la actividad de GSTT1-1 se alterara ante la de exposición a los VOC. Ante el hecho de que varios xenobióticos inducen a enzimas involucradas en su propio metabolismo (Rose y Hodgson, 2001) y de que varias enzimas de fase II se inducen a la par de las de fase I (Jowsey y Hayes, 2007), se planteó que la mezcla de cloroformo, diclorometano y tolueno induciría la actividad de GSTT1-1, ya que es la principal enzima de fase II encargada de su metabolismo, además de que inducen la actividad de los CYP (Belmont *et al.*, 2011).

Los resultados de inducción de la actividad de GSTT1-1 en dosis bajas de la mezcla pueden interpretarse como la respuesta de defensa del organismo ante la exposición a la mezcla de VOC; sin embargo, al incrementarse la dosis, se percibe que la capacidad de respuesta del organismo fue rebasada.

A las mismas ratas expuestas a la mezcla de VOC, se les determinó la concentración hepática de GSH como parte de la caracterización de los efectos por estrés oxidante que dicha mezcla puede causar (Belmont *et al.*, 2011). Al elaborar una prueba de correlación entre la actividad de GSTT1-1 y los valores de GSH, se encontró una asociación positiva entre la cantidad de GSH y la actividad de GSTT1-1 (**Fig. 8.ai**). Como se sabe que el GSH puede ser inducido mediante el factor NrF2 (Harvey *et al.*, 2009), es posible que el mecanismo de la inducción de GSTT1-1 del presente trabajo sea a través de NrF2 y el ARE.

En general, se considera que la inducción en la expresión de las GSTs forma parte de un proceso de adaptación que permite a la célula sobrevivir a la exposición de xenobióticos dañinos y productos de estrés oxidante que pueden ser carcinogénicos (Jowsey y Hayes, 2007). No obstante, en el caso del metabolismo de la mezcla en estudio, la inducción en la actividad de GSTT1-1 podría incrementar la producción de metabolitos reactivos (Sherrat *et al.*, 1997), y así contribuir a la toxicidad de la mezcla.

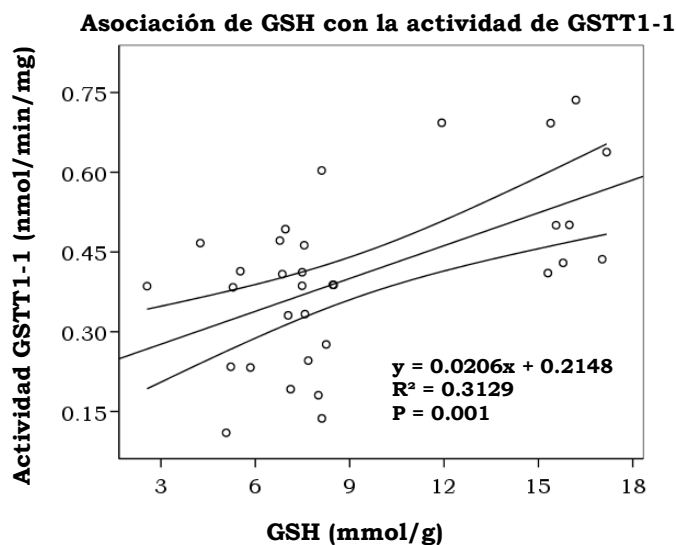


Figura 8.ai. Asociación positiva entre la cantidad de GSH y la actividad enzimática de GSTT1-1 en rata. Cada punto representa la asociación de los dos parámetros medidos en cada animal. Tomado y modificado de Belmont *et al.*, 2011.

8.b. Genotoxicidad y proliferación hepática

Cuando se presenta la bioactivación de compuestos químicos, éstos tienden a interactuar con biomoléculas como el ADN, lo cual puede aumentar el nivel de daño en el material genético (Sherrat *et al.*, 1998). El DCM y CLF son contaminantes cuyos metabolitos reactivos (S-Clorometilglutación y fosgeno, respectivamente) poseen un bajo potencial genotóxico (Chou, 1997; WHO, 2000); sin embargo, con base en los resultados obtenidos en el estudio del río Atoyac y Xochiac (Montero *et al.*, 2006), se esperaba que al ser éstos compuestos integrantes de la mezcla de exposición, fueran capaces de inducir daño genotóxico *in vivo*.

Al observar los resultados de MNHEP obtenidos en este trabajo, se puede notar que aunque no se produjo incremento en la genotoxicidad hepática mediante la exposición a la mezcla de VOC en ninguna dosis, se distingue una tendencia. Lo anterior pudo deberse a dos posibles razones: que la expresión de MN puede alterarse a través de la proliferación del tejido de estudio (Suzuki *et al.*, 2004) o que la cantidad de MN puede subestimarse durante la evaluación de las células.

Ya que la formación de MN puede verse alterada por los índices de proliferación, era necesario utilizar un hígado que estuviera en un estado de proliferación suficiente como para apreciar la expresión de MN. Se ha reportado que la proliferación del hígado de las ratas jóvenes es mayor que la de las ratas adultas (Parton y Garriot, 1997) y por lo mismo han sido utilizadas con éxito en evaluaciones de MNHEP (Suzuki *et al.*, 2004). De esta manera, al manipular ratas de cuatro semanas de edad en el presente trabajo, se asumió que la proliferación no sería un obstáculo para la expresión de MNHEP.

Los resultados de Ki-67 (**Fig.7.ci**) indican que la proliferación hepática de las ratas tratadas con los VOC no se vio significativamente alterada con respecto a la proliferación de las ratas CT; sin embargo, las ratas tratadas con el hepatocarcinógeno DEN (utilizado como control positivo) mostraron incrementos en la proliferación, así como en la frecuencia de MNHEP, lo que evidencia la estrecha relación que existe entre la proliferación y la formación de MN en nuestro sistema de estudio.

Durante la evaluación de MNHEP, de acuerdo con el protocolo de Parton y Garriot (1997), se consideraron todos los hepatocitos teñidos con Giemsa; este colorante no hace distinción entre los hepatocitos que se dividieron y los que no. Como los MN se evidencian mediante la división celular, es posible que durante la valoración se hayan considerado células que no poseían algún MN debido a que aún no se dividían, y por lo tanto, se pudo haber subestimado la cantidad de MNHEP.

Ya que la vida media de un hepatocito es de aproximadamente 200 días, se propone la aplicación de dosis múltiples (14-28 dosis, una por día) con el fin de permitir que los hepatocitos se dividan y así poder evidenciar la formación de MNHEP a pesar de la baja proliferación hepática en rata (Hamada *et al.*, 2011). Además, para tener una mayor precisión de los MN producidos a partir de la exposición, sería preferible evaluar solamente los hepatocitos que se dividieron a partir del tratamiento (Morita *et al.*, 2011), marcándolos o identificándolos de alguna manera.

Con el fin de detectar las células de reciente proliferación, en la prueba de micronúcleos se han utilizado marcadores de proliferación como la bromodesoxiuridina (análogo de la timina) (Morita *et al.*, 2011) o la citocalasina B (inhibidor de la citocinesis) (Müller y Streffer, 1994). Los resultados del presente trabajo indican que la determinación de la proliferación es crucial para una evaluación más precisa de la frecuencia de MN, por lo tanto se sugiere la incorporación de biomarcadores de proliferación en la prueba de MNHEP *in vivo*, por ejemplo el uso de la bromodesoxiuridina en las ratas durante el tratamiento de 10 a 28 días.

8.c. Genotoxicidad y proliferación en médula ósea

Teniendo como antecedente que la médula ósea es el tejido preferente para realizar la prueba de MN después de una exposición *in vivo* y que el perfil de los MN en este tejido puede complementarse con el perfil de MNHEP, se tenía la expectativa de que podían apreciarse MNPCE (Parton y Garriot, 1997). No obstante, no se observó un incremento en los MNPCE e incluso hubo una disminución de su frecuencia en la dosis alta.

El nulo incremento y la disminución en la frecuencia de MNPCE puede explicarse por la influencia de la proliferación en la formación de MN (ver discusión en el apartado 8.b). Parton y Garriot (1997) reportó que la diferencia entre las frecuencias de MN en MO y HEP puede atribuirse a la actividad mitótica característica de cada tejido: la proliferación de la médula ósea es alrededor de seis veces mayor que la del hígado. Por consiguiente, en este estudio no se consideró en un inicio que la proliferación en la MO fuera una limitante para la formación de MN.

Los resultados concernientes al %PCE mostraron una disminución de la proliferación como consecuencia de la exposición a la mezcla de VOC. En este caso la causa pudo ser la citotoxicidad de la mezcla (Krishna y Hayashi, 2000) producida bajo el régimen de exposición utilizado (tres dosis); es decir, los VOC estudiados pueden inhibir la replicación o causar muerte celular.

Con las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio (ver diseño en el apartado 5.a) no se observó incremento en el daño genotóxico; sin embargo, en un estudio posterior (Belmont *et al.*, 2011), se realizó una exposición aguda (una sola administración) a las mismas dosis de la mezcla de VOC utilizadas en este estudio. Como resultado, se obtuvo aumento significativo de la frecuencia de MNPCE y del %PCE de manera dosis-dependiente. Lo anterior permite afirmar que la mezcla es genotóxica, pero que esto dependerá de los tiempos de exposición y la capacidad de respuesta del tejido; en el diseño que incluyó 72 horas de tratamiento, la formación de MNPCE se vio comprometida por la repetición de las dosis y la disminución de la proliferación.

8.d. Relación genotoxicidad y citotoxicidad con la actividad de GSTT1-1 en hígado

Debido a que GSTT1-1 es la enzima de fase II responsable de la bioactivación de los haloalcanos (Shokeer y Mannervik, 2010), la genotoxicidad producida por la mezcla de estudio (MN) podría estar relacionada con la actividad de GSTT1-1.

En la correlación elaborada con los resultados hepáticos del presente estudio (**Fig. 8.di**) no se apreció la relación antes mencionada, esto pudo deberse a dos factores principalmente, el primero es que la bioactivación por GSTT1-1 de los compuestos presentes en la mezcla catalizada no produjo rompimiento de ADN ni cambios en el huso mitótico, los cuales son eventos que se ven reflejados en la formación de MN. El segundo factor implicaría la baja proliferación hepática (ver apartado 8.b).

Se ha reportado que el CLF y el DCM son capaces de inducir daño genético como mutaciones, rompimiento de ADN, aberraciones, etc. (ver apartado 3.3.b). De acuerdo con lo anterior, es probable que los VOC de la mezcla de estudio no hayan producido eventos clastogénicos ni aneugénicos significativos porque la concentración empleada de la mezcla no haya sido suficiente para poder tener una cantidad apropiada de intermediarios reactivos.

Relación de actividad de GSTT1-1 con genotoxicidad hepática

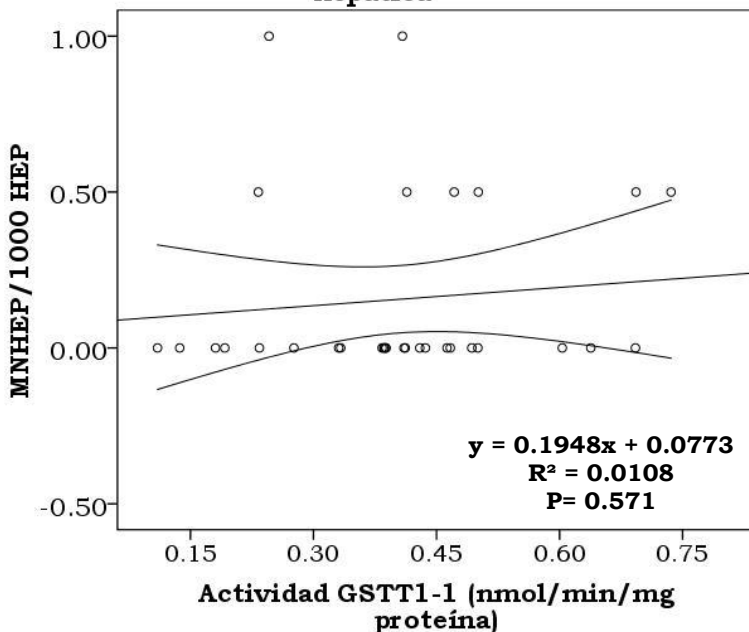


Figura 8.di. Correlación entre la actividad enzimática de GSTT1-1 y la frecuencia de MNHEP en rata. Cada punto representa la actividad enzimática de GSTT1-1 y la frecuencia de MNHEP de cada animal.

Ya que la actividad de GSTT1-1 hacia los haloalcanos produce metabolitos reactivos (Shokeer y Mannervik, 2010) que pueden dañar la integridad celular, la citotoxicidad que la mezcla de estudio produjo podía estar relacionada con la actividad de GSTT1-1.

Relación de actividad de GSTT1-1 con proliferación hepática

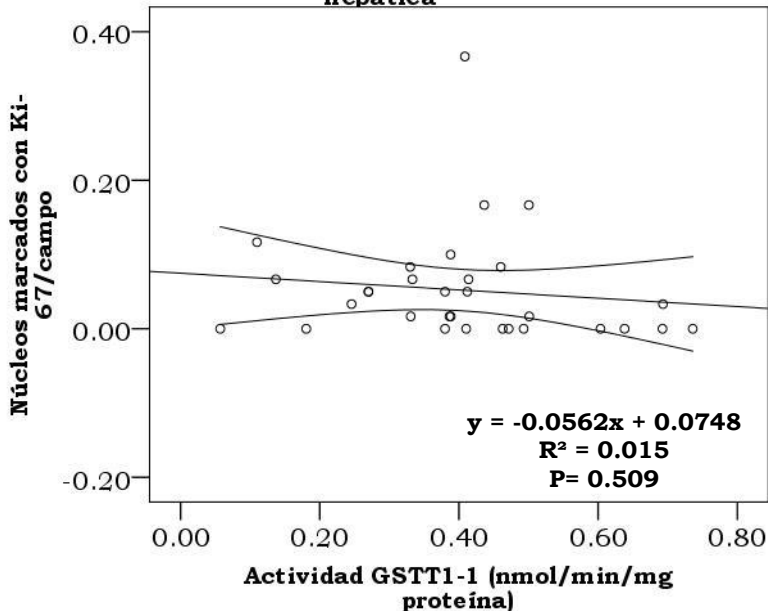


Figura 8.dii. Correlación entre la actividad enzimática de GSTT1-1 y la proliferación hepática en rata. Cada punto representa la actividad enzimática de GSTT1-1 y los núcleos marcados por campo de cada animal.

En la **fig. 8.dii** se puede observar que no hubo correlación entre el marcador de citotoxicidad empleado en el presente estudio (Ki-67) y la actividad de GSTT1-1 en hígado. Probablemente esto se deba a que el bajo índice de proliferación hepático no permitió apreciar claramente los cambios del parámetro Ki-67.

9. Conclusiones

- Los experimentos realizados en este estudio permitieron identificar que la exposición simultánea a la mezcla de tolueno, cloroformo y diclorometano es capaz de inducir la actividad enzimática de GSTT1-1 en la dosis más baja, pero en las dosis mayores los mecanismos de protección son rebasados.
- La exposición a la mezcla de VOCs no produjo incremento en la frecuencia de micronúcleos en hígado ni en médula ósea bajo el régimen de exposición de 72 horas, pero existe una tendencia a aumentar los MN. No obstante en experimentos adicionales a esta tesis, la mezcla de estudio resultó genotóxica bajo un régimen de 24 horas.
- Adicionalmente, la evaluación de los biomarcadores de proliferación (%PCE y Ki-67, respectivamente) permitió sugerir una relación positiva entre los MN y la proliferación hepática y de MO, por lo tanto se sugiere la incorporación de biomarcadores de proliferación en el protocolo de MNHEP.
- La relación esperada entre la frecuencia de MNHEP y la actividad de GSTT1-1 no resultó evidente bajo las condiciones experimentales realizadas, por lo que se puede afirmar que la inducción en la actividad enzimática de GSTT1-1 debida a las concentraciones probadas de la mezcla, no confirió susceptibilidad a presentar mayor daño genotóxico.
- No se observó una relación lineal entre el biomarcador Ki-67 de proliferación hepática y la actividad de GSTT1-1, probablemente un impedimento para esclarecer esta relación es la baja proliferación del hígado.

10. Referencias

- Albert, L. A.** (2004). Toxicología ambiental. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. 453 p.
- Angelieri, F., T. Cássia G.M., V. Carlin, C. Tizuko F.O. y D. Araki R.** (2010). Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Clinical Oral Investigations*, 14: 669-674.
- Armstrong, R.N.** (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10: 2-18.
- Belmont, J., A. López, E. Molina, L. Serrano, E. Coballase, N. Cárdenas, P. Medina y R. Montero** (2011). Co-exposure to chloroform, dichloromethane and toluene induced oxidative stress and xenobiotic metabolism changes but not genotoxic damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, EMS 42nd annual meeting, 52 (S1): S79.
- Bonassi, S., A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W.P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M.P. Bigatti, C. Bolognesi, A. Cebulska-Wasilewska, E. Fabianova, A. Fucic, L. Hagmar, G. Joksic, A. Martelli, L. Migliore, E. Mirkova, M.R. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa y M. Fenech** (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.
- Bonassi, S., R. El-Zein, C. Bolognesi y M. Fenech** (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26: 93-100.
- CBMNR (Committee on Biological Markers of the National Research Council)** (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74: 3-9.
- Chiang, W., Y. Hsieh, S. Yang, T. Lu y S. Chu** (2007). Differential expression of glutathione-S-transferase isoenzymes in various types of anemia in Taiwan. *Clinica Chimica Acta*, 375: 110-114.
- Chou, S.** (1997). Toxicological profile for chloroform. U.S.A. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 293 p.
- Cliet, I., C. Melcion y A. Cordier** (1993). Lack of predictivity of bone marrow micronucleus test versus testis micronucleus test: comparison with four carcinogens. *Mutation Research*, 292: 105-111.
- Comisión Nacional del Agua** (2011). Proyectos estratégicos de agua potable, drenaje y saneamiento, 19 de agosto de 2011. <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/SeguimientoPNI.pdf>
- Compton, S.J. y C.G. Jones** (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford Protein Assay. *Analytical Biochemistry*, 151: 369-374.
- Dávila, V. M.** (2002). Alteraciones de la actividad enzimática de cyp1a1, cyp2b1 y cyp2e1, por infección con cisticercos de *Taenia taeniformis* en hígado de rata.

Tesis Profesional en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México, D.F., 71 p.

- Decodier, I.** (2006). The *in vitro* micronucleus test: from past to future. Mutation Research, 607: 2-4.
- Diario Oficial de la Federación.** Primera sección. Miércoles 26 de enero de 2011. Pp. 16-60.
- Dictamen de la Comisión de Medio Ambiente y Recursos Naturales,** LXI Legislatura de la Cámara de Diputados; expediente número 792, sesión 17/02/2010.
- Dorsey, A., P.R. McClure, A.R. McDonald y M. Singh** (2000). Toxicological profile for toluene. U.S.A. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 312 p.
- Fenech, M.** (2006). Cytokinesis- block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability mitotic dysfunction and cell death. Mutation Research, 600: 58-66.
- Gollapudi, B.B. y L.G. Mc Fadden** (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Research, 347: 97-99.
- Guengerich, F. P.** (2001). Analysis and characterization of enzymes and nucleic acids. En: Hayes, A.W. (Ed.). Principles and methods of toxicology. Boston Massachusetts, U.S.A., p. 1625-1687.
- Hamada, S., R. Takashima, K. Shimada, K. Zaizen, S. Kawakami, J. Tanaka, H. Matsumoto, T. Nakai, H. Suzuki, S. Matsumura, H. Sanada, K. Inoue, S. Muto, S. Hagio, A. Hayashi, T. Takayanagi, Y. Ogiwara, A. Maeda, K. Narumi, H. Takasawa, I. Ogawa, W. Ohyama, M. Nakajima, T. Morita, H. Kojima, M. Hayashi y M. Honma** (2011). Evaluation of the repeated dose liver micronucleus assay in rats: summary of the collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Environmental and Molecular Mutagenesis, EMS 42nd annual meeting, 52 (S1): S56.
- Harvey, C.J., R.K. Thimmulappa, A. Singh, D.J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers y S. Biswal** (2009). Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 46: 443-453.
- Hayes, J.D., J.U. Flanagan y I.R. Jowsey** (2005). Glutathione transferases. U.S.A. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45: 51 – 88.
- IARC** (1999). Re-evaluations of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs, 71: 829-864.
- Jowsey, I.R. y J.D., Hayes** (2007). Mammalian Glutathione S- Transferases genes: structure and regulation. En: Awasthi, Y.C. (Ed.). Toxicology of glutathione transferases. U.S.A., p. 27-41.
- Juronen, E., G. Tasa, M. Uusküla, M. Pooga y A. Mikelsaar** (1996). Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione s-transferase T1-1. Biochemistry and Molecular Biology International, 39:21-29.
- Kaita, K.D.E., N. Pettigrew y G.Y. Minuk** (1997). Hepatic regeneration in humans with various liver disease as assessed by Ki-67 staining of formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue. Liver, 17: 13-16.

- Ketterer, B.** (1998). Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. Free Radical Research, 28: 647 – 658.
- Krishna, G. y M. Hayashi** (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research, 455: 155-166.
- Lehman-McKeeman, L.D.** (2008). Absorption, Distribution, and Excretion of toxicants. En: Klaassen, C.D. (Ed.). Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 7ª edición. U.S.A., p. 131-157.
- Levi, P.E. y E. Hodgson** (2001). Reactive metabolites and toxicity. En: Hodgson, E. (Ed.). Introduction to biochemical toxicology. 3ª edición .U.S.A., p. 199-220.
- Mainwaring, G.W., S.M. Williams, J.R. Foster, J. Tugwood y T. Green** (1996). The distribution of theta class glutathione s-transferases in the liver and lung of mouse, rat and human. The Biochemical Journal, 318: 297-303.
- Mannervik, B. y P. Jemth** (1999). Measurement of glutathione transferases. En: Maines, M. (Editor-in-Chief), Lucio G. Costa, Ernest Hodgson, Donald J. Reed. (Eds.). Current Protocols in Toxicology. John Wiley & Sons. Nueva York/ Nueva Jersey, p. 6.4.1-6.4.10.
- Meyer, S.A.** (2001). Overview of celular techniques in toxicology. En: Hodgson, E. (Ed.). Introduction to biochemical toxicology. 3ª edición. U.S.A., p. 51-65.
- Mohtashampur, E., K. Norpoth, U. Woelke y P. Huber** (1985). Effects of ethylbenzene, toluene, and xylene on the induction of micronuclei in bone marrow polychromatic erythrocytes of mice. Archives of Toxicology, 58:106-109.
- Montero, R., L. Serrano, A. Araujo, V. Dávila, J. Ponce, R. Camacho, E. Morales y A. Méndez** (2006). Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. Mutagenesis, 21: 335-342.
- Morita, T., J.T. MacGregor y M. Hayashi** (2011). Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. Mutagenesis, 26: 223-230.
- Müller, W. U. y C. Streffer** (1994). Micronucleus assays. En: Obe, G. (Ed.). Advances in Mutagenesis Research. Springer, Berlin, p. 1-108.
- Navarro, I., E.F. Valverde y R. Valladares** (2004). Estudio Ambiental. En: Castro, O. (Ed.). Ambiente y derechos humanos. Documentación y seguimiento de casos de Leucemia y Trombocitopenia por contaminación del río Atoyac, Puebla-Tlaxcala. México, p. 27-58.
- Norppa, H.** (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. Toxicology Letters, 149: 309-334.
- Parton, J.W. y M.L. Garriot** (1997). An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four-week-old rats treated with known clastogens. Environmental and Molecular Mutagenesis, 29:379-385.
- Preston, R. J. y G.R. Hoffmann** (2001). Genetic toxicology. En: Klaassen, C.D. (Ed.). Toxicology: the basic science of poisons. U.S.A., p. 321-350.
- Raza, H., M.A. Robin, J.K. Fang y N. G. Avadhani** (2002). Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. The Biochemical Journal, 366: 45- 55.

- ROC (Report on Carcinogens)** (2011). Dichloromethane profile. 12ª edición. National Toxicology Program, Department of Health and Human Services.
- Romagna, F. y C.D. Staniforth** (1989). The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Research, 213: 91-104.
- Rose, R.L. y E. Hodgson** (2001). Adaptation to toxicants. En: Hodgson, E. (Ed.). Introduction to biochemical toxicology. 3ª edición. U.S.A., p. 163-198.
- Rothman, N., W.F. Stewart y P.A. Schulte** (1995). Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 4: 301-311.
- Scholzen, T. y J. Gerdes** (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. Journal of Cellular Physiology, 182: 311-322.
- Sheehan, D., G. Meade, V.M. Foley y C.A. Dowd** (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. The Biochemical Journal, 360:1-15.
- Sherrat, P.J., D.J. Pulford, D.J. Harrison, T. Green y J.D. Hayes** (1997). Evidence that human class theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyze the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. The Biochemical Journal, 326: 837-846.
- Sherrat, P.J., M.M. Manson, A.M. Thomson, E.A.M. Hissink, G.E. Neal, P.J. Van Bladeren, T. Green y J.D. Hayes** (1998). Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class Theta glutathione S-transferase T1-1. The Biochemical Journal, 335: 619-630.
- Shokeer, A. y B. Mannervik** (2010). Residue 234 is a master switch of the alternative-substrate activity profile of human and rodent theta class glutathione transferase T1-1. Biochimica et Biophysica Acta, 1800: 466-473.
- Spicer, C.W., S.M. Gordon, M. W. Holdren, T. J. Kelly y R. Mukund** (2002). The title III Hazardous Air Pollutants: classification and basic properties. En: Spicer, C.W. (Ed.) Hazardous Air Pollutants Handbook: Measurements, properties and fate in ambient air. U.S.A., p. 11-54.
- Stern, M.C., P.E. Norbert, P. Koper y J.A. Taylor** (2001). Molecular epidemiology. En: Hodgson, E. (Ed.). Introduction to biochemical toxicology. 3ª edición. U.S.A., p. 415-434.
- Suárez, K.** (2008). Efecto de los polimorfismos de CYP1A1 y CYP2E1 en la frecuencia de micronúcleos en una población mestiza de Tlaxcala. Tesis Profesional en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 70 p.
- Suzuki, H., T. Shirotori y M. Hayashi** (2004). A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation. Cytogenetic and Genome Research, 104: 299-303.
- Szajewski, J. y Praski, S.** (1990). Chloroform Poisons Information Monographs : PIM 121. Poland. International Program on Chemical Safety.
- Thier, R., F.A. Wiebel, A. Hinkel, A. Burger, T. Brüning, K. Morgenroth, T. Senge, M. Wilhelm y T. Schulz** (1998). Species differences in the glutathione transferase GSTT1-1 activity towards the model substrates methyl chloride and dichloromethane in liver and kidney. Archives of Toxicology, 72:622-629.

- Wakabayashi, N.,** S.L. Slocum, J.J. Skoko, S. Shin y T.W. Kensler (2010). When NRF2 talks, who's listening?. *Antioxidants and Redox Signaling*, 13: 1649-1663.
- Walker, C.H.,** S.P. Hopkin, R.M. Sibly y D.B. Peakall (2006). Principles of ecotoxicology. 3ª edición. U.S.A. 315 p.
- Watts, P.,** G. Long y M.E. Meek (2004). Concise international chemical assessment document; 58. Ed. Marla Sheffer. Geneve, Switzerland. World Health Organization. 60 p.
- Wilson, J.D.,** M.E. Fransen, F. Lladós, M. Singh y G.L. Diamond (2000). Toxicological profile for methylene chloride. U.S.A. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 269 p.
- World Health Organisation** (2000). Chapter 5.14: Toluene. In: Air Quality Guidelines. 2ª edición. Copenhagen, Denmark. 20 p.
- World Health Organisation** (2000). Chapter 5.7: Dichloromethane. In: Air Quality Guidelines. 2ª edición. Copenhagen, Denmark. 14 p.
- Zimniak, P.** y S. P. Singh (2007). Families of Glutathione Transferases. En: Awasthi, Y.C. (Ed.). Toxicology of glutathione transferases. U.S.A., p. 11-21.