



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de la susceptibilidad genética en niños
expuestos a contaminantes ambientales
provenientes de residuos electrónicos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Nancy Itzel Mondragón Velázquez

TUTORA

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya



Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicado a los niños que participaron en este estudio
y a todos los niños que sin elegirlo viven en condiciones semejantes.

A Diana y Natalia.

“Fog everywhere. Fog up the river, where it flows among green aits and meadows; fog down the river, where it rolls defiled among the tiers of shipping and the waterside pollutions of a great (and dirty) city. Fog on the marshes, fog on the heights. Fog creeping into the cabooses of collier-brigs; fog lying out on the yards, and hovering in the rigging of great ships; fog drooping on the gunwales of barges and small boats. Fog in the eyes and throats of ancient pensioners, wheezing by the firesides of their wards; fog in the stem and bowl of the afternoon pipe of the wrathful skipper, down in his close cabin; fog cruelly pinching the toes and fingers of his shivering little 'prentice boy on deck. Chance people on the bridges peeping over the parapets into a nether sky of fog, with fog all round them, as if they were up in a balloon, and hanging in the misty clouds.”

Charles Dickens, Bleak House (fragmento).

Agradezco especialmente a las siguientes personas e instituciones sin las que este trabajo no hubiera sido posible.

A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por permitirme completar mi formación académica, y por permitirme realizar este trabajo.

A la Dra. Leticia Yañez por darme la oportunidad de involucrarme en este proyecto, por introducirnos con los niños y sus padres, compartir sus resultados para complementar este estudio, por su guía y sus consejos.

A la Dra. Regina Montero por ser mi guía desde que llegué a su laboratorio, despertar mi interés en la toxicología ambiental y enseñarme desde las bases todo lo que constituye este trabajo. Gracias por su enorme paciencia y por estar dispuesta a ayudarme cada vez que lo necesité.

A Luis Serrano por capacitarme para el ensayo de MN, por las muchas muestras que me ayudó a preparar y evaluar, por todo el tiempo que me dedicó cada vez que tuve una duda y por su gran apoyo en general.

Gracias:

A Karen Suárez por enseñarme las técnicas para determinación de polimorfismos, por responder cada pregunta que le hice y ayudarme cada que algo no salía como esperaba, por el apoyo que no dejó de darme desde que llegué al taller.

A los miembros del laboratorio, todos me ayudaron en algún punto. A Toño, Sol, Selene,

A Fernando, Paulina, Fátima y Rocío por además ser mis amigos.

A mis padres Lucio e Irma y a mis hermanas, Brenda, Angie y Maribel, que me han ayudado tanto desde siempre y que nunca han perdido la fe en mí.

A mi tía Reyna, por ser mi segunda mamá.

A mis amigas, Mina, Alitzel, Sally, Itzel y Jair por sus ánimos.

A Pablo, por su inmenso cariño y por ser TODO lo que he necesitado que sea.

Contenido

Resumen.....	3
Abreviaturas.....	4
Introducción.....	5
Compuestos orgánicos persistentes - Retardantes de flama en residuos electrónicos.....	7
PCBs.....	7
PBDEs.....	8
Efectos en salud de PBDEs.....	9
Metales/metaloideos pesados.....	10
Plomo (Pb).....	11
Mercurio (Hg).....	11
Cromo (Cr).....	11
Cadmio (Cd).....	11
Arsénico (As).....	12
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	12
Exposición aérea (daños a aparato respiratorio).....	13
CYP1A1.....	16
Superfamilia Glutación S-transferasas (GST).....	17
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
Material y método.....	21
Extracción de DNA.....	23
CYP1A1.....	23
Digestión con la enzima de restricción BsrDI.....	23
GSTT1 y GSTM1.....	24
Resultados.....	26
Población de estudio.....	26
Sistema de micronúcleos en mucosa oral.....	27
Frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos de CYP1A1.....	28
Frecuencias genotípicas de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1.....	29
Frecuencias genotípicas en combinaciones de polimorfismos.....	29
Daño genotóxico y citotóxico en relación con los polimorfismos metabólicos.....	31
Discusión.....	36

Población de estudio	36
Sistema de micronúcleos en mucosa oral.....	36
Frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos de CYP1A1.....	37
Frecuencias genotípicas de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1	37
Frecuencias genotípicas en combinaciones de polimorfismos	38
Daño genotóxico y citotóxico en relación con los polimorfismos metabólicos	38
Daño genotóxico en relación con metales y metaloides pesados	39
Anexo	43
Referencias.....	45

Resumen

El constante crecimiento en la generación de residuos electrónicos (residuos-e) y las limitadas normas sobre su manejo constituyen un gran problema para México y el resto del mundo en el ámbito de la salud pública. En nuestro país gran parte de estos desechos llegan a su disposición final a manos de trabajadores informales, que sin ningún tipo de protección desmantelan y queman partes de residuos-e liberando diversos contaminantes tales como retardantes de flama (PCBs y PBDEs), metales y metaloides pesados e hidrocarburos policíclicos aromáticos, la exposición a estos agentes pone en riesgo la salud de los propios trabajadores, su familia y el resto de su comunidad. Este estudio aborda este problema desde la perspectiva de los efectos a nivel genético asociados a la susceptibilidad individual. Para ello se determinaron los polimorfismos genéticos de enzimas del metabolismo de xenobióticos de fase I: CYP1A1 (genotipos Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val) y de fase II: GSTT1 y GSTM1 (genotipos nulos y funcionales), así como eventos de genotoxicidad y citotoxicidad mediante el ensayo de MN en mucosa oral. Las frecuencias genotípicas para los tres genes son consistentes con las reportadas en poblaciones mexicanas. Contrario a lo que se esperaba, los resultados indican que los niveles de daño genotóxico en la población no son superiores a los descritos previamente para grupos de niños en ambientes limpios. Por otro lado, hay una tendencia al aumento de daño genotóxico en portadores de los genotipos GSTT1 nulo y GSTM1 nulo. Finalmente, la frecuencia de células binucleadas y otros eventos de citotoxicidad reflejan una posible asociación con los niveles de metales pesados a los que la población se ve expuesta.

Abreviaturas

Ácido desoxirribonucleico *	DNA
Acido Etileno-diamino-tetraacético	EDTA
Acido Ribonucleico*	RNA
Agencia para Sustancias Tóxicas y el registro de enfermedades*	ATSDR
Arsénico	As
Bifenilos Polibromados *	PBBs
Bifenilos Policlorados *	PCBs
Cadmio	Cd
Citocromo P450	CYP
Cloruro de sodio	NaCl
Cromo	Cr
Citocromo P450 1A1 (enzima)	CYP1A1
Citocromo P450 1A1 (gen)	<i>CYP1A1</i>
Deoxy- Nucleotido trifosfato	dTPN
Difeniléteres polibromados *	PBDEs
Glutación S-transferasa	GST
Glutación S-transferasa Mu 1 (enzima)	GSTM1
Glutación S-transferasa Mu 1 (gen)	<i>GSTM1</i>
Glutación S-transferasa Theta 1 (enzima)	GSTT1
Glutación S-transferasa Theta 1 (gen)	<i>GSTT1</i>
Hexabromociclododecano	HBCD
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos*	PAHs
Isoleucina	Ile
Agencia Internacional para la investigación del Cáncer*	IARC
Mercurio	Hg
Micronúcleo	MN
Mili Molar	Mm
PAH de alto peso molecular	HPAH
PAH de bajo peso molecular	LPAH
Plomo	Pb
Polimorfismo de un solo nucleótido	SNP
Proyecto de micronucleos humanos	HUMN
Reacción en cadena de Polimerasas	PCR
Receptor Aryl Hidrocarburo	AhR
Residuo de Manejo Especial	RME
Residuo Electrónico	Residuo-e
Retardante de flama Bromado	BFR
RNA mensajero	mRNA
Tetrabromobisfenol	PBBPA
Translocador nuclear del receptor Aryl hidrocarburo	ARNT
Tris- Acido clorhídrico	Tris-HCl
Tubos de Rayos Catódicos	CRT
Valina	Val

*Por sus siglas en inglés

Introducción

Los residuos-electrónicos

Los residuos-electrónicos (residuos-e) son aparatos electrónicos que han sido desechados por su propietario debido a que dejaron de cumplir la función por la que fueron adquiridos. Entre los más comunes se cuentan teléfonos celulares, agendas electrónicas, reproductores de música, computadoras personales, consolas de videojuego, decodificadores, discos duros, equipos de red, impresoras, copiadoras, pantallas, televisores, reproductores de video, además de sus accesorios, cables y conexiones.

La fabricación de este tipo de residuos a nivel global ha alcanzado niveles preocupantes. En el mundo se generan entre 20 y 50 millones de toneladas de residuos-e al año (Chen et al. 2009) y es considerada la producción de basura con mayor crecimiento en el mundo industrializado (crece 3-5% al año). La enorme elaboración de estos residuos se debe a que la industria electrónica es una de las más grandes en todo el mundo y es la de crecimiento más veloz, tiene una rápida producción de aparatos electrónicos con actualizaciones o mejoras técnicas anuales, que los convierten en obsoletos con excesiva rapidez (Biganzoli et al. 2015; Yang et al. 2013a)

La problemática en torno a la disposición de residuos-electrónicos radica en el riesgo que implica, a la salud y al ambiente, la liberación de los componentes presentes en los residuos-e al manejarlos en condiciones inadecuadas. Diversas sustancias contenidas en este tipo de residuos han sido asociadas con efectos nocivos a la salud (Puckett et al. 2002). Es por ello que son clasificados como Residuos de Manejo Especial o Residuos Peligrosos en las normas referentes a la disposición de residuos (SEMARNAT 2010).

El manejo de este tipo de residuos es de importancia en la política internacional, lo que ha conducido a acuerdos multilaterales de entre los que destaca el acuerdo de Basilea firmado en 1990 por 178 países que se comprometieron a reducir en lo posible la producción de residuos electrónicos, manejarlos de forma ambientalmente responsable y limitar el movimiento fronterizo de residuos peligrosos (Mostalac Valdivieso 2014). Sin embargo, algunos países han continuado exportando residuos-e para su disposición a países menos desarrollados, principalmente a China, India y Pakistán. Hasta 2010, se estimaba que China importaba de manera ilegal aproximadamente 28 toneladas de basura electrónica al año (Puckett et al. 2002; Yang et al. 2013).

La situación en México

En México, el INE (Instituto Nacional de Ecología) mediante su inventario de generación de desechos electrónicos, con base en datos de producción, importación y uso, y de acuerdo a la vida útil supuesta para cada aparato, calculó la generación neta de estos residuos entre 180 000 y 250 000 toneladas sólo en 2006 (INE 2007).

La política de nuestro país respecto al manejo de residuos electrónicos existe a nivel federal, en la Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) que establece en su Artículo 28 fracción III que mediante la política de responsabilidad compartida “los grandes generadores, productores, importadores, exportadores y distribuidores de los

productos en cuestión están obligados a la formulación y ejecución de planes de manipulación de Residuos de Manejo Especial” (RME; LGPGIR 2003). Mientras que a nivel estatal cada entidad cuenta con una ley de Protección ambiental encargada del acopio de RME (SEMARNAT 2010).

Sin embargo, gran parte de los residuos generados en nuestro país llegan a su destino final a manos de “pepenadores”, personas dedicadas a la adquisición clandestina de residuos-e y que utilizan métodos improvisados, principalmente incineración y desensamblado, para la recuperación de componentes de valor (vidrio y metales). Esta economía informal genera grandes riesgos para la salud de los practicantes, sus familias, su comunidad y el ecosistema que les rodea.

Componentes liberados durante el manejo informal de aparatos electrónicos

Durante el proceso de desmembramiento e incineración de los componentes electrónicos en condiciones improvisadas existe liberación al ambiente de numerosos compuestos químicos que, dependiendo de la dosis, tiempo y la ruta de exposición, representan un riesgo importante para la salud de la población y para el ecosistema.

Los principales contaminantes liberados durante el manejo de residuos-e han sido englobados en tres categorías: compuestos orgánicos persistentes, metales pesados, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Tabla 1).

TABLA 1. Agentes de riesgo liberados en el manejo de residuos-e

Tipo de contaminante	Asociación	Principales efectos nocivos	Referencia
Compuestos orgánicos persistentes	Añadidos a los plásticos y circuitos	Inmunosupresión, genotoxicidad, daños neurodegenerativos, disrupción endócrina.	Puckett et al. 2002
Metales pesados	Componentes de cables, circuitos, baterías, Tubos de rayos catódicos (CRTs)	Daños en el sistema nervioso central y periférico, en desarrollo cerebral, y en riñón e hígado.	Song y Li 2015
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Liberados durante la combustión de plásticos y en los promotores de fuego comúnmente utilizados	Daños al sistema inmune, afectan crecimiento y reproducción, inducción de tumores.	Meador y Fisheries 2006

Compuestos orgánicos persistentes - Retardantes de flama en residuos electrónicos

Los difeniléteres polibromados (PBDEs) y bifenilos policlorados (PBCs) son sustancias ampliamente utilizadas como retardantes de flama en gran diversidad de materiales, entre los que se pueden contar plásticos, pinturas, textiles y circuitos electrónicos.

Los retardantes de flama pueden ser reactivos o aditivos, los primeros son incorporados en el material polimérico formando una unión covalente entre las moléculas del retardante de flama y el polímero, mientras que los aditivos son disueltos en el polímero sin constituir enlaces covalentes (Rahman et al. 2001). Debido a su naturaleza y su unión con los polímeros son liberados al ambiente con facilidad en condiciones normales, sin embargo ésta aumenta durante la combustión. Usualmente los retardantes de flama son comercializados en mezclas y algunos de estos componentes han mostrado ser lipofílicos y persistentes, por tanto, bioacumulables en los organismos, incluido el ser humano.

PCBs

Los bifenilos policlorados (PCBs) son sustancias con características físicas y químicas que les brindan estabilidad ante altas temperaturas son resistentes a ácidos y bases, así como a la oxidación y la reducción, no son inflamables y son excelentes aislantes. Debido a lo anterior han sido ampliamente utilizados como fluidos de transferencia de calor, fluidos hidráulicos, extensores de disolventes, fluidos dieléctricos y retardantes de flama (Fromme et al. 2015; Stohs et al. 2014).

Los PCBs fueron producidos en grandes cantidades desde la década de 1940 y hasta la década de los 70s en que su producción fue prohibida internacionalmente debido a los efectos tóxicos que se demostró que conllevan (Loganathan y Masunaga 2015). En México no hubo producción de estos compuestos, sin embargo se calcula que hasta la década de los 80s se importaron entre 6 mil y 20 mil toneladas de PCBs provenientes de E.U., Europa y Japón (Instituto Nacional de Ecología 1997), esto sin considerar las cantidades que ya contenían ciertos productos importados.

Solían comercializarse en mezclas complejas que podían contener hasta 209 congéneres (compuestos con base en la misma estructura química que difiere únicamente en el número y posición de los sustituyentes de cloro). Las principales mezclas empleadas alrededor del mundo fueron Aroclor 1260, Clofen A50, Clorextol, Fenclor, Inerteen y Kaneclor, entre otros.

Son absorbidos durante exposición oral, dérmica e inhalación. Son metabolizados principalmente en el hígado, mediante hidroxilación y conjugación con ácido glucurónico (Stohs et al. 2014). La eficiencia en el metabolismo de PCBs se ve afectada por varios factores tales como la pureza del compuesto, el tiempo de exposición, edad, sexo (Loganathan y Masunaga 2015; Stohs et al. 2014) y a su vez, es inversamente proporcional al número de sustituyentes clorados que presenten.

Debido a su alta liposolubilidad son distribuidos en tejido adiposo una vez que son absorbidos.

Son compuestos persistentes, es por ello que aun después de más 30 años de ser suspendida su producción aún se encuentran presentes en todo el mundo, incluso en regiones inhabitadas por el humano como el Ártico y Antártico (Corsolini et al. 2002).

Debido a su liposubilidad suelen bioacumularse y se bioamplificarse. Diversos estudios han demostrado efectos negativos tanto en poblaciones humanas como en animales (Tabla 2).

Tabla 2. Toxicidad de PCBs		
Sistema o función	Toxicidad	Referencia
SNC – función cognitiva y comportamiento	Neurotóxicos	Sthos et al., 2014
Inmunológico	Inmunosupresión	Carpenter, 2015
Endócrino	Hipotiroidismo	Goldstein y Safe 1989
Glucólisis	Diabetogénicos (diabetes mellitus tipo 2)	Carpenter, 2015
Hígado	Hepatotóxicos	Loganathan et al., 2015
DNA	Carcinogénicos (linfoma no-Hodgkin)	Rothman et al., 1997

PBDEs

Los retardantes de flama bromados (BFRs) aparecieron como una alternativa económicamente más accesible, con efectos tóxicos desconocidos y subestimados, por lo que sustituyeron a los PBCs a partir de que su producción fuera prohibida. Son usados como retardantes de flama adicionados, comúnmente encontrados en diversos plásticos, como el poliestireno, en electrodomésticos, equipos de televisión, placas de circuitos de computadoras, materiales para construcción, espumas, alfombras, mobiliario de oficinas, automóviles, aviones, pinturas, entre muchos otros (McDonald 2002). Actualmente se producen alrededor de 600 mil toneladas de BFRs al año, de los cuales 1/3 corresponden a los Difenil éteres polibrominados (PBDEs), 1/3 Tetrabromobisfenol (TBBPA), y 1/3 se compone de otros compuestos bromados como Bifenilos polibromados (PBBs) y hexabromociclododecano (HBCD) (Fernández et al. 2004).

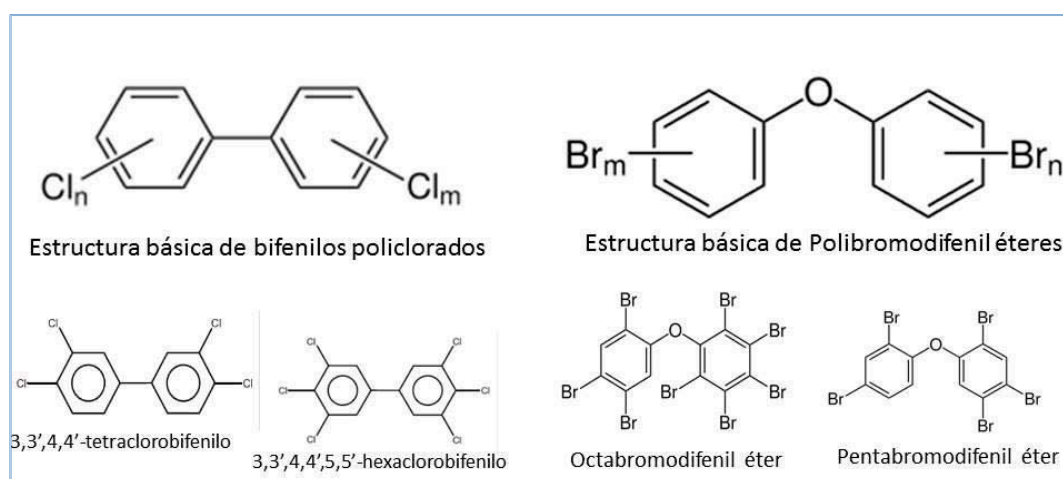


Fig. 1 Estructuras básicas de PCB y PBDE, y ejemplos.

La nomenclatura de los PBDEs se basa en la utilizada para nombrar PCBs, tienen como base una molécula compuesta por dos fenilos unidos por un enlace éter, cada anillo puede presentar desde una sustitución con bromo hasta 5, cuya posición y orientación brinda características distintivas a cada variación (también denominada “congénere”). En teoría existen hasta 209 diferentes congéneres de PBDEs. Los principales productos comerciables de PBDEs son los llamados penta-, octa-, y decabromodifenil éteres; la fabricación de estos últimos, ocupa el 80% del total de la manufactura. Usualmente los PBDEs se comercializan en mezclas complejas identificadas con el nombre del congénere dominante. Las tres mezclas más importantes son decabromodifenil éter que está constituido en un 98% por deca-BDE y 2% nona-BDE; octabromodifenil éter formado por 10% hexa-BDE, 40% hepta-BDE, 30% octa-BDE y el resto por nona- y deca-BDEs; y pentabromodifenil éter compuesto por 40% tetra-BDE, 45% penta-BDE y 6% hexa-BDE (Darnerud, 2003; McDonald, 2002).

Los PBDEs son liberados de los productos que los contienen con facilidad debido a que su unión con los polímeros no es covalente, y con esa misma facilidad, se incorporan al ambiente. Actualmente se conoce que los PBDEs con mayor número de sustituciones, como los decabromodifenil éteres, son pobremente absorbidos y rápidamente eliminados en la biota por lo que estos parecen ser los congéneres menos reactivos. Se considera que aún con las numerosas semejanzas entre PCBs y PBDEs, los últimos son más susceptibles a la degradación debido a que los enlaces carbono-bromino son energéticamente más débiles que los enlaces carbono-clorino, por tanto su persistencia en el ambiente es menor. Sin embargo, la exposición de PBDEs a la luz solar tiene como resultado su degradación a congéneres con menor número de sustituciones; los PBDEs poco sustituidos y de menor peso molecular (tri- a hexa-BDEs) son absorbidos casi por completo, su eliminación es lenta, y se ha demostrado que son altamente bioacumulables, por lo que representan mayor riesgo. Los congéneres considerados potencialmente más tóxicos son aquellos con conformaciones tetra a hexa-BDEs (Hooper y McDonald 2000).

Los deca-, octa-, y penta-DBE no fueron mutagénicos en la prueba de Ames. Mezclas de 1-BDE y 2-BDE indujeron recombinación genética en 2 líneas celulares de mamíferos, mientras que tetra-BDE produjo recombinación genética en una línea celular (Hooper y McDonald 2000).

Efectos en salud de PBDEs

Los posibles efectos que conlleva la exposición a PBDEs han sido ampliamente estudiados. En la tabla 3 se resumen las principales consecuencias de la exposición a diversas mezclas de PBDEs reportadas.

Tabla 3. Efectos en la salud de PBDEs

Sistema o función	Efecto	Referencia
Hígado	Agrandamiento (ratones)	Darnerud 2003
Riñón	Degeneración hialina (ratones)	Darnerud 2003
Metabolismo	Inducción de EROD	Meerts 1998
	Antagonistas a AhR	Zhou et al. 2001
Inmunológico	Inmunosupresión (ratones)	Fowles 1998
Endócrino	Afectan la homeostasis de la hormona tiroidea	McDonald 2002
		Hooper y McDonald 2000
Sistema Nervioso Central	Alteración en desarrollo neuroconductual.	Darnerud 2003
	Neurotóxico. (ratones)	Reistad 2002
DNA	Carcinogénicos (Linfoma no Hodgkin en tejido adiposo)	Hardell et al. 1998

AhR: Receptor de aril hidrocarburo

Debido a su estructura química los PBDEs son bioacumulables. Estudios notables dan cuenta de la presencia de PBDEs en leche materna a través de varias generaciones de mujeres suizas, con tendencia al incremento (Norén y Meironyté 2000).

Las evidencias respaldan que los compuestos con mayor número de sustituciones son menos tóxicos, p.e., el decabromodifenil éter fue clasificado por la IARC en el grupo 3, compuesto que no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para seres humanos debido a que la evidencia es limitada (Hooper y McDonald, 2000; IARC, 1990), mientras que los congéneres penta- y octa-BDE, compuestos con menor número de sustituciones, han sido identificados como potencialmente riesgosos para la salud, por ello su producción ha sido prohibida por la Unión Europea desde 2004, consecuentemente en E.U.A. las compañías cesaron su producción por decisión propia (Ji et al. 2011).

Metales/metaloideos pesados

Son elementos químicos del grupo de los metales y algunos metaloides que tienen un alto peso atómico (mayor a 40.04) (Agarwal 2009) y cuya densidad es al menos cinco veces superior a la del agua (Simeonov et al. 2010). Son ampliamente utilizados en la industria y son parte de la estructura de aparatos eléctricos y sus accesorios.

Su toxicidad depende de varios factores como la dosis y ruta de exposición, especies químicas y características del organismo expuesto. Se ha observado que son capaces de inducir toxicidad por exposiciones relativamente bajas. Algunos de los elementos englobados en este

grupo son considerados carcinógenos y probables carcinógenos por la IARC (grupos 1 y 2A) y por la EPA, debido a lo cual representan un grave riesgo para la salud pública y el ambiente (Luch 2012a).

Los principales metales pesados que representan un riesgo para la salud se enlistan a continuación con una breve reseña de los efectos atribuidos a cada uno.

Plomo (Pb)

Una vez que se libera al ambiente suele acumularse en el área y causa efectos negativos en plantas, animales y microorganismos. Es bioacumulable. Se ha estudiado profundamente y se ha identificado como tóxico para los siguientes sistemas y órganos: sistema nervioso central y periférico, sistema circulatorio, reproductivo, riñón, sistema endocrino, afecta al desarrollo cerebral. El principal efecto de la intoxicación crónica con Pb es que interfiere con la síntesis de hemoglobina (Puckett et al. 2002b; Rana 2006a). La IARC ha clasificado el plomo inorgánico como probable cancerígeno para seres humanos (ATSDR 2007).

Mercurio (Hg)

La toxicidad del mercurio es un foco de atención debido a que la habilidad del organismo para eliminar este tipo de compuestos es limitada, aunada al hecho de que los derivados de mercurio son altamente reactivos, ya que interactúan con proteínas y ácidos nucleicos, alterando su funcionamiento (Rana 2006). Se sabe que causa daño oxidante por acumulación de ROS, altera la homeostasis del calcio, además se ha descrito que afecta al sistema nervioso central y al riñón (Rana 2006). Algunos estudios han señalado su potencial genotóxico (Puckett et al. 2002b; Rana 2006b).

Cromo (Cr)

La toxicidad del cromo en seres humanos depende de la dosis de exposición y la forma química del elemento. El Cr (VI) es considerado la forma más tóxica. Sin embargo se sabe que en cualquiera de sus formas, una vez al interior de la célula puede unirse a proteínas y lípidos interrumpiendo la integridad celular y su correcto funcionamiento (Luch 2012a). Mediante estudios epidemiológicos se han detectado efectos genotóxicos y productos de peroxidación lipídica en trabajadores expuestos a Cr. Altos niveles de exposición señalan una posible asociación con cánceres respiratorios (Luch 2012a).

Cadmio (Cd)

Bajo un régimen de exposición crónica, el Cd provoca anoxia en las personas como resultado al daño a los nervios, disfunción renal y enfisema (Rana 2006a). La exposición crónica a Cd también se considera como un factor de riesgo de cáncer de pulmón y para el desarrollo de arterioesclerosis, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, sin embargo, los datos al respecto son limitados y contradictorios (Rana 2006a).

Arsénico (As)

Estudios epidemiológicos muestran una fuerte asociación entre exposición a As y efectos carcinogénicos y sistémicos, principalmente al sistema cardiovascular, periférico vascular, nervioso, hepatobiliar, renal, gastrointestinal, respiratorio, así como desórdenes neurológicos y del comportamiento, incidencia de diabetes y desórdenes hematológicos. A otra escala, se ha identificado que la exposición a As inhibe la reparación de DNA, induce genotoxicidad, tiene propiedades clastogénicas, e induce hipometilación de DNA (Luch 2012b).

En la tabla 4 se presenta una descripción de la presencia de metales en aparatos electrónicos.

Tabla 4. Metales y metaloides pesados en residuos electrónicos

Metal/Metaloides	Ubicación en residuo-e	Concentración promedio (g/kg)
Arsénico	Diodos emisores de luz	-
Bario	En panel frontal de CRTs,	-
Berilio	Conductor en tarjetas madre, switches	-
Cadmio	Resistencias en chips, CRTs, baterías	0.2
Cobre	Cableado	40
Cromo	Cintas de datos y discos flexibles	10
Estaño	Soldaduras y pantallas LCD	2.4
Hierro	Tarjetas de circuitos impresos, cubiertas plásticas	360
Mercurio	Termostatos, sensores, switches, teléfonos celulares, baterías, CRTs.	0.0007
Níquel	Baterías y CRTs	10
Oro	Tarjetas de circuitos impresos	-
Paladio	Tarjetas de circuitos impresos	-
Plata	Interruptores	-
Plomo	En paneles de vidrio, soldadura de circuitos eléctricos, pantallas	2.9
Selenio	Fotocopiadoras	-
Zinc	CRTs	5

Modificado de Mostalac, 2014, con información de Luch, 2012.

CRT: Tubos de Rayos catódicos

Los estudios en áreas de reciclaje informal en China revelan la presencia de Cd, Cr, Pb, Zn, Cu, Sb, Ni, y As en aire; en sedimentos se encontró Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn y As; mientras que en suelo hallaron Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Mn, As, Hg y Zn demostrando los riesgos a los que se ven expuestos los trabajadores de residuos-e informales (Song y Li 2015).

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)

Son compuestos formados durante la combustión incompleta de materia orgánica y se caracterizan por poseer dos o más anillos de benceno fusionados. Se dividen en dos grupos: de bajo peso molecular (LPAHs) aquellos constituidos por dos o 3 anillos; y de alto peso molecular (HPAHs) cuya estructura presenta más de 4 anillos fusionados. Los dos grupos tienen diferencias fisicoquímicas como biodisponibilidad, potencial de bioacumulación y potencial tóxico. Los PAHs están compuestos únicamente por anillos de benceno fusionados, sin

embargo es importante considerar que existen compuestos homólogos a los PAHs “padres” pero con sustituyentes, denominados homólogos alquilados. Algunos LPAHs alquilados tienen mayor peso molecular y características que los hacen más semejantes a los HPAHs. No se conoce a ciencia cierta cuántos PAHs existen, sin embargo los ecotoxicólogos se han enfocado en un grupo selecto de alrededor de 40 compuestos incluyendo alquilados, ya que se ha demostrado que ciertas sustituciones suelen incrementar el potencial de bioacumulación (Meador y Fisheries 2006).

Una vez liberados al ambiente, los PAHs se distribuyen ampliamente y se encuentran disponibles en agua, aire y suelo. En zonas en las que se realiza combustión de manera constante la concentración de estos compuestos suele ser mayor (Tamakawa 2004), p.e., en grandes ciudades con mucho tránsito, los automotores generan grandes cantidades de PAH, en plantas industriales, petroquímicas y de obtención de energía eléctrica donde se quema gran cantidad de combustibles, y aún en sitios donde se acumulan gran cantidad de fumadores, el aire se carga con una alta concentración de PAH.

En los vertebrados estos compuestos son bioactivados por las enzimas del sistema del citocromo 450 (CYP450) a través de reacciones de epoxidación, y en el caso de algunos PAH se forman metabolitos pro-cancerígenos. Se ha documentado que a dosis subagudas suelen hacer enlaces covalentes con el DNA, evento que puede ocurrir incluso a muy bajas concentraciones. Actúan como agonista del receptor AhR, se sabe que afectan la síntesis de hormonas asociadas con la reproducción y además, se ha encontrado evidencia contundente de que ciertos PAH provocan daño al DNA, lesiones hepatotóxicas y que son causa de formación de tumores (Manahan 2006; Meador y Fisheries 2006; Stine y Brown 2015).

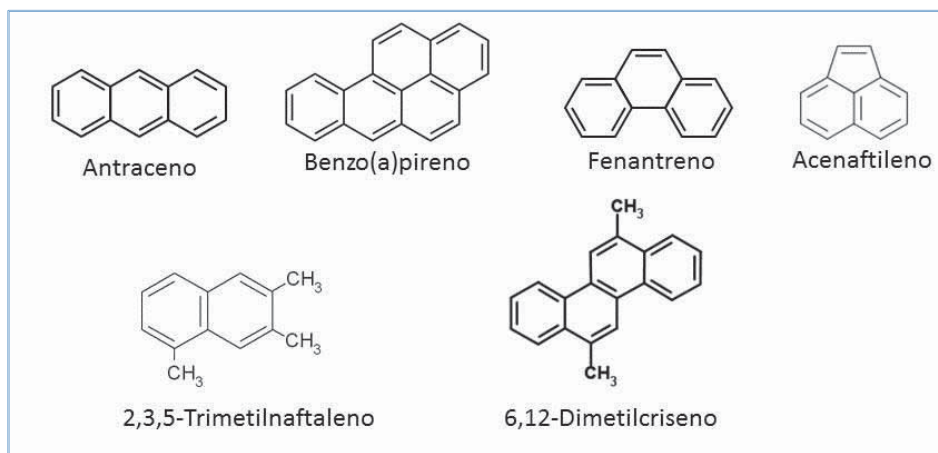


Fig. 2 Estructuras de algunos LPAH: Antraceno, Fenantreno, Acenaftileno y 2,3,5-Trimetilnaftaleno; HPAH: Benzo(a)pireno, 6,12-Dimetilcriseno.

Exposición aérea (daños a aparato respiratorio)

La ruta de exposición más probable, de acuerdo con la disponibilidad de los contaminantes revisados, es por inhalación y afectaría no sólo a quienes realizan la extracción de componentes, sino a toda la comunidad, al disiparse los contaminantes en el aire y ser

distribuidos en las corrientes, de la misma manera en que se distribuye el humo de tabaco, por lo cual fue prohibida la costumbre de fumar en sitios públicos.

Previamente el equipo dirigido por la Dra. Leticia Yañez en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) determinó niveles de Pb, Hg, Cd y As presentes en plasma y orina en los mismos miembros de la comunidad que aquí se analiza. En la tabla 5 se muestran los resultados hallados por Yañez (proporcionados por comunicación personal). Los niveles de As y Hg se encontraron por debajo de los límites de exposición sugeridos por la ATSDR, por otro lado los niveles de Pb y Cd rebasan los niveles normales en sangre y orina (respectivamente).

Tabla 5. Niveles de metales y metaloides encontrados en los niños estudiados			
Metal/Metaloide	Promedio y d.e.	Intervalo	Niveles "normales" en humanos (ATSDR o OMS)
Pb (sangre)	5 µg/dL ± 3.05	0.55 – 18.9	<5µg/dL
Cd (orina)	0.44 ppb ± 0.36	0.05 – 2.94	0.185 µg/L o ppb
Hg (orina)	1.17 ppb ± 1.85	0 – 18.2	4 µg/L o ppb
As (orina)	48.8 ppb ± 36.4	5.05 – 321.5	<100 µg/L o ppb

Ensayo de MN

Los micronúcleos (MN) son partículas (vesículas) que contienen porciones de DNA nuclear, se encuentran ubicadas en el citoplasma celular separadas del núcleo principal. Los MN son formados (figura 3) debido a la ruptura de cromatina o cromosomas, o bien a partir de un cromosoma entero que se ha retrasado durante anafase (Guy 2014).

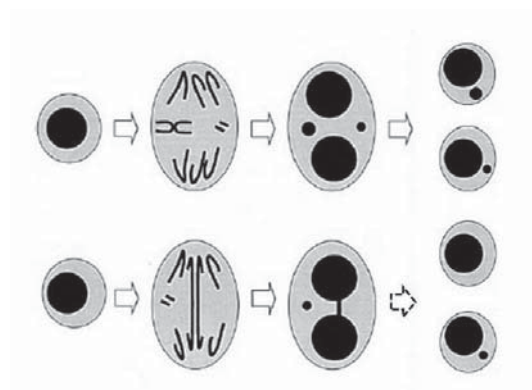


Fig. 3. Formación de micronúcleos y puentes nucleoplasmáticos. Modificada de Fenech (2000).

El ensayo de MN consiste en contabilizar su frecuencia en un número determinado de células permitiendo monitorear poblaciones expuestas a agentes genotóxicos. Este ensayo ha sido estandarizado en una variedad de tipos celulares tanto para estudio de poblaciones humanas como en modelos animales. Actualmente el ensayo de MN, se ha convertido en una prueba estándar en la toxicología genética (Fenech 2006).

La presencia de MN y otras anomalías nucleares han mostrado asociación con defectos genéticos en el mantenimiento del genoma, envejecimiento acelerado, riesgo de varios tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Bonassi et al. 2009).

Particularmente el ensayo en mucosa oral presenta una opción poco invasiva, accesible y que no causa estrés en los sujetos de estudio, se ha usado antes para estudiar el impacto de la nutrición, factores de estilo de vida, exposición genotóxica y genotipo de daño de DNA, así como muerte celular (Thomas et al. 2009).

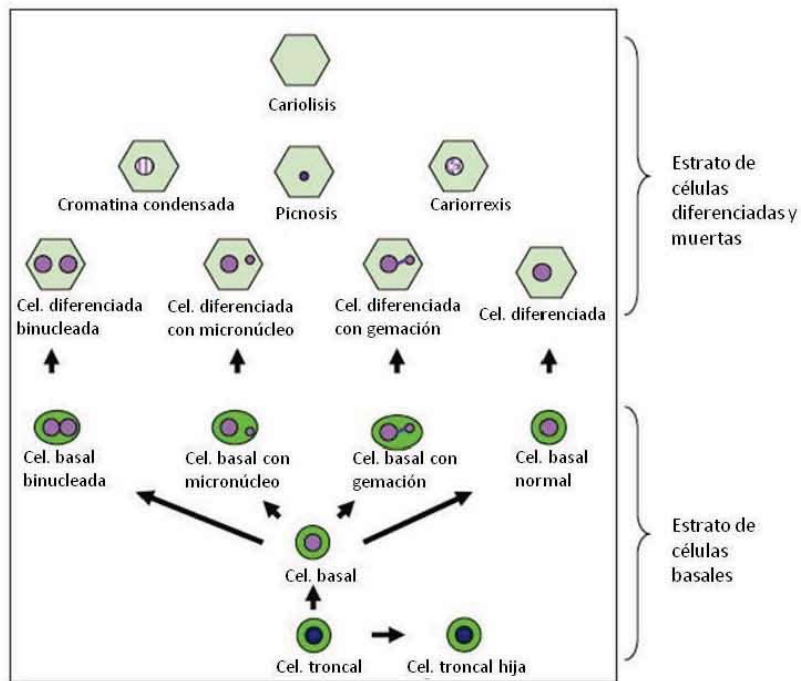


Fig. 4. Células basales y diferenciadas normales, con daño genético y con muerte celular observables en el ensayo de MN en mucosa oral. Modificada de Thomas et al. (2009).

Predisposición a daño genético – polimorfismos de susceptibilidad

A partir de los estudios de secuenciación del DNA humano se identificó que existen variaciones de individuo a individuo con diferencias mínimas, pero muy frecuentes. El DNA humano se compone de 3 mil millones de pares de bases con una frecuencia de variación entre individuos de 1 en cada 1000 pares de bases. Las variaciones en la secuencia de DNA que se encuentran presentes en más del 1% de la población se denominan polimorfismos (Vogel 2011).

Los polimorfismos genéticos se diferencian entre aquellos cuyo único cambio es en un sólo nucleótido (SNP) y aquellos en los que ocurren deleciones e inserciones de secuencias de DNA. Se denomina polimorfismos funcionales a aquellos que tienen un efecto ya sea positivo o negativo en las proteínas que codifican. Los polimorfismos funcionales pueden encontrarse en el promotor del gen, el cuerpo del gen ocasionando incorporaciones de aminoácidos diferentes, o bien modificar la estabilidad del mRNA o su corte y edición (splicing) (Vogel 2011).

En las últimas décadas el efecto de los polimorfismos ha sido fuertemente explorado y asociado con enfermedades inmunes, cardiovasculares, neurológicas y susceptibilidad a desarrollar cáncer (Miller y Cronin 2000).

Estudios epidemiológicos han asociado el 80% de los cánceres a factores ambientales. La susceptibilidad a desarrollar cánceres ambientales puede ser el resultado de la diversidad genética que se refleja mediante diferencias en la batería de genes que dan lugar a enzimas de metabolismo y de reparación de DNA, así como expresión alterada de proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Los polimorfismos relevantes en relación a cánceres ambientales se encuentran dentro una de las dos categorías siguientes: (1) aquellos que de alguna manera modifican la exposición, por ejemplo los polimorfismos que cambian el metabolismo de xenobióticos alterando las concentraciones internas de metabolito; (2) polimorfismos que tienen un efecto carcinogénico (Vogel 2011). La penetrancia de dichos genes es un factor determinante en el riesgo que representa para el individuo, el portar una de estas modificaciones.

El estudio de los polimorfismos permite identificar subpoblaciones susceptibles a enfermedades y la identificación de un agente etiológico al conocer la enzima implicada en su metabolismo de tal manera que es posible estimar el riesgo para esas subpoblaciones y establecer límites seguros de exposición (Suárez 2008; Vineis et al. 1999).

CYP1A1

Pertenece a la súper familia de enzimas endoplasmáticas y citosólicas citocromo P450 (CYP450) identificado como el principal sistema de enzimas que catalizan reacciones de oxidación en la de fase I del metabolismo de xenobióticos. En humanos cuenta con aproximadamente 57 miembros caracterizados con especificidades de sustrato que las diferencian entre sí, pero con características estructurales que se traslapan, por lo que se les ha agrupado en familias y subfamilias (Redlich et al. 2008; Vineis et al. 1999).

CYP1A1 ha sido clasificada dentro de la familia 1, subfamilia A, miembro 1. Ha sido identificada como la principal encargada de metabolizar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), tales como el benzo(a)pireno y otros compuestos aromáticos que también son considerados como posibles carcinógenos como el naftaleno y el criseno que están clasificados en el grupo 2B de la IARC (2012) (Hussein et al. 2014).

El gen *CYP1A1* en seres humanos está localizado en el cromosoma 15q22-q24. Su expresión ha sido detectada principalmente en pulmón y en hígado, aunque también ha sido encontrada en tracto gastrointestinal, cerebro, linfocitos y macrófagos (Hussein et al. 2014).

La expresión de la enzima es regulada por el receptor AhR y por su translocador nuclear, el ARNT (translocador nuclear del receptor de Aril hidrocarburo). Una vez que se da la unión de AhR con el ligando, es activado y translocado al interior del núcleo por el ARNT donde este complejo se une al elemento de respuesta de gen *CYP1A1* (Vineis et al. 1999). También se ha demostrado la inducción de la expresión de la enzima en presencia de dioxinas (Grimm et al., 2015; Seremak-Mrozikiewicz et al., 2005).

Se han descrito 4 polimorfismos del gen CYP1A1, entre ellas la denominada m2 que corresponde a una transición de adenina a guanina en la posición 4889 en el exón 7; éste se traduce en una sustitución de valina por isoleucina en la región de unión con el grupo hemo durante la síntesis, dando como resultado el incremento en la actividad catalítica de la enzima y un alto grado de inducibilidad comparado con el tipo nativo (Hussein et al. 2014; Seremak-Mrozikiewicz et al. 2005).

La mutación m2 (Ile/Val) ha sido ampliamente estudiada debido a su alta frecuencia genotípica y, aún más importante, debido a su posible asociación con el desarrollo del cáncer de pulmón. Diversos estudios han mostrado relación entre el polimorfismo CYP1A1 m2 y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en poblaciones chilenas y egipcias (Hussein et al. 2014; Quiñones et al. 2001).

Superfamilia Glutación S-transferasas (GST)

Es una superfamilia de enzimas citosólicas, mitocondriales y microsomales de fase II que brinda protección contra sustancias químicas provenientes de la comida o del ambiente. Las GST actúan como defensa antioxidante y contrarrestan la presencia de electrófilos reactivos que suelen formarse durante las reacciones de fase I en el metabolismo de xenobióticos y que son potencialmente riesgosos al poder unirse con nucleófilos celulares tales como los ácidos nucleicos y las proteínas. Las enzimas GST catalizan la unión del tripéptido glutación con compuestos potencialmente genotóxicos entre los que destacan hidrocarburos alifáticos, policíclicos y aromáticos, epóxidos y demás sustratos electrofílicos insolubles, modificándolos a formas más hidrosolubles (Giri et al. 2011a; Vineis et al. 1999).

Han sido descritos 6 clases de GST para seres humanos: Alpha, Mu, Pi, Theta, Zeta y Omega. Las clases Mu y Theta han sido estudiadas con mayor profundidad y se ha encontrado que sus polimorfismos nulos confieren mayor susceptibilidad a efectos tóxicos por la exposición a contaminantes como los que son objeto de este estudio (Angelini et al. 2008; Baxter, Thomas, y Campbell 2001; Singh et al. 2012)

El gen *GSTT1* se localiza en el cromosoma 22q11.2 y codifica para la enzima glutación-S-transferasa-theta. Se han identificado dos fenotipos funcionales: el nulo o GSTT1-0, cuando el individuo es homocigo para una delección que causa la pérdida de la función enzimática, y el nativo, o GSTT1-1, cuando uno o dos de los alelos funcionales se encuentra presente (Coughlin and Hall 2002).

El gen *GSTM1* se localiza en el cromosoma 1p13.3 y codifica para la enzima Glutación-S-transferasa-mu. Es un gen polimórfico debido a la delección en una región del gen y del cual se han identificado 3 alelos: GSTM1-0, GSTM1a y GSTM1b. A diferencia del resto, el primer alelo presenta una delección que se manifiesta como pérdida de la función enzimática, por lo que se le denomina polimorfismo nulo. Entre los otros dos polimorfismos sólo hay diferencia de 1 pdb sin presentar cambios funcionales entre ellos, por lo que frecuentemente se asocian con el alelo nativo (Coughlin and Hall 2002).

GSTM1 y *GSTT1* son conocidos genes polimórficos por la presencia de una delección de DNA con la subsecuente pérdida de síntesis de proteína en individuos homocigos; los heterocigos

suelen presentar una reducción en la actividad de la enzima, por lo que los dos tipos de portadores pueden no ser capaces de eliminar agentes electrofílicos de manera tan eficiente como el homócigo nativo que tiene una completa función enzimática. El riesgo de mutaciones somáticas aumenta en individuos portadores de la mutación, mayormente en individuos homócigos mutantes.

GSTM1-nulo ha sido asociado con diversas enfermedades tales como bronquitis crónica, arterioesclerosis, Parkinson y varios tipos de cáncer tales como pulmón, vejiga, adenocarcinoma, colorrectal, de mama, de ovario. Mientras que GSTT1-nulo se ha asociado con cáncer de cerebro y colorrectal (Deakin et al. 1996; Singh et al. 2011; Wahner et al. 2007)

Se han realizado numerosos estudios con el fin de despejar la relevancia de los polimorfismos de GSTT1 y GSTM1 en torno a diferentes enfermedades asociadas con la estabilidad del DNA, de entre los que destaca el trabajo de Norppa quien reportó un incremento en la susceptibilidad a eventos de genotoxicidad asociada con el consumo de tabaco en individuos con GSTM1 nulo y GSTT1 nulo; el mismo efecto se ha detectado en trabajadores expuestos a pesticidas organofosforados (Singh et al. 2012). Sin embargo se han descrito resultados contradictorios en trabajadores del alquitrán de hulla y estudios caso-control de cáncer de pulmón (Giri et al. 2011b; Norppa 1997; Rojas et al. 2000; Tamaki et al. 2011).

Planteamiento del estudio

El manejo de residuos electrónicos es un problema importante debido a que la población en general desconoce la normatividad al respecto, así como los efectos negativos de ciertos componentes en los desechos. De manera que la mayor parte de la población se deshace de sus aparatos simplemente arrojándolos a la basura o entregándolos a pepenadores a cambio pequeñas cantidades de dinero.

Consecuentemente desmantelar aparatos electrónicos se ha convertido en una actividad económica para muchas personas, principalmente aquellas que se encuentran en situación económica vulnerable a lo largo y ancho del país.

La población analizada en este estudio se ubica en una zona rural al centro del país. Parte importante de los miembros de la comunidad se dedica a la colecta y desmantelado de aparatos electrónicos de manera ilícita desde que la pesca no pudo continuar siendo la principal actividad económica debido a la fuerte contaminación de la presa cercana.

La exposición a contaminantes provenientes de residuos e se incrementa debido a la falta de medidas de seguridad en su manejo. Usualmente el desmantelado de electrónicos no se realiza en algún taller sino en la misma casa de los recolectores, incluso se ha observado que, a fin de separar materiales valiosos de las carcasas y demás coberturas plásticas, las personas suelen quemar partes y accesorios de los aparatos en hornos improvisados colocados en el exterior de sus viviendas, exponiendo así a toda su familia y vecinos.

Es importante destacar que esta actividad se realiza en todo el territorio mexicano en condiciones similares por lo que resulta necesario conocer el riesgo al que este sector de la población se ve expuesto, así como identificar efectos en la salud asociados a dicha exposición y concientizar a todos los involucrados sobre ellos.

El presente estudio pretende distinguir a posibles miembros vulnerables, portadores de polimorfismos de enzimas de metabolismo de xenobióticos con mutaciones que disminuyen su actividad, y determinar en ellos la presencia o ausencia de efectos genotóxicos.

Hipótesis

Si los individuos son portadores de los polimorfismos menos eficientes de las enzimas GSTT1, GSTM1 y CYP1A1, que participan en el metabolismo de xenobioticos, ya sea individualmente o en combinación, entonces presentarían frecuencias elevadas de eventos de genotoxicidad (MN, gemaciones, puentes nucleoplasmáticos) en comparación con aquellos que cuentan con los polimorfismos nativos.

Objetivo general

Determinar si hay diferencias de daño genotóxico entre individuos con diferente nivel de susceptibilidad genética expuestos a contaminantes provenientes de residuos electrónicos.

Objetivos particulares

- Determinar las frecuencias polimórficas de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1 en una población de niños expuestos a contaminantes ambientales provenientes de residuos electrónicos.
- Detectar los niveles de daño genotóxico mediante el ensayo de MN en mucosa oral en una población de niños expuesta a contaminantes provenientes de residuos electrónicos.
- Asociar las frecuencias de daño genético con los polimorfismos de las enzimas GSTT1, GSTM1 y CYP1A1 estudiados.

Material y método

Población

La población está compuesta por 178 niños, 83 son niñas y 95 niños, que van de los 6 a los 13 años al momento del muestreo y que pertenecen a la misma comunidad en una zona rural en la región central del país, dicha comunidad tiene el manejo de residuos-e como una importante actividad económica desde la década de los 80s y la realizan en sus hogares, o cerca de ellos, sin ningún tipo de protección, tecnología adecuada, ni conocimiento del riesgo al que se exponen. Como parte de un proyecto más amplio para alertar a las personas sobre estos riesgos, así como para hacer estudios de exposición y efectos cognitivos, se realizó el presente estudio de genotoxicidad y susceptibilidad genética.

Aplicación de encuestas

Durante las visitas se realizó una encuesta a cada niño o, de estar presente, al padre, sobre su alimentación, enfermedades recientes, medicación y tiempo de residencia en el área, con el fin de contar con un control de factores confusores que pudieran influir en las frecuencias de micronúcleos encontradas.

La plantilla utilizada para la toma de información se encuentra en el Anexo al final de esta tesis.

Colecta y almacenamiento de muestras

Las visitas a las localidades se realizaron los días 17,19 y 20 de Junio del año 2013.

Antes de tomar la muestra se le pidió al niño que enjuagara su boca con agua, después se utilizaron cepillos citológicos con los que se frotó el interior de cada una de las mejillas vigorosamente y con movimientos circulares, procurando no lastimar la boca del niño. El contenido del cepillo se resuspendió en 10 mL de amortiguador para células bucales (EDTA, Tris-HCl, NaCl). Se almacenaron separadamente las muestras correspondientes a cada carrillo.

Una vez en el laboratorio el amortiguador de células bucales fue reemplazado por 10 mL de fijador de etanol-ácido acético glacial 3:1 y almacenados a 4°C.

Preparación de laminillas

Para el ensayo de micronúcleos en mucosa oral es necesario preparar laminillas con las células antes colectadas y distribuir las en un portaobjetos para su evaluación con un microscopio óptico con un aumento de 1000 veces. La técnica que se empleó fue la preparación por goteo. Para ello se centrifugan los tubos de polipropileno de 5 mL que contiene la muestra fijada hasta formar un botón, entonces se descarta el fijador, evitando así la presencia de basura y bacterias en la laminilla, a continuación el botón se homogeniza en un volumen pequeño de fijador fresco con una pipeta Pasteur, se toman dos gotas y se depositan sobre un portaobjetos. Las laminillas se dejan secar por 10 minutos a temperatura ambiente para después fijarlas sumergiéndolas en metanol absoluto por 10 minutos. Por último se secan a temperatura ambiente y se almacenan en un estuche aislado de la humedad a 4°C hasta su tinción.

Tinción

Para visualizar el núcleo y diferenciarlo del citoplasma y organelos celulares se empleó la tinción de Feulgen, que consiste en tratar las células fijadas a cada laminilla con HCl 5M durante 30 min que causa una hidrólisis ácida que separa los grupos púricos del DNA, y abre a su vez los anillos de desoxirribosa, lo que genera aldehídos en el núcleo. Después de un enjuague, las células se sumergen en reactivo de Schiff (Merck) que tiñe de rosa los grupos aldehídos generados en el paso anterior en el DNA. Como resultado se obtienen los núcleos teñidos mientras que el resto de la célula permanece incolora. Para poder distinguir el citoplasma de la célula se utilizó el colorante Light green (Sigma) para contrateñir los citoplasmas de color verde.

Al finalizar la tinción del núcleo y la contratinción de los citoplasmas, las laminillas se dejan secar a temperatura ambiente durante una noche, a la mañana siguiente son montadas colocando encima una gota de medio de montaje Entellan (Merck) y un cubreobjetos y se dejan secar hasta el día siguiente antes de iniciar la revisión al microscopio.

Evaluación de MN

La evaluación se realiza al observar cada laminilla al microscopio óptico, de acuerdo con los criterios establecidos y publicados por grupos internacionales de estudio (Thomas et al., 2009), en particular el HUMNxl (www.humn.org). Consiste en el conteo de 500 células distinguiendo a qué tipo celular corresponde cada una: *basal o diferenciada*, y en qué estado de decaimiento se encuentra: *cariorrexis o cromatina condensada*, *cariolisis*, *picnosis*. Posteriormente, se cuentan 1000 células diferenciadas en las que se determina la presencia o ausencia de indicadores de daño genotóxico: *micronúcleos*, *gemaciones nucleares*, *puentes nucleoplásmicos*, *células binucleadas (o multinucleadas)*. En el Anexo se muestra una hoja de evaluación de estos biomarcadores.

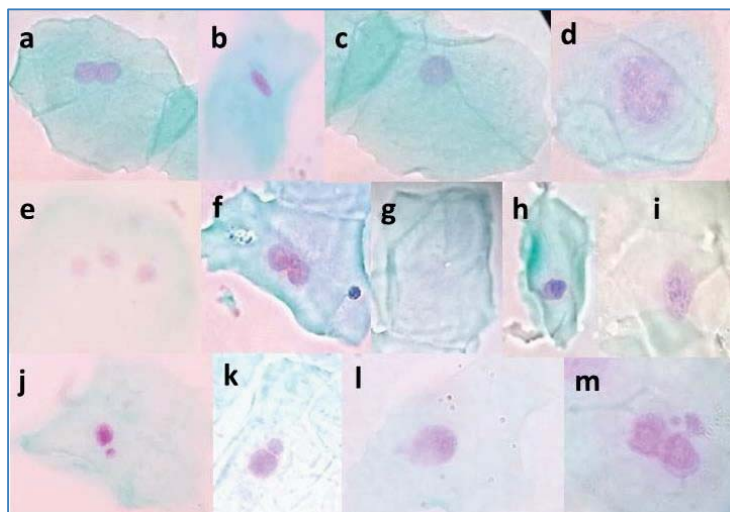


Fig. 5 Tipos celulares en el ensayo de MN en mucosa oral. (a) Cel. Binucleada, (b) cromatina condensada, (c) cel. Diferenciada, (d) cel. Basal, (e) cel. Trinucleada/multinucleada, (f) cel. binucleada con puente, (g) cariolisis, (h) picnosis, (i) cariorrexis, (j, k) cel. con micronúcleo, (l) cel. con gemación, (m) daño múltiple.

Determinación de polimorfismos

Extracción de DNA.

Se realizó mediante el “kit DNeasy Blood and Tissue” de QIAGEN, a partir de muestras de sangre entera que se les tomaron a los niños para otras determinaciones. Se siguieron las instrucciones del fabricante. El método consiste hacer pasar 200µL de sangre entera disuelta con proteínasa k y amortiguador de lisis a través de columnas con membranas de sílice, rompiendo las células y separando de manera diferenciada restos de proteínas, carbohidratos y lípidos a través de diversos enjuagues con los amortiguadores provistos, permitiendo conservar el DNA unido a la membrana, gracias a la propiedad de los ácidos nucleicos para unirse a las partículas de sílice de las que son eluidas con 100 µL de agua estéril y libre de DNAsas. El DNA aislado se cuantifica en Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop™ 1000 Spectrophotometer) y se almacena a -20°C hasta su posterior uso.

CYP1A1

La determinación de los polimorfismos se realizó mediante PCR según el método reportado por Araujo Soto (2004), cuyas condiciones se detallan a continuación.

El segmento utilizado para la determinación de polimorfismo de CYP1A1*2C es una secuencia de 760 pb que se amplifica mediante dos oligonucleótidos: OJA10 (forward) 5'-TCA GAG GCC TAA GGA CCT CCT AAC C-3' y C53 (reverse) 5'-GAA AGG CTG GGT CCA CCC TCT -3'.

La reacción PCR se procesó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), el tubo de reacción contiene 5 µL de DNA [aprox. 40 ng/µL] aislado, 3 mM MgCl₂, 0.6 U de Taq polimerasa, 0.2 µM de cada oligo, 0.120 mM de dNTPs y agua estéril en un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación consiste en un primer paso de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación 60°C por 60 seg, y extensión a 72°C por 45 seg, y un paso final de extensión a 72°C por 3 min.

El producto final se visualiza mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% que es teñido con Midori Green y se observa en un transiluminador (Transiluminator 2000, BIORAD) La imagen se captura mediante el programa Kodak Gel Logic Imaging System.

Digestión con la enzima de restricción BsrDI

La distinción de los polimorfismos se realiza mediante la digestión de 7.5 µL del producto con 2.5 U de la enzima de restricción BsrDI (New England BioLabs), buffer R 1x en un volumen final de 15 µL durante 3 horas.

Para visualizar los polimorfismos se realiza una electroforesis al producto de la digestión en un gel de agarosa al 3%, se tiñe con Midori green y se captura la imagen de la misma forma ya descrita.

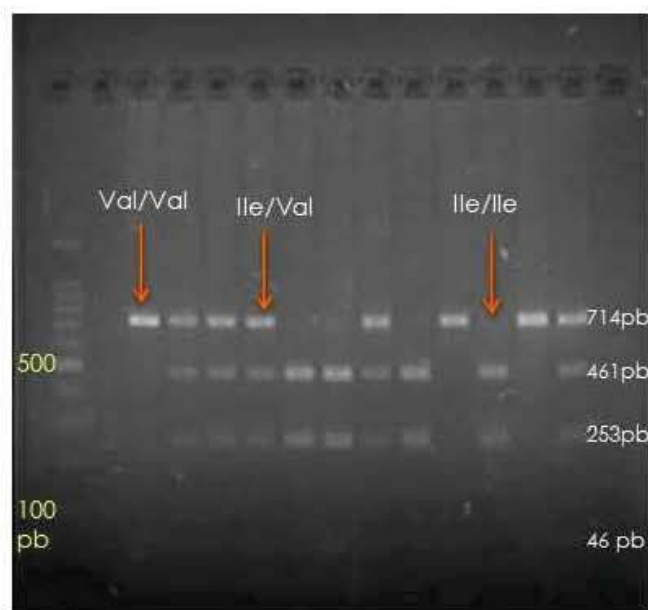


Fig. 6. Patrón de bandas obtenidas al digerir con BsrDI.

GSTT1 y GSTM1

La determinación de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1 se realiza mediante una PCR múltiple con oligonucleótidos para amplificar una secuencia de 480 pb correspondiente a GSTT1: forward 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC -3' y reverse 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3'; y los oligos para amplificar una secuencia de 273 pb pertenecientes a GSTM1: forward 5'-CTG CCC TAC TTG TTG ATT GAT GGG -3' y reverse 5'-CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC -3'.

La reacción se procesó en un termociclador Mastercycler Gradient de la marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania) con el siguiente programa: primer paso de desnaturalización a 94°C por 2.5 min, seguidos por 30 ciclos con 94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72° por 1 min, con un tiempo final de extensión de 9 min a 72°C.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contienen 5 µL de DNA aislado, 1 U de Taq polimerasa, 1 mM MgCl₂, 10 mM de cada oligo, 0.120 mM de dNTPs y agua estéril.

Se realizó electroforesis a 10 µL del producto de la reacción en un gel de agarosa al 2%, se tiñó con Midori Green y se capturó la imagen como ya se describió.

Debido a que los polimorfismos consisten en la pérdida del fragmento que se amplifica, y a que se conoce que la frecuencia de GSTT1 es relativamente baja en población mexicana (Montero et al. 2007, Pérez et al., 2011), se usa como testigo la amplificación de GSTT1 y en cada sesión de PCR se incluyó una muestra de un individuo que se sabe porta los dos genes nativos.

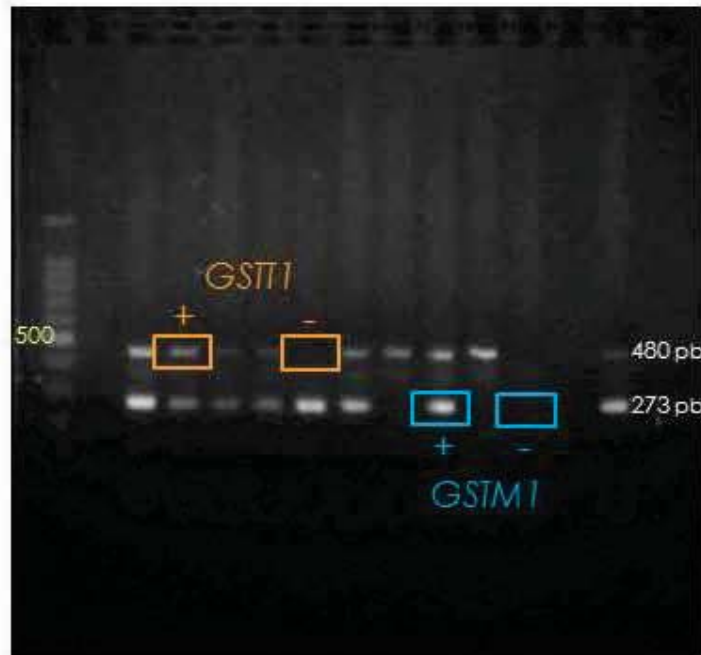


Fig. 7. Patrón de bandas obtenidas en la PCR. Las bandas de 480pb corresponden al gen *GSTT1*, mientras que las de 273pb al gen *GSTM1*. En recuadros se muestran ejemplos de polimorfismos nulo (-) y funcional (+).

Metales y metaloides pesados

Previo a este trabajo el equipo de la Dra. Leticia Yañez E. en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) determinó los niveles en plasma y orina de plomo, cadmio, mercurio y arsénico en los mismos miembros de la población que analiza este estudio. Amablemente sus resultados fueron compartidos a fin de determinar si existe asociación de los niveles de metales/metaloides pesados con las frecuencias de daño genotóxico y /o los polimorfismos aquí analizados.

Resultados

Población de estudio

Estudiamos 178 niños de tres escuelas del municipio. En la tabla 6 se muestran el número de individuos que estudiamos por nivel de primaria.

Grado escolar	Edades (años)	N	Niños	Niñas
1°	6 y 7	30	18	12
2°	7 y 8	27	15	12
3°	8 y 9	32	18	14
4°	9 y 10	27	12	15
5°	10 y 11	37	20	17
6°	11 y 12	25	11	14

El índice de masa corporal da una idea del desarrollo de los niños y debe aumentar conforme los niños crecen. La figura 6 muestra el índice de masa corporal (IMC) correspondiente a cada nivel escolar, aunque se aprecian numerosos valores fuera de rango, por lo común, con valores significativamente mayores de lo esperado. El IMC correlaciona significativamente con la edad, $p=0.0017$.

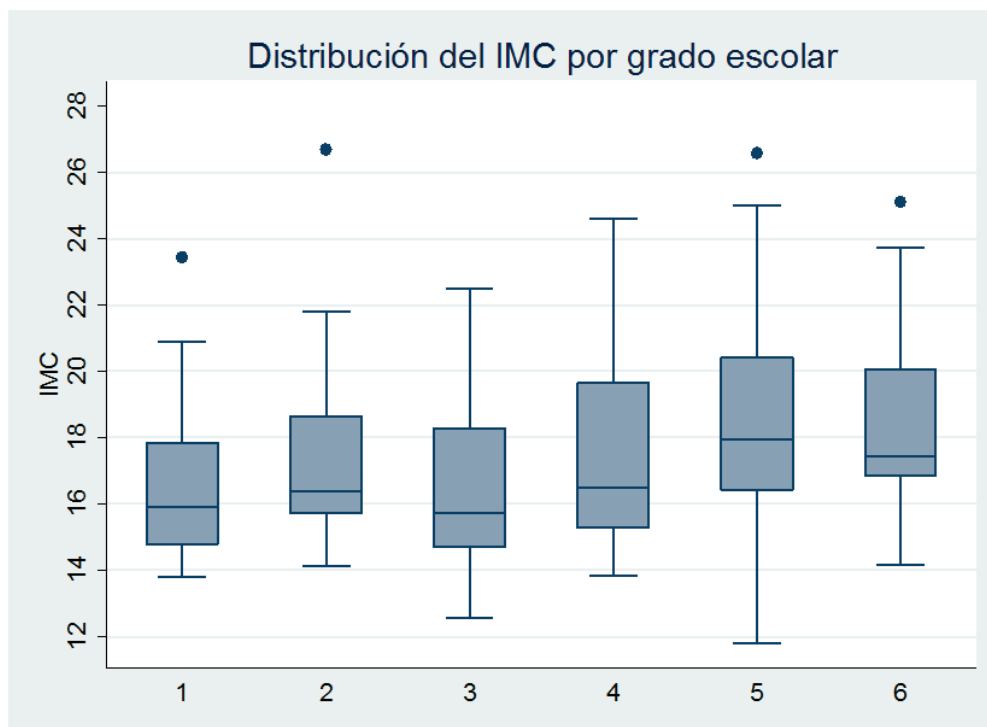


Fig. 8. Índice de masa corporal por grado escolar. Cada punto fuera de rango representan a un solo individuo.

Sistema de micronúcleos en mucosa oral

Las frecuencias de tipos celulares en el total de los casos: diferenciadas (sanas) y muertes celulares (figura 9), así como los eventos de daño genético (figura 10) se muestran detalladas en la tabla 7. Se observa que el 61% de las células contabilizadas corresponden a células diferenciadas, el 5.7% a las células basales, y el resto a células en el proceso de muerte celular.

Por otro lado, los eventos de aneuploidía, principalmente el hallazgo de células binucleadas, fueron más frecuentes que los eventos de daño genético (micronúcleos y gemaciones).

Es importante hacer notar que a pesar de que estos niños están expuestos a metales, PCBs y PBDEs, además de PAHs, la mayoría de ellos no presentan altos niveles de daño genotóxico. Así, de los 178 donantes estudiados únicamente 27 presentaron micronúcleos, 82 tuvieron gemaciones nucleares, en 49 se hallaron puentes nucleoplasmáticos y 123 individuos tuvieron una o más células binucleadas; de esta forma, el valor más frecuente de estos parámetros fue cero, y la mediana también tuvo un valor de cero, excepto en células binucleadas (ver figura 8).

Debido a que de los 178 niños analizados únicamente 104 presentaron algún tipo de daño genotóxico, las frecuencias de MN, gemaciones y puentes nucleoplasmáticos fueron sumados por individuo obteniendo la frecuencia de genotoxicidad total y cuyo valor más bajo es de 0.5 en tanto que el más alto es de 7.5. De los 104 niños con genotoxicidad, el 87% (91 individuos) presenta eventos de daño con frecuencia de 0.5 a 2, el 8.65% (9 niños) tienen frecuencia de daño de 2.1 a 4, 2.88% (3 individuos) cuentan con frecuencias que van de 4.1 a 6, por último una sola persona (el 0.96%) tiene una frecuencia de daño mayor a 6.1 (7.5).

Tabla 7. Frecuencias de daño citotóxico y genotóxico (eventos/1000 células)					
Daño citotóxico					
	Media	Desv. Est.	Min	Max	Mediana
Basales	57.71	59.57	2.99	221.78	28.31
Basal con cariorrexis	0.48	1.73	0	13.42	0
Diferenciadas (normales)	613.88	97.18	340.23	825.17	617.26
Cromatina condensada	46.472	64.27	0	259.74	10.93
Picnosis	22.94	24.05	0	122.30	12.95
Cariorrexis	70.42	61.99	5.93	388.45	49.86
Cariolisis	183.28	135.55	5.99	568.04	174.64
Daño genotóxico					
	Media	Desv est.	Min	Max	Mediana
Micronúcleos	0.19	0.54	0	3.94	0
Gemaciones nucleares	0.89	1.54	0	10.80	0
Daño combinado	0.13	0.63	0	3.85	0
Binucleadas con puente	0.22	0.41	0	2.0	0
Binucleadas	3.08	3.99	0	26.94	0.99
Multrinucleadas	0.42	0.79	0	3.93	0

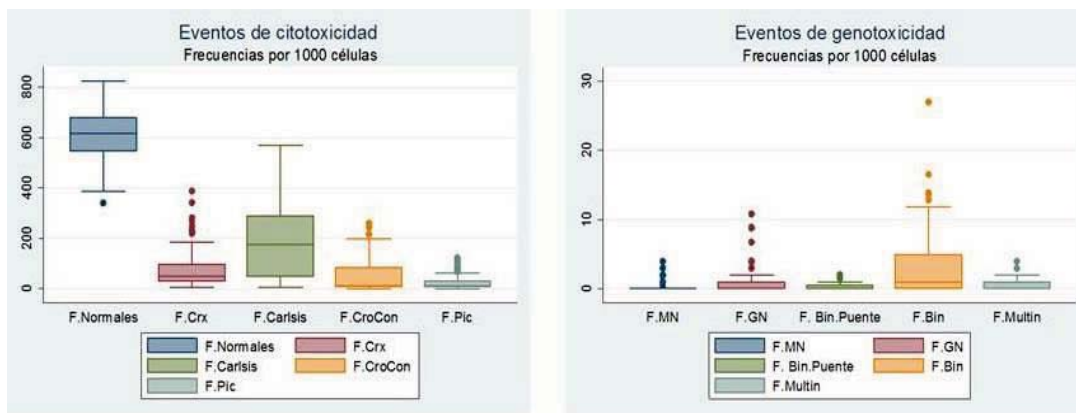


Fig. 9. Eventos de citotoxicidad, y Fig. 10. Eventos de genotoxicidad. En ambas la frecuencia de efectos se muestra por 1000 células, donde F. Normales: Células completamente diferenciadas; F. Crx: Células con cariorrexis; F. Carlsis: Células con cariólisis; F. CroCon: células con cromatina condensada; F. Pic: Células con picnosis; F. MN: Frecuencias de micronucleos; F. GN: Frec. de gemaciones nucleares; F. Bin. Puente: Frec. de Células binucleadas con puente; F. Bin: Frec. de células binucleadas; F. Multin: Frec. de células multinucleadas.

Frecuencias alélicas y genóticas para los polimorfismos de CYP1A1

Mediante el cálculo de las frecuencias genóticas para los polimorfismos de CYP1A1 y frecuencias alélicas de Ile y Val de los 178 genotipos analizados, como se muestra en la tabla 8, el 51.1% son heterocigotos (Ile/Val), 29.7% son homocigotos mutantes (Val/Val), y 19.1% son homocigotos nativos (Ile/Ile). Las frecuencias alélicas se calcularon a través de las frecuencias genóticas obteniendo los siguientes valores: Ile=45, Val=55.

Tabla 8. Frecuencias del polimorfismo CYP1A1		
CYP1A1	Número	Frecuencia genotípica (%)
Ile/Ile	34	19.1
Ile/Val	91	51.1
Val/Val	53	29.7
Total	178	100
Frecuencia alélica Ile		45
Frecuencia alélica Val		55

Frecuencias genotípicas de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1

De los 178 genotipos analizados para el polimorfismo GSTT1 el 85.39% corresponde al genotipo presente (funcional), mientras que el 14.61% corresponde al genotipo nulo (tabla 9).

GSTT1	Número	Frecuencia genotípica (%)
Nulo	26	14.61
Presente	152	85.39
Total	178	100

Tras la determinación de genotipos de GSTM1 (tabla 10) se encontró que el 56.74% de los genotipos corresponde al genotipo Presente (funcional), mientras que el 43.26% corresponde al genotipo nulo.

GSTM1	Número	Frecuencia genotípica (%)
Nulo	77	43.26
Presente	101	56.74
Total	178	100

Frecuencias genotípicas en combinaciones de polimorfismos

Se calcularon las frecuencias genotípicas de la combinación de los polimorfismos CYP1A1 y GSTM1, encontrando las frecuencias más altas (26.97%) en los genotipos heterocigotos para CYP1A1 y con el genotipo presente de GSTM1 (Ile/Val-1 en la tabla 11), mientras que el genotipo menos frecuente fue la combinación de homocigoto nativo para CYP1A1 y GSTM1 nulo (Ile/Ile-0 en la tabla 11).

CYP1A1-GSTM1	Número	Frecuencia genotípica (%)
Ile/Val-1	48	26.97
Ile/Val-0	43	24.16
Val/Val-1	31	17.42
Ile/Ile-1	22	12.36
Val/Val-0	22	12.36
Ile/Ile-0	12	6.74
Total	178	100

De la misma manera se obtuvieron las frecuencias de los genotipos en la combinación de los polimorfismos CYP1A1 Y GSTT1. La frecuencia genotípica más alta corresponde al genotipo heterocigoto de CYP1A1 y al genotipo funcional de GSTT1 (Ile/Val-1 en la tabla 12), mientras que el de menor frecuencia fue el genotipo homocigoto nativo de CYP1A1 y al genotipo nulo de GSTT1 (Ile/Ile-0 en la tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias de los polimorfismos CYP1A1 y GSTT1

CYP1A1-GSTT1	Número	Frecuencia genotípica (%)
Ile/Val-1	75	42.13
Val/Val-1	46	25.84
Ile/Ile-1	31	17.42
Ile/Val-0	16	8.99
Val/Val-0	7	3.93
Ile/Ile-0	3	1.69
Total	178	100

Así mismo las frecuencias genotípicas de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1 combinados son más altas para el genotipo presente de ambos genes, mientras que la frecuencia más baja es presentada por los individuos con genotipo nulo para ambos genes. Sin embargo, 46.07% tendrían una susceptibilidad intermedia dada por la falta de una de las dos enzimas (1-0, 0-1 en la tabla 13).

Tabla 13. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos combinados GSTT1 y GSTM1

GSTT1-GSTM1	Número	Frecuencia genotípica
1-1	85	47.75
1-0	66	37.08
0-1	16	8.99
0-0	11	6.18
Total	178	100

Daño genotóxico y citotóxico en relación con los polimorfismos metabólicos

Como se dijo anteriormente, la mayoría de los niños mostraron muy baja frecuencia de daño genotóxico (75%) en la forma de micronúcleos o gemaciones nucleares, que suelen ser los biomarcadores de genotoxicidad más frecuentes en este sistema.

Se realizó un análisis utilizando un modelo lineal generalizado con transformación de Poisson que mostró asociaciones significativas entre la frecuencia total de eventos genotóxicos (MN, gemaciones y puentes nucleoplasmáticos) y los polimorfismos de GSTM1 (Tabla 14).

Tabla 14. Asociaciones de genotoxicidad total a polimorfismos

	Coef.	Error Estandar	z	P> z	(95% Intervalo de confianza)	
CYP1A1	0.005	0.14	0.04	0.970	-0.281	0.292
GSTM1	-0.456	0.26	-1.76	0.079	-0.966	0.053
GSTT1	-0.338	0.20	-2.23	0.026	-0.867	-0.056

La tabla 15 muestra los valores de genotoxicidad total correspondientes a los diferentes genotipos de GSTM1. Se observa que la frecuencia más alta de daño se encuentra en individuos con genotipo nulo, sin embargo la diferencia no es significativa.

Tabla 15. Efecto del genotipo GSTM1 sobre la frecuencia (%) total de genotoxicidad

Genotipo	Media	Desviación estándar	N
Nulo	0.928	1.317	77
Funcional	0.688	1.026	101

El total de daño genotóxico en individuos con genotipo nulo y genotipo funcional de GSTT1 se distribuye en la población como muestra la tabla 16.

Tabla 16. Efecto de los genotipos de GSTT1 sobre la frecuencia (%) total de genotoxicidad

Genotipo	Media	Desv. Est.	N
Nulo	0.961	1.30	26
Funcional	0.763	1.14	152

Las frecuencias de genotoxicidad total son semejantes entre los tres genotipos de CYP1A1, los valores obtenidos mediante un modelo lineal generalizado con transformación de Poisson se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Efecto de los genotipos de CYP1A1 sobre la frecuencia (%) total de genotoxicidad

Genotipo	Media	Desv. Est.	N
Ile/Ile	0.735	0.79	34
Ile/Val	0.785	1.22	91
Val/Val	0.839	1.27	53

Con el fin de apreciar con mayor claridad la aparición de los diferentes eventos de daño genotóxico asociados a los genotipos de CYP1A1, la tablas 18, 19 y 20 se presentan el número de individuos portadores de cada genotipo ordenados en intervalos de acuerdo a la frecuencia total de daño incluyendo eventos de MN, gemaciones y puentes nucleoplasmáticos. Únicamente 104 individuos presentaron algún evento de genotoxicidad y es de este subgrupo del que se obtienen los siguientes datos.

De los 91 individuos que presentaron este tipo de daño con una frecuencia menor a 2 casi la mitad (45 personas) son portadores del genotipo heterocigoto (Ile/Val), en tanto que los genotipos homocigotos cuentan con semejantes cantidades de portadores, la proporción se conserva para aquellos con frecuencia entre 2.1 y 4. El individuo con más alta frecuencia de genotoxicidad (7.5) presenta también el genotipo Ile/Val.

Tabla 18. Frecuencia de genotoxicidad total en genotipos de CYP1A1

Frec. (‰) genotoxicidad total	Número de individuos			Total
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	
0.1 – 2	21	45	25	91
2.1 – 4	1	5	3	9
4.1 – 6	0	1	2	3
6.1 – 8	0	1	0	1

De manera semejante la tabla 19 muestra la distribución de los genotipos de GSTM1 con respecto a la frecuencia de genotoxicidad total. Se aprecia que la mayor proporción de individuos con al menos un evento de este tipo de daño cuenta con el genotipo GSTM1 funcional, los pocos individuos con frecuencias entre 2.1 y 6 presentan principalmente el genotipo nulo, sin embargo el único participante con frecuencia de 6.1 a 8 presenta el genotipo funcional.

Tabla 19. Frecuencia de genotoxicidad total en genotipos de GSTM1

Frec. (‰) genotoxicidad total	Número de individuos		Total
	GSTM1 nulo	GSTM1 funcional	
0.1 – 2	35	56	91
2.1 – 4	7	2	9
4.1 – 6	3	0	3
6.1 – 8	0	1	1

La tabla 20 señala que 76 de los participantes con frecuencia de genotoxicidad total entre 0.1 y 2 son portadores el genotipo GSTT1 funcional, en el resto de los intervalos también domina el número de portadores del genotipo funcional.

Tabla 20. Frecuencia (‰) de genotoxicidad total en genotipos de GSTT1

Frec. (‰) genotoxicidad total	Número de individuos		Total
	GSTT1 nulo	GSTT1 funcional	
0.1 - 2	15	76	91
2.1 - 4	2	7	9
4.1 – 6	1	2	3
6.1 - 8	0	1	1

En este estudio, lo que resultó más prevalente fue la presencia de células binucleadas, con un valor de mediana de 1‰. Para analizar si alguno de los polimorfismos estudiados tuvo influencia en la presencia de este tipo de daño, se sumó la frecuencia de células binucleadas y la frecuencia de células multinucleadas (en conjunto denominadas poliploidía), GSTM1, GSTT1 o CYP1A1 se analizaron por separado con una prueba de Kruskal-Wallis para la población completa (178 individuos). Se encontró que el polimorfismo GSTM1 nulo muestra una mayor frecuencia de este tipo de daño que los portadores de GSTM1 funcional, $p=0.05$ (Tabla 21).

Tabla 21. Efecto del genotipo GSTM1 sobre la frecuencia (‰) de poliploidía

Genotipo GSTM1	Media	Desviación estándar	Mediana	N
Nulo	4.2	4.9	2.6	77
Presente	2.9	3.7	0.9	101

En los estudios colaborativos para estandarizar este sistema de micronúcleos en mucosa oral, se ha tratado de establecer las frecuencias normales de los parámetros usados para medir muerte celular y una pregunta que aún no se ha contestado es si estos parámetros también varían en relación con los polimorfismos de metabolismo de xenobióticos. Se analizó esta posibilidad y se encontró que el parámetro de cariorrexis se distribuyó diferencialmente entre los tres genotipos de CYP1A1 estudiados (Tabla 22), $p=0.02$, Kruskal-Wallis.

Tabla 22. Efecto del genotipo CYP1A1 sobre la frecuencia (‰) de cariorrexis

Genotipo CYP1A1	Media	Desviación estándar	Mediana	N
Ile/Ile	50.2	32.5	39.8	34
Ile/Val	68.5	56.6	47.8	91
Val/Val	86.7	79.5	71	53

Metales y metaloides pesados

Con objeto de distinguir posibles efectos de la exposición a metales en la población se calcularon las medias de frecuencias de MN, gemaciones y puentes entre los individuos con niveles superiores a los permitidos (señalados en la tabla 5). Tal como se observa en la tabla 23 los niños con niveles altos de Pb presentaron las frecuencias de MN más altas.

Tabla 23. Frecuencia de daño genotóxico en relación con metales pesados

Metal/ Metaloide	MN	Gemaciones	Puentes nucleoplasm.	Genotox. total	N	Nivel de exposición*	Valores de referencia**
Pb	0.108 ± 0.27	0.510 ± 1.03	0.315 ± 0.48	0.931	46	7.972 ± 3.26	<5µg/dL
Cd	0.097 ± 0.33	0.407 ± 0.76	0.236 ± 0.45	0.740	107	0.496 ± 0.37	0.185 µg/L o ppb
Hg	0	0	0.5 ± 0.40	0.5	4	9.203 ± 6.31	4 µg/L o ppb
As	0.062 ± 0.17	0.375 ± 0.44	0.375 ± 0.51	0.812	8	141 ± 73.08	<100 µg/L o ppb

*Valores tomados de: Yañez (comunicación personal).

** Valores máximos permitidos en niños según la ATSDR

Genotox. Total: Frecuencia de genotoxicidad total

Se empleó un modelo lineal generalizado con transformación de Poisson a fin de buscar asociaciones entre el total de daño genotóxico observado y los niveles de Pb, Cd, Hg y As en plasma y orina, como se observa en la tabla 24 no se encontraron asociaciones significativas entre estos.

Tabla 24. Efecto de la exposición de metales sobre la frecuencia de genotoxicidad total

Metal/Metaloide	Coef.	Err. Estandar	Z	P> z	Intervalo de confianza	
Plomo	0.021	0.032	0.68	0.498	-0.04	0.08
Cadmio	0.097	0.253	0.38	0.7	-0.39	0.59
Mercurio	-0.075	0.082	-0.92	0.358	-0.23	0.08
Arsénico	-0.004	0.002	-0.15	0.879	-0.006	0.005

Se empleó la misma estrategia para determinar asociaciones entre la frecuencia de binucleadas y los niveles de metales. Como se observa en la tabla 25 solo hay relación significativa con mercurio.

Tabla 25. Efecto de la exposición de metales sobre la frecuencia de binucleadas

Metal/Metaloide	Coef.	Err. Estandar	z	P> z	Intervalo de confianza	
Plomo	-0.018	0.021	-0.86	0.389	-0.06	0.02
Cadmio	-0.102	0.190	-0.54	0.591	-0.47	0.27
Mercurio	0.052	0.022	2.31	0.021	0.008	0.09
Arsénico	0.0002	0.001	0.17	0.865	-0.002	0.003

Mediante un modelo lineal generalizado se distinguió relación entre el aumento en la frecuencia de células basales y picnóticas con altas dosis de Pb y As, en tanto que la frecuencia de cariorrexis aumenta con las dosis de Cd.

Discusión

Población de estudio

Los 178 miembros que conforman la población de estudio ha sido dividida en rangos de edad compuestos homogéneamente por niños y niñas, cada rango fue representado por entre 25 y 37 individuos (Tabla 6).

Esto se hizo porque el índice de masa corporal permite estimar de manera general el desarrollo de los niños y debe aumentar conforme los niños crecen. De acuerdo con la figura 8 el IMC incrementa de acuerdo con el nivel escolar. Aunque se ve variación entre los grupos, los valores de la mediana de cada grupo están dentro de lo normal para la edad, de acuerdo con las tablas FANTA III (FANTA III, 2013).

Sistema de micronúcleos en mucosa oral

El ensayo de MN en mucosa oral permite identificar la frecuencia de eventos de toxicidad a nivel genético y citológico. En esfuerzos internacionales se ha buscado su estandarización mediante el proyecto HUMNxl que en 2009 lanzó un protocolo estándar del ensayo (Thomas et al. 2009). En este estudio se emplearon las condiciones recomendadas en el mencionado artículo.

En el análisis realizado (Figuras 9 y 10), se encontraron valores similares a los reportados por Thomas y Fenech (2009) para las frecuencias de células completamente diferenciadas, células en cariolisis, células con cromatina condensada, y gemaciones. Por otro lado, las frecuencias de células basales, células en cariorrexis y células con picnosis son notablemente superiores a la referencia (27.4 ± 21.36 , 9.36 ± 8.71 , 3.23 ± 2.35 , respectivamente; Thomas, 2009), tanto para individuos jóvenes como mayores (18 – 26 años y 64 a 75 años); por otro lado, las frecuencias de MN y células binucleadas son inferiores a las reportadas por el mismo grupo (0.3 ± 0.83 y 11.63 ± 5.49 , respectivamente). Cabe señalar que no se encontraron células basales con eventos de daño genético, en cambio hallamos células basales con daño en el núcleo semejante al de una célula diferenciada durante la cariorrexis en 27 niños, esta variante no había sido reportado anteriormente, cabe señalar que los niños que presentaron este tipo de células forman un grupo con condiciones homogéneas en cuanto a genotipos de CYP1A1, GSTT1 y GSTM1, lo mismo en cuanto a niveles de As, Hg, Cd y Pb.

Los valores de MN (0.19 ± 0.54) se encuentran por debajo, aunque no significativamente, de los reportados previamente para mexicanos tanto para individuos expuestos como de referencia, de entre tales estudios destacan los de Montero en una población de adultos expuestos a PAHs en el estado de Coahuila (expuestos: 0.31 ± 0.36 y 0.34 ± 0.48 , testigo: 0.33 ± 0.35) (comunicación personal), cabe señalar que las frecuencias de daño suelen incrementar con la edad, por lo que en una población en condiciones similares formada por niños se esperarían valores más bajos. Las frecuencias halladas en esta población son inferiores a las frecuencias en niñas residentes en la Ciudad de México (0.5 ± 0.13) (Montero et al. 2003); así mismo notablemente inferiores a las frecuencias reportadas por Gómez-Arroyo en niños de 1 a 13 años expuestos a diferentes pesticidas en el estado de Sinaloa (expuestos: 3.6 ± 0.75 , testigo: 0.6 ± 0.15 ; (Gómez-Arroyo et al. 2013). Sin embargo las frecuencias de aneuploidías (3.08 ± 3.99) son ligeramente más elevadas a las reportadas previamente en adultos y niños mexicanos por Montero (2003) y Gómez-Arroyo (2013) (frecuencias no

mayores a 2), pero se mantienen por debajo de las reportadas por Fenech y Thomas para niños en 2009 y 2011 (bin: 11.63 ± 5.45 y 15.73 ± 9.46 respectivamente).

A pesar de la conocida actividad del pueblo de manejar residuos electrónicos, las frecuencias obtenidas en este estudio de efectos de daño genotóxico mediante el uso del ensayo de micronúcleos en mucosa oral muestran características semejantes a las de poblaciones sujetas a baja o nula exposición analizadas en estudios previos. La exposición a metales fue baja en la mayoría de los niños y los niveles de exposición no mostraron una correlación con la frecuencia de lesiones genotóxicas evaluadas: micronúcleos, gemaciones o puentes.

Los bajos niveles de estas lesiones como marcadores de efecto genotóxico en comparación con los reportados para grupos de la misma edad y nacionalidad podrían indicar cualquiera de las siguientes posibilidades: que la población aquí analizada no se encuentra sujeta a niveles de exposición suficientemente altos de contaminantes capaces de inducir este tipo de daño, que los contaminantes a que están expuestos no inducen este tipo de daño, o que el sistema no es suficientemente sensible para detectar daño en el régimen de exposición de estos niños.

Respecto a esta última posibilidad, la sensibilidad de la prueba, aparentemente sí se detectó un efecto en el recambio de la mucosa al aumentar la frecuencia de células en cariorrexis y picnosis, que se relacionan con apoptosis, y un incremento de células basales en las muestras que podría estar relacionado con un incremento en la proliferación celular como compensación al incremento de pérdidas celulares.

Frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos de CYP1A1

Las frecuencias genotípicas halladas en este estudio, Ile/Ile: 0.19, Ile/Val: 0.51 y Val/Val: 0.29 (tabla 8), son semejantes a las reportadas por Montero (2007) para una población en Coahuila (Ile/Ile: 0.208, Ile/Val: 0.521 y Val/Val: 0.271) y cercanas a otros valores reportados para mexicanos (Gonsebatt et al. 2006; Suárez 2008).

Reportes de la última década sobre frecuencias del polimorfismo de CYP1A1 aquí analizado, señalan que la frecuencia alélica de la mutación (Val) en poblaciones caucásicas es muy baja, alcanzando valores máximos de 0.131 (Suárez 2008; Taskiran et al. 2006). En poblaciones asiáticas los valores de la frecuencia alélica de Val se encuentran entre 0.183 y 0.275 (Chen et al. 2001; Lee et al. 2001; Suárez 2008). En tanto en poblaciones africanas se reportan frecuencias de entre 0 y 0.053 (Pérez-Morales et al. 2008). En mexicanos se han reportado frecuencias más altas del alelo mutado Val, los valores son 0.54, 0.56 y 0.57 (Montero et al., 2007; Suárez 2008). La frecuencia alélica de la mutación en la población que nuestro estudio analiza fue de 0.55 (tabla 8) valor semejante a los reportados para mexicanos al centro y norte del país. La consistencia entre estos valores podría indicarnos que la presencia del alelo mutado, que conduce al cambio de Ile por Val en la posición 462 de la proteína, está presente en aproximadamente la mitad de la población del país. Sin embargo son necesarios más estudios para determinar la prevalencia de este polimorfismo en las poblaciones al sur y oriente del país y así confirmar lo anterior.

Frecuencias genotípicas de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1

Las frecuencias de GSTM1 nulo en caucásicos son de aproximadamente 0.53, 0.52 en asiáticos, y 0.26 en africanos (Garte et al. 2001). En poblaciones latinoamericanas las frecuencias de

GSTM1 nulo son cercanas a las reportadas para poblaciones asiáticas. Las frecuencias reportadas para esta delección en mexicanos se encuentran entre 0.37 y 0.48 (Martínez-Ramírez et al. 2013; Montero et al. 2007; Pérez-Morales et al. 2008). En este estudio la frecuencia de la delección fue de 0.43 (Tabla 10), valor cercano al reportado por Montero (2007) en la población de Tlaxcala-Puebla (0.42).

La frecuencia de GSTT1 nulo en este estudio fue de 0.146 (Tabla 9), valor consistente con los reportados previamente para poblaciones mexicanas cuyas frecuencias van de 0.093 a 0.191 (Jaramillo-Rangel et al. 2015; Montero et al. 2007; Sandoval-Carrillo et al. 2014). La frecuencia de esta delección en otras poblaciones del mundo se encuentra alrededor de 0.15 para caucásicos, 0.20-0.26 para africanos, y 0.45-0.64 para asiáticos (Dandara et al. 2002; Landi 2000; Nelson et al. 1995).

Frecuencias genotípicas en combinaciones de polimorfismos

El cálculo de frecuencias de polimorfismos combinados permitió identificar porcentajes de la población que poseen los genes mutados objetivo de este estudio.

Las frecuencias de los polimorfismos combinados CYP1A1 y GSTM1, Tabla 11, muestran similitudes con todas las combinaciones reportadas por Montero (2007) en Tlaxcala-Puebla, con las únicas diferencias de que Ile/Ile-GSTM+ tiene menor presencia en el reporte de Montero, 0.061 frente a 0.123 en la población que aquí se analiza, mientras que Ile/Val-GSTM1+ en este estudio presenta una frecuencia menor (0.27 frente 0.38).

La combinación de los polimorfismos CYP1A1 y GSTT1 (Tabla 12) arrojó frecuencias cercanas a las reportadas por el grupo de Montero (2007), en ambos casos cerca del 50% de la población presenta el genotipo Ile/Val- GSTT1+, y los genotipos con GSTT1 nulo son los de menor frecuencia. El porcentaje de población con los dos polimorfismos menos favorables es mínima (3.93%), mientras que el porcentaje de individuos con alguno de los dos polimorfismos deficientes, y por tanto con diferentes grados de susceptibilidad a presentar daño, es de 82.5%.

En cuanto a la combinación de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1, consistentemente con lo descrito, la frecuencia más baja corresponde a ambos genotipos nulos, para esta combinación se han reportado valores entre 0.04 y 0.023 (Montero et al. 2007; Pérez-Morales et al. 2008; Sandoval-Carrillo et al. 2014), el valor en esta población es de 0.06 (Tabla 13), el resto de los genotipos en esta combinación presentan valores cercanos a los reportados donde uno solo de los genotipos nulos se cuenta en poco más del 40%, y entre 47% y 53% son portadores de ambos genotipos funcionales.

Daño genotóxico y citotóxico en relación con los polimorfismos metabólicos

A diferencia de lo que se esperaba, a través del análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de eventos de daño genotóxico por separado (micronúcleos, gemaciones nucleares y puentes nucleoplasmáticos) asociadas a ningún genotipo, ni aún en combinaciones de polimorfismos (datos no mostrados). Es posible que este resultado se deba a la baja detección de estos eventos en toda la población (Tabla 7).

La suma de los tres eventos de genotoxicidad, en cambio, sí muestra un aumento en su frecuencia asociado a diferentes genotipos. GSTT1 resultó tener relación significativa con este tipo de daño (Tabla 14) en tanto que GSTM1 tiene un valor cercano pero no alcanza a ser significativo. Al calcular las frecuencias de genotoxicidad totales para los genotipos de GSTT1 (Tabla 16) se aprecia que los valores de daño más altos son atribuidos a individuos con genotipo nulo, esto respaldaría la predicción que indica que mayor susceptibilidad a daño en individuos con genotipo nulo, ya que gracias a esta delección cuentan con una deficiencia metabólica. En cuanto a GSTM1, las frecuencias de genotoxicidad total parecen tener la misma tendencia que GSTT1, el valor más alto corresponde a los individuos con el genotipo nulo (Tabla 15). Finalmente, en CYP1A1 (Tabla 17) parece que las frecuencias de daño son similares en los 3 genotipos, aunque el valor más alto lo presenta el genotipo homocigoto mutante. Debido a que lo usual es que se analicen los eventos genotóxicos por separado, es difícil comparar frecuencias de genotoxicidad total con valores de referencia.

En las tablas 18, 19 y 20 se muestran todos los individuos que presentaron algún evento genotóxico ordenados por genotipo y por frecuencia de daño, el objetivo es identificar los genotipos de los individuos con los niveles de daño más altos. La mayor parte de la población presenta daño en bajas frecuencias, conforme aumenta la frecuencia de daño disminuye el número de individuos. Respecto a CYP1A1 (tabla 18) los participantes con alta frecuencia son portadores de la mutación, homocigotos o heterocigotos. Tanto en el caso de GSTT1 como de GSTM1 (Tablas 19 y 20, respectivamente) la mayor parte de los individuos con daño genotóxico son portadores de los genotipos nulos, este patrón se conserva aún en los individuos con los intervalos de daño más altos. Lo anterior podría indicar una asociación entre la incidencia de eventos de genotoxicidad y los genotipos deficientes de CYP1A1, GSTM1 y GSTT1. No obstante el reducido número de casos con alta frecuencia de daño nos impide hacer afirmaciones al respecto.

La presencia de células binucleadas fue el evento de mayor prevalencia en la población. Este tipo de daño, denominado también como poliploidía, se encontró con mayor frecuencia en portadores de GSTM1 nulo (Tabla 21). Esto podría indicar que portadores de esta delección cuentan con ligeras deficiencias metabólicas que permiten la formación de poliploidías.

Por otro lado, al asociar los parámetros de muerte celular con los genotipos aquí analizados se encontró que las frecuencias de cariorrexis se distribuyen diferencialmente de acuerdo a lo esperado para los genotipos de CYP1A1 (Tabla 22). Es posible que el incremento en la frecuencia de cariorrexis esté asociado a la presencia del genotipo mutante (Val/Val) de CYP1A1, la cual conduce a un incremento en la actividad de la enzima.

Daño genotóxico en relación con metales y metaloides pesados

Se calcularon las frecuencias de MN, gemaciones y puentes nucleoplasmáticos en los individuos que rebasan los niveles seguros de Pb, Cd, Hg y As (Tabla 23) para distinguir si existen cambios en estos individuos. Los niños con niveles altos de Pb presentaron las frecuencias de MN más altas, no obstante son inferiores a las reportadas por Thomas en 2009 (0.03 ± 0.83) en individuos sanos, y que son tomadas como referencia para este estudio, cabe mencionar que son ligeramente inferiores a la frecuencia de MN obtenida para la población

completa (0.19 ± 0.54) mostrada en la tabla 7. Así mismo la frecuencia de gemaciones más alta se encontró entre los niños con altos niveles de Pb, también son inferiores a los calculados para la población entera (0.89 ± 1.54) y a los reportados por Thomas (0.93 ± 1.11). Por otro lado, la frecuencia de puentes nucleoplasmáticos es ligeramente superior a los reportados para la población completa (0.22 ± 0.41) en todos los grupos con altos niveles de metales, principalmente Hg, aunque ninguno de manera significativa. Por último la frecuencia de genotoxicidad total más alta la alcanzó el grupo con alto nivel de Pb, sin embargo se sigue considerando baja frecuencia de eventos de genotoxicidad.

Una vez más se empleó la frecuencia de genotoxicidad total, ésta vez en relación a los niveles determinados de metales, sin embargo no se encontraron asociaciones significativas (Tabla 24). La poca relación entre Pb, Cd, Hg y As y daño genotóxico es un resultado consistente en este trabajo, no es de extrañar, ya que los niveles de exposición que se pudieron determinar a metales y metaloides pesados, mostraron niveles “normales” para Hg y As, y aunque para Pb y Cd sí resultaron elevados estos agentes no han sido confirmados como genotóxicos, aunque existe debate al respecto (García-Lestón et al. 2010; Schwerdtle et al. 2010). Cd es carcinogénico y Plomo está en los grupos 2A (compuestos inorgánicos) y 2B (plomo en general) de la IARC (2012).

En cuanto al régimen de exposición de los niños, se cuenta sólo con los datos de exposición de 125 niños a 4 agentes de los cuales Pb y Cd alcanzaron altos niveles en orina y plasma, pero ninguno ha mostrado ser un genotóxico potente, y sí pudieran afectar la salud mediante mecanismos diferentes, como inhibir la reparación del DNA induciendo probablemente la muerte celular.

A pesar de considerar a la población expuesta a niveles importantes de los contaminantes ambientales mencionados debido a la actividad económica de la zona, no se detectaron niveles de daño genotóxico por encima de los reportados para poblaciones testigo en otros estudios, por lo que podría pensarse que los niños estudiados no se encuentran sujetos a niveles de exposición suficientemente altos para distinguir este tipo de efectos. No obstante los niveles de Pb y Cd fueron altos en un número considerable de la población por lo que sería prudente realizar otro tipo de pruebas a la población a fin de detectar efectos específicos de dichos agentes.

El segundo parámetro de importancia ha sido la frecuencia de binucleadas, al buscar relaciones entre este y los niveles de metales se encontró asociación significativa con mercurio (Tabla 25), este resultado señala que Hg podría ser un agente de daño a nivel de la citocinesis, es interesante ya que la población en general no supera los niveles aceptados de este metal en sangre. Finalmente la asociación de células basales y picnóticas con Pb y As señalan que la exposición a estos agentes induce eventos de muerte celular (picnosis) por lo que la tasa de regeneración en el epitelio bucal aumenta por tanto la frecuencia de células basales crece.

Es poco el trabajo que se ha hecho con los parámetros de citotoxicidad en este sistema como para estar ciertos de que el incremento en células basales, cariorrexis, picnosis y cariorrexis de células basales se debe a la exposición a metales, pero los resultados son interesantes pues sugieren un daño a la mucosa que obliga a una mayor proliferación en el tejido cuando la exposición no incluye agentes genotóxicos. Este tema tendrá que considerarse mejor en

futuros estudios de monitoreo en poblaciones expuestas en los que se use este sistema de prueba.

Conclusiones

- Las frecuencias de los polimorfismos analizados en esta población, GSTT1, GSTM1, y CYP1A1, son cercanos a los reportados previamente para otras poblaciones mexicanas.
- La frecuencia del polimorfismo GSTM1 nulo es cercana a las descritas anteriormente en Latinoamérica, particularmente en el caso de Tlaxcala-Puebla. El 43% de la población analizada presentaba esta delección. Por otro lado, la delección que conlleva al genotipo nulo de GSTT1 se halló en el 14.6% del grupo, dentro del rango de los valores reportados para mexicanos. Las frecuencias polimórficas de CYP1A1 mostraron ser similares a las determinadas previamente para mexicanos. La prevalencia de la mutación (Val) es casi del 50%.
- Las frecuencias de eventos de daño genotóxico mediante el ensayo de MN en mucosa oral parecen cercanas a las descritas para poblaciones sanas con baja exposición a contaminantes, a pesar de que los niveles de Cd y Pb rebasaron los límites permisivos, al no ser agentes genotóxicos no afectan la coherencia de los resultados.
- Las frecuencias de células binucleadas son superiores a las descritas en niños mexicanos y su incremento parece estar asociado a los niveles de Hg.
- La exposición a metales podría estar asociada a las altas frecuencias de muerte celular (cariorrexis y picnosis), y a un incremento en la tasa de proliferación celular subsecuente.
- No hubo asociaciones significativas entre los genotipos de GSTM1, GSTT1 y CYP1A1 con valores elevados de daño genético por separado. Sin embargo parece haber relación entre el genotipo GSTT1 nulo y altas frecuencias de genotoxicidad total.
- Portadores de GSTM1 nulo tuvieron mayor frecuencia de células binucleadas, por lo que su incidencia podría estar asociada a este genotipo. Mientras que el incremento en cariorrexis podría estar asociado al incremento de actividad de la enzima CYP1A1 que conlleva la mutación aquí estudiada.
- Respecto a los anteriores hallazgos, no hay muchos estudios que permitan hacer una comparación pues son escasos los trabajos en los que se reportan los eventos de muerte celular. Futuros estudios en personas expuestas deberían contribuir con estos datos.

Anexo

Encuesta presentada a los participantes del estudio.

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO		
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y MEDICINA GENÓMICA			
PROYECTO DE EVALUACIÓN DE LA SALUD INFANTIL POR LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES AMBIENTALES – TLACHALOYA, EDO. DE MÉXICO			
Fecha:	Clave:		
Nombre del entrevistador(a):			
Nombre de la escuela:			
DATOS DEL NIÑO(A):			
1	Nombre completo:		
	Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre(s)
2	Sexo: F() M()		
3	Grado escolar:	Turno:	
4	Tiempo de residencia en el sitio:		
HÁBITOS:			
Le gusta consumir:			
5	Alimentos salados (papas, frituras, etc.)	Sí ()	No ()
6	Chamoy	Sí ()	No ()
7	Tamarindo con chile y sal	Sí ()	No ()
	¿Con qué frecuencia?	Diario(); 3 veces/semana(); menos ()	
8	¿Fuma?	Sí ()	No ()
		Diario(); 3 veces/semana(); menos ()	

Referencias

- Agarwal, S. K. 2009. *Heavy Metal Pollution*. APH Publishing. Obtenido en Enero 4, 2016 (<https://books.google.com/books?id=nmputkzWWkkC&pgis=1>).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. "Arsenic: CAS#7440-38-2."
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2012. "Cadmium: CAS#7440-43-9."
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. "Lead: CAS# 7439-92-1." 1–2. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts13.pdf>).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1999. "Mercury: CAS#7439-97-6."
- Angelini, S., Kumar, R., Carbone, F., Bermejo, L., Maffei, F., Cantelli-Forti, G., Hemminki, K. y Hrelia, P. 2008. "Inherited Susceptibility to Bleomycin-Induced Micronuclei: Correlating Polymorphisms in GSTT1, GSTM1 and DNA Repair Genes with Mutagen Sensitivity." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 638(1-2):90–97.
- Baxter, S., Thomas, E. y Campbell, I. 2001. "GSTM1 Null Polymorphism and Susceptibility to Endometriosis and Ovarian Cancer." *Carcinogenesis* 22(1):63–66. Obtenido el 11 de noviembre, 2015 (<http://carcin.oxfordjournals.org/content/22/1/63.short>).
- Biganzoli, L., Falbo, A., Forte, F., Grosso, M., y Rigamonti, L. 2015. "Science of the Total Environment Mass Balance and Life Cycle Assessment of the Waste Electrical and Electronic Equipment Management System Implemented in Lombardia Region (Italy)." 525:361–75.
- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., Bolognesi, C., Holland, N., Thomas, P. y Fenech, M. 2009. "State of the Art Survey of the Buccal Micronucleus Assay- A First Stage in the HUMNXL Project Initiative." *Mutagenesis* 24(4):295–302.
- Carpenter, D. 2015. "Exposure to and Health Effects of Volatile PCBs." *Reviews on environmental health* 30(2):81–92. Obtenido el 20 de Octubre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822318>).
- Chen, D., Bi, X., Zhao, J., Chen, L., Tan, J., Mai, B., Sheng, G., Fu, J. y Wong, M. 2009. "Pollution Characterization and Diurnal Variation of PBDEs in the Atmosphere of an E-Waste Dismantling Region." *Environmental Pollution* 157(3):1051–57.
- Chen, S., Xue, K., Xu, L., Ma, G. y Wu, J. 2001. "Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 Genes in Relation to Individual Susceptibility to Lung Carcinoma in Chinese Population." *Mutation research* 458(1-2):41–47. Obtenido el 18 de Noviembre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406420>).
- Corsolini, S., Kannan, K., Imagawa, T., Focardi, S. y Giesy, J. 2002. "Polychloronaphthalenes and Other Dioxin-like Compounds in Arctic and Antarctic Marine Food Webs." *Environmental*

- science & technology* 36(16):3490–96. Obtenido el 29 de Mayo, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214639>).
- Coughlin, S. y Hall, I. 2002. "Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Risk of Ovarian Cancer: A HuGE Review." *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 4(4):250–57.
- Dandara, C., Sayi, J., Masimirembwa, C., Magimba, A., Kaaya, S., De Sommers, K., Snyman, J. 2002. "Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and Glutathione Transferases (M1, T1 and P1) among Africans." *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC* 40(9):952–57. Obtenido el 23 de noviembre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435115>).
- Darnerud, P. 2003. "Toxic Effects of Brominated Flame Retardants in Man and in Wildlife." *Environment International* 29(6):841–53.
- Deakin, M. Elder, J., Hendrickse, C., Peckham, D., Baldwin, D., Pantin, C., Wild, N., Leopard, P., Bell, D., Jones, P., Duncan, H., Branningan, K., Alldersea, J., Fryer, A. y Strange, R. 1996. "Glutathione S-Transferase GSTT1 Genotypes and Susceptibility to Cancer: Studies of Interactions with GSTM1 in Lung, Oral, Gastric and Colorectal Cancers." *Carcinogenesis* 17(4):881–84. Obtenido el 11 de Noviembre, 2015 (<http://carcin.oxfordjournals.org/content/17/4/881.abstract>).
- FANTA III, Food and Nutrition Technical Assistance. 2013. "Tablas de IMC Y Tablas de IMC para la Edad , de niños (as) y adolescentes de 5 a 18 años de edad y Tablas de IMC para adultos (as) no embarazadas, no Lactantes ≥ 19 Años de Edad."
- Fenech, Michael. 2006. "Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Evolves into a 'Cytome' Assay of Chromosomal Instability, Mitotic Dysfunction and Cell Death." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600(1-2):58–66.
- Fernández, B., Yarto M., y Castro J. 2004. "Listado Adicional Al Convenio de Estocolmo." en *Las sustancias tóxicas persistentes.*, editado por Instituto Nacional de Ecología. Obtenido el 29 de Mayo, 2015 (http://siscope.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/sustancias_toxicas_persistentes.pdf).
- Fowles, J., Fairbrother, A., Baecher-Steppan, L. y Kerkvliet, N. 1994. "Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (De-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 86(1-2):49-61
- Fromme, H., Albrecht, M., Appel, M., Hilger, B., Völkel, W., Liebl, B. y Roscher. 2015. "PCBs, PCDD/Fs, and PBDEs in Blood Samples of a Rural Population in South Germany." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218(1):41–46. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438463914000637>).
- García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E. y Laffon, B. 2010. "Genotoxic Effects of Lead: An Updated Review." *Environment international* 36(6):623–36. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466424>).

- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A., Ambrosone, C. Autrup, H., Autrup, J., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Boffetta, P., Bouchardy, C., Breskvar, K., Brockmoller, J., Cascorbi, I., Clapper, M., Coutelle, C., Daly, A., Dell'Omo, M., Dolzan, V., Dresler, C., Fryer, A., Haugen, A., Hein, D., Hildesheim, A., Hirvonen, A., Hsieh, L., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, I., Kang, D., Kihara, M., Kiyohara, C., Kremers, P., Lazarus, P., Le Marchand, L., Lechner, M., Van Lieshout, E., London, S., Manni, J., Maugard, C., Morita, S., Nazar-Stewart, V., Noda, K., Oda, Y., Parl, F., Pastorelli, R., Persson, I., Peters, W., Rannug, A., Rebbeck, T., Risch, A., Roelandt, L., Romkes, M., Ryberg, D., Salagovic, J., Schoket, B., Seidegard, J., Shields, P., Sim, E., Sinnet, D., Strange, R., Stücker, I., Sugimura, H., To-Figuera, J., Vineis, P. y Yu, M. 2001. "Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 10(12):1239–48.
- Giri, S., Yadav, A., Kumar, A., Dev, K., Gupta, R., Aggarwal, N., Seth, N. y Gautam, S. 2011. "Association of GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms with DNA Damage in Coal-Tar Workers." *Science of the Total Environment* 409(20):4465–69.
- Goldstein, J. y Safe, S. 1989. *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products*. Second edition. Chapter 9: Mechanism of action and structure-activity relationships for the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds. En *Topics in Environmental Health*. Obtenido el 3 de Octubre, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444810298500138>).
- Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Calvo-González, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M., Martínez-Arroyo, A., Félix-Gastélum, R. y Lagarda-Escarrega, A. 2013. "Assessing the Genotoxic Risk for Mexican Children Who Are in Residential Proximity to Agricultural Areas with Intense Aerial Pesticide Applications." *Rev. Int. Contam. Ambie.* 3:217–25.
- Gonsebatt, M., Molina, E., Martínez González, M., Petrosyan, P. y Rubio, J. 2006. *Correlación Entre Los Niveles de Aductos ADN-HAP Y Los Polimorfismos *2C Y 2A Del CYP1A1 En Una Población de Alto Riesgo*. Obtenido el 18 de Noviembre, 2015
- Grimm, F., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H., Ludewig, G., Hornbuckle, K., Duffel, M., Bergman, A. y Robertson, L. 2015. "Metabolism and Metabolites of Polychlorinated Biphenyls." *Critical reviews in toxicology* 45(3):245–72.
- Guy, Robin C. 2014. "Micronucleus Assay." *Encyclopedia of Toxicology, Volume 3*.
- Hooper, K. y McDonald, T. 2000. "The PBDEs: An Emerging Environmental Challenge and Another Reason for Breast-Milk Monitoring Programs." *Environmental Health P* 108(5):387–92.
- Hussein, A., Pasha, H., El-Shahat, H., Gad, D. y Toam, M. 2014. "CYP1A1 Gene Polymorphisms and Smoking Status as Modifier Factors for Lung Cancer Risk." *Gene* 541(1):26–30. Obtenido el 7 de Septiembre, 2015 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.003>).
- IARC. 1990. "Decabromodiphenyl Oxide." en *IARC, Monographs Volume 48. National Toxicology Program*. Obtenido el 29 de Mayo, 2015 (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol48/mono48-8.pdf>).

- Instituto Nacional de Ecología (INE). 2007. *DIAGNÓSTICO SOBRE LA GENERACIÓN DE RESIDUOS ELECTRÓNICOS EN MÉXICO. Informe Final.*
- Instituto Nacional de Ecología (INE), SEMARNAP. 1997. "Programa de Gestión Ambiental de Sustancias Tóxicas de Atención Prioritaria."
- Jaramillo-Rangel, G., Ortega-Martínez, M., Cerda-Flores, R. y Barrera-Saldaña, H. 2015. "Polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, and GSTM3 Genes and Breast Cancer Risk in Northeastern Mexico." *Genetics and Molecular Research* 14(2):6465–71.
- Ji, K., Choi, K., Giesy, J., Musarrat, J. y Takeda, S. 2011. "Genotoxicity of Several Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hydroxylated PBDEs, and Their Mechanisms of Toxicity." *Environmental Science and Technology* 45(11):5003–8.
- Landi, S. 2000. "Mammalian Class Theta GST and Differential Susceptibility to Carcinogens: A Review." *Mutation research* 463(3):247–83. Obtenido el 23 de Noviembre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018744>).
- Lee, C., Lee, J., Kang, J. y Kim, H. 2001. "Effects of Genetic Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 on the Urinary Levels of 1-Hydroxypyrene and 2-Naphthol in Aircraft Maintenance Workers." *Toxicology letters* 123(2-3):115–24. Obtenido el 18 de Octubre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641039>).
- LGPGIR. 2003. "LA LEY GENERAL PARA LA PREVENCIÓN Y GESTIÓN INTEGRAL DE LOS RESIDUOS." Obtenido el 10 de Septiembre, 2015 (<http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/legislacion/lgpgir.pdf>).
- Loganathan, B. y Masunaga, S. 2015. "PCBs, Dioxins and Furans." Pp. 239–47 en *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier Inc. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001592000191>).
- Luch, Andreas. 2012. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 3: Environmental Toxicology*. Springer Science & Business Media. Obtenido el 14 de Septiembre, 2015 (https://books.google.com/books?id=D6IG1R_X064C&pgis=1).
- Manahan, S. 2006. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. Third Edit. Lewis Publishers. (<papers2://publication/uuid/E431E85F-AE40-4053-8B6D-F073CA837CFB>).
- Martínez-Ramírez, O. C. et al. 2013. "Polymorphisms of Catechol Estrogens Metabolism Pathway Genes and Breast Cancer Risk in Mexican Women." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 22(3):335–43. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000097>).
- McDonald, T. 2002. "A Perspective on the Potential Health Risks of PBDEs." *Chemosphere* 46(5):745–55.
- Meador, J. 2008. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." en *Ecotoxicology*. Elsevier B. V.
- Miller, M. y Cronin, M. 2000. *Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Disease*. CRC Press. Obtenido el 4 de Junio, 2015 (<https://books.google.com/books?id=feCaY9I3hCwC&pgis=1>).

- Montero, R., Serrano, L., Dávila, V., Segura, Y., Arrieta, A., Fuentes, R., Abad, I., Valencia, L., Sierra, P. y Camacho, R. 2003. "Metabolic Polymorphisms and the Micronucleus Frequency in Buccal Epithelium of Adolescents Living in an Urban Environment." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42(3):216–22.
- Montero, R., Araujo, A., Carranza, P., Mejía-Loza, V., Serrano, L., Albores, A., Salinas, J. y Camacho, R. 2007. "Genotype Frequencies of Polymorphic GSTM1, GSTT1, and Cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans." *Human biology* 79(3):299–312. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078203>).
- Mostalac, J. 2014. "Propuesta Para La Implementación de Un Plan de Manejo de Residuos Electrónicos En Ciudad Universitaria, UNAM." Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nelson, H., Wiencke, J., Christiani, D., Cheng, T., Zuo, Z., Schwartz, B., Lee, B., Splitz, M., Wang, M. y Xu, X. 1995. "Ethnic Differences in the Prevalence of the Homozygous Deleted Genotype of Glutathione S-Transferase Theta." *Carcinogenesis* 16(5):1243–45. Obtenido el 23 de Noviembre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7767992>).
- Norén, K. y Meironyté, D. 2000. "Certain Organochlorine and Organobromine Contaminants in Swedish Human Milk in Perspective of Past 20–30 Years." *Chemosphere* 40(9-11):1111–23. Obtenido el 29 de Mayo, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653599003604>).
- Norppa, H. 1997. "Cytogenetic Markers of Susceptibility: Influence of Polymorphic Carcinogen-Metabolizing Enzymes." *Environmental Health Perspectives* 105(SUPPL. 4):829–35.
- Pérez-Morales, R., Castro-Hernández, C., Gonsebatt, M. y Rubio, J. 2008. "Polymorphism of CYP1A1*2C, GSTM1*0, and GSTT1*0 in a Mexican Mestizo Population: A Similitude Analysis." *Human biology* 80(4):457–65. Obtenido el 19 de Noviembre, 2015 (<http://dx.doi.org/10.3378/1534-6617-80.4.457>).
- Puckett, J., Byster, L., Westervelt, S., Gutierrez, R., Davis, S., Hussain, A. y Dutta, M. 2002. *Exporting Harm: The High-Tech Trashing of Asia*. (<http://www.mendeley.com/catalog/exporting-harm-hightech-trashing-asia/>).
- Quiñones, L., Lucas, D., Godoy, J., Cáceres, D., Berthou, F., Varela, N., Lee, K., Acevedo, C., Martínez, L., Aguilera, A. y Gil, L. 2001. "CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 Genetic Polymorphisms. The Effect of Single and Combined Genotypes on Lung Cancer Susceptibility in Chilean People." *Cancer Letters* 174(1):35–44.
- Rahman, F., Langford, K., Scrimshaw, M. y Lester, J. 2001. "Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants." *The Science of the total environment* 275(1-3):1–17.
- Rana, S. 2006. *Environmental Pollution: Health and Toxicology*. Alpha Science International Limited. Obtenido el 18 de Septiembre, 2015 (https://books.google.com.mx/K.,books/about/Environmental_Pollution.html?id=GQftLn7u8igC&pgis=1).
- Redlich, G., Zanger, U., Riedmaier, S., Bache, N., Giessing, A., Elsenacher, M., Stephan, C., Meyer, H., Jensen, O. y Marcus, K. 2008. "Distinction between Human Cytochrome P450

- (CYP) Isoforms and Identification of New Phosphorylation Sites by Mass Spectrometry." *Journal of proteome research* 7(11):4678–88. Obtenido el 7 de Enero, 2016 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18828626>).
- Rojas, M., Cascorbi, I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G., Mayer, L., Kopp-Schneider, A., Roots, I. y Bartsch, H. 2000. "Modulation of Benzo[a]pyrene Diol-epoxide-DNA Adduct Levels in Human White Blood Cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 Polymorphism." *Carcinogenesis* 21(1):35–41.
- Sandoval-Carrillo, A., Aguilar-Duran, M., Vázquez-Alaniz, F., Castellanos-Juárez, F., Barraza-Salas, M., Sierra-Campos, E., Téllez-Valencia, A., La Llave-León, O. y Salas-Pacheco, J. 2014. "Polymorphisms in the GSTT1 and GSTM1 Genes Are Associated with Increased Risk of Preeclampsia in the Mexican Metizo Population." *Genetics and Molecular Research* 13(1):2160–65.
- Schwerdtle, T., Ebert, F., Thuy, C., Richter, C., Mullenders, L. y Hartwig, A. 2010. "Genotoxicity of Soluble and Particulate Cadmium Compounds: Impact on Oxidative Dna Damage and Nucleotide Excision Repair." *Chemical Research in Toxicology* 23(2):432–42.
- SEMARNAT. 2010. "Directorio de Centros de Acopio de Materiales Provenientes de Residuos En México." Obtenido el 10 de Septiembre, 2015 (http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/transparencia/transparenciafocalizada/residuos/Documents/directorio_residuos.pdf).
- Seremak-Mrozikiewicz, A., Drews, K., Semczuk, s., Jakowicki, J. y Mrozikiewicz, P. 2005. "CYP1A1 Alleles in Female Genital Cancers in the Polish Population." *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 118(2):246–50.
- Simeonov, L., Kochubovski, M. y Simeonova, B. 2010. *Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development: Risk Assessment and Prevention Strategies*. Springer Science & Business Media. Obtenido el 4 de Enero, 2015 (<https://books.google.com/books?id=00iR7qnjJgWC&pgis=1>).
- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Thakur, S., Banerjee, B., Singh, R., Grover, S., Singh, D., Pasha, S., Kumar, S. y Rai, A. 2011. "Genetic Polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and Susceptibility to DNA Damage in Workers Occupationally Exposed to Organophosphate Pesticides." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 725(1-2):36–42.
- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Banerjee, B., Singh, R., Grover, S., Singh, D., Pasha, S., Kumar, S. y Rai, A. et al. 2012. "Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 Genetic Polymorphisms on DNA Damage in Workers Occupationally Exposed to Organophosphate Pesticides." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 741(1-2):101–8.
- Song, Q. y Li, J. 2015. "A Review on Human Health Consequences of Metals Exposure to E-Waste in China." *Environmental Pollution* 196:450–61.
- Stine, K. y Brown, T. 2015. *Principles of Toxicology, Third Edition*. CRC Press. Obtenido el 21 de Septiembre, 2015 (<https://books.google.com/books?id=IHB3CAAQBAJ&pgis=1>).

- Stohs, S., Biswas, S. y Ghosh, B. 2014. *Encyclopedia of Toxicology*. Third Edit. Elsevier. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012386454300275X>).
- Suárez, K. 2008. "Efecto de Los Polimorfismos de CYP1A1 Y CYP2E1 En La Frecuencia de Micronúcleos En Una Población Mestiza de Tlaxcala." Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tamakawa, K. 2004. *Pesticide, Veterinary and Other Residues in Food*. Elsevier. Obtenido el 14 de Septiembre, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978185573734150023X>).
- Tamaki, Y., Arai, T., Sugimura, H., Sasaki, T., Honda, M., Muroi, Y., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N. y Hiratsuka. 2011. "Association between Cancer Risk and Drug-Metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Cases of Lung Cancer in Japan." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 26(5):516–22.
- Taskiran, C., Aktas, D., Yigit-Celik, N., Alikasifoglu, M., Yuce, K., Tuncbilek, E. y Ayhan, A. 2006. "CYP1A1 Gene Polymorphism as a Risk Factor for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer." *Gynecologic oncology* 101(3):503–6. Obtenido el 18 de Noviembre, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403567>).
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. y Fenech, M. 2009. "Buccal Micronucleus Cytome Assay." *Nature protocols* 4(6):825–37.
- Vineis, P., Malats, N., Lang, M., D'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. y Boffeta, P. 1999. *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. International Agency for Research on Cancer. Obtenido el 5 de Junio, 2015 (<https://books.google.com/books?id=61R3QgAACAAJ&pgis=1>).
- Vogel, U. 2011. "Polymorphism and Gene – Environment Interactions in Environmental Cancer." Pp. 631–39 in *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Encyclopedia of Environmental Health*.
- Wahner, A., Glatt, C., Bronstein, J. y Ritz, B. 2007. "Glutathione S-Transferase Mu, Omega, Pi, and Theta Class Variants and Smoking in Parkinson's Disease." *Neuroscience letters* 413(3):274–78. Obtenido el 11 de Noviembre, 2015 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394006012936>).
- Yang, Q., Qiu, X., Li, R., Liu, S., Li, K., Wang, F., Zhu, P., Li, G. y Zhu, T. 2013. "Exposure to Typical Persistent Organic Pollutants from an Electronic Waste Recycling Site in Northern China." *Chemosphere* 91(2):205–11. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.051>).
- Zhou, T., Ross, D., DeVito, M. y Crofton, K. 2001. "Effects of Short-Term in Vivo Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers on Thyroid Hormones and Hepatic Enzyme Activities in Weanling Rats." *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 61(1):76–82. Obtenido el 29 de Mayo, 2015 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294977>).