



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA**

**"EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN EL EPITELIO BUCAL Y ORINA EN LA  
POBLACIÓN INFANTIL EXPUESTA A PLOMO POR EL CONSUMO DE AGUA  
EN EL HORCONCITO, GUERRERO"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**BANI ELIZABETH ZAMUDIO CHAPINA**

**DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA**

**ASESOR INTERNO: M EN C. ALFONSO MACARIO LUNA VÁSQUEZ**

**CIUDAD DE MÉXICO. 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

***El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera bajo la dirección de la Dra. María Elena Calderón Segura.***

***Se realizó gracias al programa de UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN215911.***

*Dedicado a la memoria de mi Padre quien ha sido mi guía en esta travesía; a donde quiera que se encuentre.*

*A mí tita por haberme regalado años de su vida cuidándome.*

*A la niñez.*

*Con todo mi amor y cariño.*

*"El público ve la ciencia como un edificio monolítico de reglas y creencias inflexibles, y a los y las científicas-gracias al retrato que ofrecen los medios de ellos, como envarados ratones de biblioteca de bata blanca- como plúmbeos, vetustos, escleróticos defensores del "estatus quo". En verdad, la ciencia es algo mucho más flexible. La ciencia no tiene que ver con el status quo. La ciencia tiene que ver con la revolución"*

## **Agradecimientos**

Al programa de UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN215911, por financiar este proyecto de investigación.

Quizá todo lo que quede escrito aquí no exprese totalmente el agradecimiento que tengo hacia aquellas personas que plantaron su semilla para que este trabajo floreciera y concluyera.

Especial y finito agradecimiento a la Dra. Ma. Elena Calderón Segura ya que sin ella este trabajo indudablemente no habría sido posible. Gracias por haberme abierto la puerta de su laboratorio y espero pacientemente en mis bajas que esto concluyera.

A los niños participantes y a los padres de familia de la comunidad del Horconcito y Ciudad de Chilpancingo, Guerrero por su valiosa colaboración; así como a los niños de la Ciudad de México.

Al Centro de Ciencias de la Atmosfera por permitir realizar este trabajo.

A la Dra. Isabel Rodríguez Romero por el análisis estadístico.

Gracias a mi hermana Yeny y Chucho por el tiempo en qué me apoyaron con mis estudios.

A la Dra. Ma. del Socorro por mostrarme una parte de la Biología que no conocía.

A mi amigo Omar por estar ahí y por ser un ejemplo de lucha ante las adversidades de la vida.

A mi padre por enseñarme sin querer el Feminismo, y por ser un ejemplo de que se pueden lograr muchas cosas si se quiere.

Al feminismo por enseñarme que las mujeres podemos hacer todo lo que queramos, por ser mi fuerza en este mundo patriarcal y machista.

A todas esas mujeres que estuvieron antes de mí en la lucha; para que ahora muchas mujeres puedan participar en la ciencia.

A los libros y la música porque siempre me alegran la vida, y me invitan a soñar y ver un mundo de posibilidades; un mundo mejor.

A mi Pau que tanto quiero, por sacarme sonrisas e iluminar muchos días.

Gracias al M. en C. Alfonso Macario Luna Vázquez

A cada uno de mis sinodales por su valiosa aportación.

Gracias

## Índice

Resumen.....	10
Lista de abreviaturas.....	12
Lista de cuadros.....	13
Lista de figuras.....	13
Lista de gráficas.....	13
Listas de tablas.....	14
1. Introducción.....	15
2. Marco teórico.....	17
2.1 Historia del plomo.....	17
2.2 Características Físico-Químicas.....	18
2.2.1 Propiedades Físicas.....	18
2.2.2 Propiedades Químicas.....	19
2.3 Fuentes del Pb.....	20
2.3.1 Fuentes ambientales.....	20
2.3.2 Fuentes ocupacionales.....	22
2.3.3 Biodisponibilidad.....	22
2.4 Toxicocinética.....	23
2.4.1 Absorción.....	23



2.4.2 Distribución.....	23
2.4.3 Depósito.....	24
2.4.4 Eliminación.....	25
2.4.5 Interacciones del Pb con otros elementos.....	26
2.5 Efectos tóxicos del Pb.....	26
2.5.1 En el cuerpo humano.....	26
2.5.2 Efectos en el medio ambiente.....	30
2.6 Biomarcadores de genotoxicidad.....	32
2.6.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG).....	33
2.6.2 Ensayo Cometa alcalino.....	34
3. Planteamiento del problema.....	37
4. Hipótesis.....	48
5. Objetivos.....	39
6. Material y método.....	40
6.1 Zona de estudio.....	40
6.2 Selección de la población infantil.....	40
6.3 Ensayo cometa alcalino.....	41
6.4 Evaluación de 8-OH-dG en la orina por ELISA.....	42
6.5. Análisis Estadístico.....	43

7. Resultados.....	44
8. Discusión.....	53
9. Conclusiones.....	62
10 Referencia bibliográfica.....	61
Anexo. Concentraciones de plomo detectados en cuatro manantiales en el pueblo del Horconcito Guerrero.....	80

## Resumen

El plomo (Pb) es un elemento que existe en la corteza terrestre, no tiene ninguna función específica en el organismo, es bioacumulable en huesos, neurotóxico e inmunotóxico. Desde hace algunas décadas la intoxicación crónica por plomo es una de las más importantes preocupaciones ambientales y de salud; actualmente está restringido su uso en la mayoría de los países. Por esta razón se realizó un estudio de biomonitoreo genotóxico en la población infantil del Horconcito, Guerrero (ubicado 27 Km al poniente de la ciudad de Taxco Alarcón) en niños de edades 2 a 12 años (n=50). Esta población se encuentra ubicada en la zona de recarga, sin ninguna actividad industrial en sus cercanías; sin embargo los niveles elevados de Pb se encuentran de forma natural en la roca. En este trabajo se evaluó la inducción de daño al ADN de las células epiteliales de la mucosa bucal mediante el ensayo cometa alcalino y la detección en orina de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) por Ensayo de Inmuno-Adsorción Ligado a Enzimas (ELISA), en niños expuestos a plomo (n=50) y a un grupo de referencia (n=50) pertenecientes a la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, así como de un grupo de referencia positivo de la Ciudad de México (n=30). El daño al ADN se evaluó mediante tres parámetros: la frecuencia de cometas, la longitud de la cauda y el momento de la cauda. Los resultados mostraron que posiblemente el daño en el ADN de las células epiteliales de la mucosa bucal se debe al consumo de agua con Pb, así como el incremento de los niveles de 8-OH-dG en la orina, lo cual representa en peligro potencial para la salud ya que puede dar como

resultado diversos desórdenes permanentes o prolongados, a nivel neurológico, así como tener efectos sobre su sistema excretor, endocrino y hematológico.

## Lista de Abreviaturas.

- As: Arsénico
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- ATSR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
- Ca: Calcio
- Cd: Cadmio
- Cr: Cromo
- Cu: Cobre
- ELISA: Ensayo por Inmuno-Adsorción Ligado a Enzimas
- EPA: Agencia de Protección del Medio Ambiente
- Fe: Hierro
- HHS: Departamento de Servicios Humanos de Salud
- HPLC: Cromatografía líquida de Alto rendimiento
- IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
- ICH: Intercambio de Cromáticas Hermanas
- Ni: Níquel
- P: Fosforo
- Pb: Plomo
- WHO: Organización Mundial de la Salud
- Zn: Zinc

## Lista de Cuadros

- Cuadro 1. Algunas de las propiedades físicas del Pb.....19
- Cuadro 2. Concentraciones típicas de Pb en ambientes urbanos.....21

## Lista de Figuras

- Figura 1.Toxicocinética del Pb.....25
- Figura 2. Estructura química de la 8-OH-dG.....33
- Figura 3. Célula con daño severo.....36
- Figura 4. Célula con daño moderado.....36
- Figura 5. Ubicación del Horconcito, Guerrero.....40

## Lista de Gráficas

- Gráfica 1.Frecuencia de cometas ( $\bar{x}$ ) de la población del Horconcito comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo), n=50 y del grupo de referencia positivo (CdMx) t Student P<0.05.....46
- Gráfica 2.Longitud de la cauda ( $\bar{x}$ ) de la población del Horconcito comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo), n=50 y del grupo referencia positivo (CdMx) t Student P<0.05.....47
- Gráfica 3.Momento de la cauda ( $\bar{x}$ ) del Horconcito comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo). n=50 y del grupo referencia positivo(CdMx) t Student P<0.05.....48
- Gráfica 4.Niveles de 8-OH-dG ( $\bar{x}$ ) en muestras de orina del Horconcito comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo), n=50 y t Student P<0.05.....52

## Lista de Tablas

- Tabla 1. Genotóxicidad en células epiteliales de la mucosa bucal de la población infantil del Horconcito y de Chilpancingo Guerrero.....45
- Tabla 2. Niveles de 8-OH-dG en la orina de la población infantil del Horconcito, Taxco de Alarcón Guerrero.....49

## 1. INTRODUCCIÓN

El Pb es un elemento tóxico no esencial, bioacumulable que afecta a todos los órganos y sistemas. Más del 90% del Pb absorbido que ingresa a la sangre se une a las células del glóbulo rojo, con un tiempo promedio de permanencia de un mes (López, 2000).

La contaminación por plomo es acumulativa y cerca del 90% del plomo que ingresa se deposita en los huesos (Chiba *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001).

Se ha demostrado científicamente que el Pb induce efectos genotóxicos en poblaciones humanas expuestas, sobre todo en concentraciones que sobrepasan los  $<10\mu\text{m}/\text{dL}$ . Sus efectos adversos se deben a que se puede unir a un gran número de moléculas tales como aminoácidos, hemoglobina, enzimas, RNA, DNA entre otras, alterando muchas vías metabólicas (Armstrong *et al.*, 2002; Jarup, 2003).

Los mecanismos de defensa en el organismo no lo descomponen en otra sustancia tolerable, porque éste elemento, tiene dos electrones en el nivel 6s y puede unirse en muchos de los mismos lugares que el Zn y el K (Bruce *et al.*, 2012).

Es un elemento relativamente abundante, se encuentra en el aire, agua, suelo. Sus fuentes naturales son la erosión del suelo, el desgaste de los depósitos de los minerales y las emanaciones volcánicas. Su proporción en la corteza terrestre se aproxima 15 ppm (mg/Kg). Las aguas naturales contienen solamente trazas (Saldivar *et al.*, 1994).



Es un elemento importante debido a su amplio uso en una gran variedad de procesos industriales; su resistencia a la corrosión atmosférica y a la acción de los ácidos, especialmente al sulfúrico, hace que sea útil en la edificación, en las instalaciones de fábricas de productos químicos, en tuberías y envolturas de cables (Bruce *et al.*, 2012).

Actualmente la mayor fuente en la atmósfera es la proveniente de la gasolina que estuvo adicionada con Pb, aunque su concentración disminuye debido a que se prohibió el uso desde 1997 (Caravanos *et al.*, 2014).

Este elemento metálico puede ser un contaminante del agua, suelo y aire; y por estas vías entrar en los alimentos. En el agua potable entra a través de la corrosión de las tuberías, principalmente en aquellas en las que el agua permanece estancada por largo tiempo. Es común que ocurra cuando el agua es ligeramente ácida (Zota *et al.*, 2011).

En México son escasos los estudios en poblaciones no urbanas que consumen agua contaminada con metales pesados, por lo que es necesario realizar investigaciones sobre posibles efectos, particularmente en poblaciones infantiles expuestas ya que se estima que la absorción de este metal es cinco veces mayor en lactantes y niños pequeños debido al desarrollo cerebral incompleto y la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, sumado a un mayor flujo sanguíneo cerebral, facilitan la absorción, distribución y su depósito, afectando órganos y tejidos, aumentando ante el déficit de Ca, P, Zn, Fe, ácido ascórbico y proteínas. (Chiodo *et al.*, 2007)

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Historia del plomo

El Pb fue uno de los primeros metales que utilizó la humanidad para trabajar. Existen evidencias de su uso en el este del Asia menor desde el año 4 mil a.C. Lo emplearon tanto los egipcios como los babilonios; los fenicios explotaron minas de Pb en España desde el año 2 mil a.C. Los romanos lo usaron para la fabricación de ductos y utensilios diversos y, especialmente para el almacenamiento de vino. Durante la Edad Media fue muy usado para techar edificios públicos y catedrales. Su uso amplio y prolongado es la causa de que la intoxicación por Pb se conozca desde hace 2 mil años. En el año 370 a.C. Hipócrates relacionó por primera vez los síntomas de un hombre que extraía metales, con la exposición a Pb. Nicandro 200 a.C. asoció el cólico, la constipación, la palidez y algunas alteraciones oculares con la exposición a este metal y Plinio el viejo, en el siglo I, aseveró que la intoxicación por Pb se relacionaba con la construcción de embarcaciones (Ludivina *et al.*, 2014).

Para el siglo XV endulzaban el vino adicionándole sales de Pb, sin embargo su uso se prohibió, aunque continuó practicándose, por lo que se siguieron registrando enfermos con cólicos saturnínicos. En el siglo XVI, Paracelso describió el cuadro clínico que denominó la enfermedad del minero. Fue hasta el siglo XIX cuando Andral, Gavarret y Malassez describieron signos y síntomas importantes de su intoxicación. En 1892, Garrod detectó el incremento en la excreción de

protoporfirina en la orina en individuos expuestos crónicamente a este metal. (Saldivar *et al.*, 1994).

En 1897 fue descrita por primera vez la intoxicación en niños con pintura a base de Pb en Brisbane, Australia en 1897. Se creía que, después de una intoxicación aguda, la recuperación era completa; sin embargo, Byers y Lord refutaron esto en 1943, cuando encontraron problemas de retraso mental después de una intoxicación aguda. A raíz de la Segunda Guerra Mundial, el uso de sales orgánicas de Pb aumento de manera considerable, ya que lo usaban como antidetonante en la gasolina. Fue hasta 1970 con la fabricación de automóviles con convertidores catalíticos, que se dejó de utilizar en los combustibles (Saldivar *et al.*, 1994).

## 2.2 Características Físico-Químicas

### 2.2.1 Propiedades físicas

Es un metal de color blanco azulado, con tendencia al gris plateado, de alta densidad (11.35 g cm<sup>3</sup>) y punto de fusión bajo, cristaliza en octaedros; en estado puro es blando y maleable, poco dúctil y mal conductor de electricidad. Como muchos metales en ambientes húmedos se recubre de una capa de óxido (Saldivar *et al.*, 1994).

A continuación se presentan otras de sus propiedades físicas (Cuadro 1).

## Cuadro 1. Algunas de las propiedades físicas del Pb. (Saldivar *et al.* 1994)

Numero atómico: 82

Símbolo: Pb

Peso Atómico: 207,21

Abundancia de isotopos: 208: 52,3%, 206: 23,6%, 207: 22,6%  
204:1,5%

Solubilidad: Poco soluble en agua.

Sistema cristalino: Regular

Punto de fusión: 326,9 °C.

Estados de oxidación: +2 y +4

Punto de ebullición: 1750 °C

### 2.2.2 Propiedades químicas

Este elemento es relativamente resistente al ataque del ácido sulfúrico y del ácido clorhídrico, aunque se disuelve con lentitud en ácido nítrico y ante la presencia de bases nitrogenadas, es anfótero, ya que forma sales de Pb de los ácidos, así como sales metálicas del ácido plúmbico. Tiene la capacidad de formar muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos (Del Bosque, 2005).

Los compuestos más utilizados en la industria son los óxidos de Pb, el tetraetilo de Pb y los silicatos de Pb, además forma aleaciones con otros metales, y en general, se emplea de esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones (Saldivar *et al.*, 1994)

Al  $^{204}\text{Pb}$  se le conoce como Pb primordial, y el  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  y  $^{208}\text{Pb}$  se forman por la desintegración radioactiva de dos isótopos del uranio ( $^{235}\text{U}$  y  $^{238}\text{U}$ ) y un isótopo del torio ( $^{232}\text{Th}$ ). El  $^{210}\text{Pb}$  es radioactivo y un precursor del  $^{210}\text{Po}$  en la serie de decaimiento del  $^{238}\text{U}$  (Del Bosque, 2005).

En contacto con agua de lluvia y de CO<sub>2</sub> del aire, el Pb se altera cubriéndose de una capa de carbonato hidratado, esta sal se disuelve transfiriéndole propiedades toxicas (por esta razón no debe usarse para consumo humano); el hidrogenocarbonato, se vuelve a descomponer en CO<sub>2</sub> e hidróxido de Pb y así la reacción prosigue indefinidamente. Las soluciones de sales de Pb en reacción con el Zn, lo desplaza y forma sulfato de plomo II, esto sucede porque el Pb tiene una disolución de tensión menor que el Zn (Saldivar *et al.*, 1994).

## 2.3 Fuentes del Pb

### 2.3.1 Fuentes ambientales

Se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  %, en mayor cantidad en los estratos profundos, y en menor proporción, en la superficie. El mineral principal del Pb es la galena, del que se concentra y luego refina el Pb metálico, este mineral es muy toxico tanto por el anión (S) como por el catión. Es un constituyente natural del suelo y del polvo. Sus concentraciones normales en el suelo no contaminado está entre 10-50 mg/kg (ppm), aunque las actividades antropogénicas pueden aumentar estos niveles de 10-200 veces (Cuadro 2). El Pb atmosférico, sobre todo en las zonas urbanas, puede provenir de fuentes móviles o estacionarias aunque, como resultado de la reducción en la gasolina, los niveles han disminuido (ATSDR, 2007).

Cuadro 2. Concentraciones típicas de Pb en ambientes urbanos (Patrick, 2006).

Medio	Concentraciones típicas de Pb
Aire	0.5-2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Aire(zonas de mucho tránsito)	5-10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Agua	<1-20 $\mu\text{g}/\text{L}$
Alimentos	0.1-0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$
Suelo superficial	<100- >10 00 $\mu\text{g}/\text{g}$
Polvo en las calles	206-20 000 $\mu\text{g}/\text{g}$
Polvo en las casas	18-11 000 $\mu\text{g}/\text{g}$
Pinturas	<1- >5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

En las aguas naturales generalmente solo hay trazas de este metal. La mayor fuente son las tuberías (Archbold, 2014). En el agua estancada por corto tiempo en una tubería de Cu-Pb puede llegar a tener hasta 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  (EPA, 2006).

Por sí mismo el Pb metálico no representa un problema ambiental, este comienza cuando se disuelve en el agua sobre todo si es ácida, y pasa de forma iónica; en contraste, el agua dura contiene cationes carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que, junto con el oxígeno, forman una capa soluble de  $\text{PbCO}_3$  en la superficie, la cual evita que el metal se disuelva cuando esta pasa a través de la tubería (Patrick, 2006).

Los alimentos son otra fuente importante, los cultivos, particularmente de tubérculos y raíces comestibles, como papa, rábanos, camote y zanahorias, pueden contener cantidades importantes. La mayor parte de la contaminación de alimentos enlatados de carácter ácido se contaminan si estas se sellan con soldadura de Pb pues los productos disuelven dicha soldadura (Rubio *et al.*, 2004).

Otras fuentes pueden ser los cosméticos y los tintes de cabello cuando tienen acetato de Pb. Las pinturas que se usan para etiquetar las bolsas de plástico, también pueden contener Pb (EPA, 2006).

### 2.3.2 Fuentes ocupacionales

Además de contribuir en general a la contaminación ambiental, las fuentes ocupacionales de contaminación con Pb afectan la salud de los trabajadores. Las principales son la minería y la fundición, ya que durante el calentamiento del metal, se desprenden partículas de tamaño respirable ( $<5 \mu\text{m}$ ) que pueden llegar a muy altas concentraciones ( $200\text{-}300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) en el aire. (Cervantes *et al.*, 1999)

Otras fuentes son las industrias o artesanías que utilizan Pb como materia prima; por ejemplo, el vidriado en la alfarería, las fábricas de acumuladores, los pequeños talleres en que se reutilizan las coberturas de cables, imprentas, fábricas de pinturas y pigmentos, donde se fabrican productos de acero y tuberías, entre otros (Kasperczyk *et al.*, 2004).

### 2.3.3 Biodisponibilidad

Es biodisponible en todas sus formas químicas. El Pb metálico puede pasar a su forma iónica al ingerirse, debido al contacto con el ácido gástrico. Los compuestos orgánicos, como el tetraetilo de Pb, se absorben a través de la piel aunque se tiene poco conocimiento sobre esta vía (ATDSR, 2005).

## 2.4 Toxicocinética

### 2.4.1 Absorción.

Hay tres principales vías de entrada; gastrointestinal, respiratoria y cutánea. La más importante es la gastrointestinal. La absorción por esta vía, no solo depende de la biodisponibilidad del compuesto, sino de otros factores como el vaciado gástrico, la motilidad gastrointestinal, el pH gástrico, la interacción del compuesto con otros componentes del tracto gastrointestinal, factores dietéticos, y en general, el ambiente químico del lumen gastrointestinal (EPA, 2006).

Por vía inhalatoria, se deposita en el tracto respiratorio, la tasa de inhalación depende del tamaño de la partícula, la solubilidad del compuesto, la tasa de ventilación, la presencia de alguna patología, así como el daño a la mucosa y a los alveolos por el hábito de fumar facilita su paso hacia la sangre, con una proporción entre 16 y 40  $\mu\text{g}/\text{diarios}$  para un adulto y de 8 a 20  $\mu\text{g}/\text{diario}$  para niños. Se calcula que una concentración de  $1/\mu\text{g}/\text{mg}/\text{m}^3$  de Pb en el aire inhalado está asociada con una concentración en sangre 1 a 2  $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$  (ATDSR, 2005).

La absorción por la piel solo tiene importancia en el contacto con compuestos orgánicos, aunque existe poca información en relación con esta vía de ingreso (Larese *et al.*, 2006)

### 2.4.2 Distribución

Depende esencialmente de la tasa de liberación sanguínea al resto de los órganos y tejidos, se distribuye de manera dispersa entre los diferentes compartimientos.



Este metal se transporta por la sangre y se distribuye uniformemente en todos los tejidos y órganos (Amarasiriwardena, 2011).

La transferencia placentaria de Pb en humanos se demuestra por su presencia en sangre de cordón umbilical. Los mecanismos de transporte a la placenta no están bien definidos, aunque pruebas de que el transporte del metal ocurre por difusión simple de la circulación materna a la fetal (Polanska *et al.*, 2014).

#### 2.4.3 Depósito.

Principalmente se deposita en los huesos, ya que aproximadamente el 90% de la concentración corporal total se encuentra en este tejido. Otros tejidos lo concentran en menor proporción; por ejemplo, se ha encontrado que las concentraciones en hígado son 1 mg/Kg, en tanto que en la corteza y la médula renal son 0.8 mg/Kg y 0.5 mg/Kg, respectivamente. En la sangre, se encuentra principalmente en los eritrocitos donde su concentración es aproximadamente 16 veces más alta que en el plasma (Gurer *et al.*, 2004).

En los adultos el 94% aproximado de la carga total se deposita en el esqueleto, y en los niños, solo el 73 % (Murata *et al.*, 2008). Este almacén en adultos puede servir para mantener los niveles sanguíneos de Pb elevados (<10µg/dL) mucho después de que ha cesado la exposición. Las mayores concentraciones en tejidos blandos obtenidos de autopsias se han detectado en riñón, bazo y pulmón (ATSDR, 2007).

## 2.4.4 Eliminación

Alrededor del 90% del plomo que fue ingerido y que no se absorbió se elimina en las heces (Fig. 1). Del total absorbido, el 76% aproximadamente se excreta por la orina, el resto se elimina a través del cabello o sudor. Las secreciones pancreáticas y biliares contribuyen a la excreción fecal. El Pb también se elimina en la leche materna en concentraciones de hasta 12 mg/L (ATSDR, 2005).

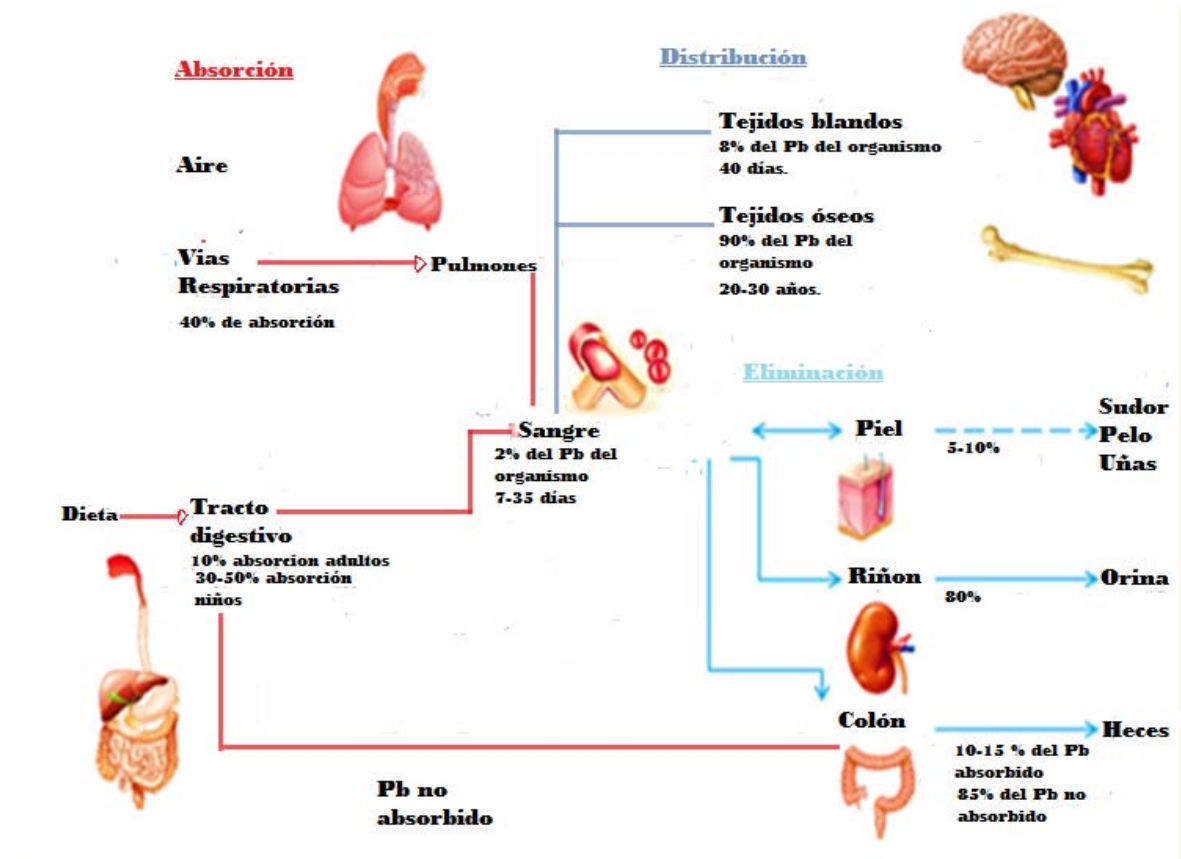


Figura 1. Toxicocinética del plomo (Modificado de Ramírez, 2005). Se muestran las vías de absorción, distribución, depósito y eliminación del Pb.

#### 2.4.5 Interacciones del plomo con otros elementos

La Toxicocinética del Pb puede ser afectada por su interacción con elementos esenciales y con nutrientes. En niños de 1-6 años, el contenido de Pb en sangre se correlaciona indirectamente con la ingesta de Ca. En niños con concentraciones de 60 µg/dL de Pb en sangre, la absorción de Ca y vitamina D fue menor (WHO, 2010).

También se ha postulado que el Cu, Fe y Zn afectan la absorción de Pb (Cosins *et al.*, 2000). El Zn parece ser un elemento importante en el sistema de la deshidratación de ácido δ- aminolevulinico y por tanto, puede tener un papel protector en la intoxicación por este metal, revirtiendo los efectos de la inhibición de la deshidratasa. La ingesta de Fe, fibra y tiamina se ha correlacionado inversamente con los niveles de concentración de Pb sanguíneo en trabajadores de la industria del acero (ATSDR, 2005).

*In vitro* se ha demostrado que el Zn y el Cd son antagonistas de los efectos inhibitorios de Pb. En individuos que han muerto a causa de problemas cardíacos, se ha encontrado que el Cd y Pb tienen efecto aditivo para este tipo de problemas (Wasowicz *et al.*, 2001).

#### 2.5 Efectos tóxicos del Pb

##### 2.5.1. En el cuerpo humano

El plomo puede causar varios efectos no deseados como:

- a) Perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia.
- b) Incremento de la presión sanguínea.
- c) Daño a cerebro, riñones y sistema sanguíneo.
- d) Abortos espontáneos.
- e) Disminución de la fertilidad en hombres a través de alteraciones en los espermatozoides (Rafael *et al.*, 2003).
- f) Reducción de las habilidades de aprendizaje y memoria en los niños, así como cambios en el comportamiento, como agresión, hiperactividad, ansiedad e hipersensibilidad (Baghurst *et al.*, 1992).
- h) Alteraciones en el equilibrio y percepción.
- i) Formación de depósitos plúmbicos en las encías de color gris claro azulado llamada "la línea del plomo" o "la línea de Burton".
- k) El Pb puede entrar en el feto a través de la placenta y causar alteraciones graves en el sistema nervioso (Polańska, 2014).

#### 2.5.1.1 Efectos neurológicos

Generalmente se acepta que la encefalopatía se presenta en adultos a niveles de concentración de 100 a 200 µg/dL y en niños a niveles de 80 µg/dL. Esta condición puede ocasionar la muerte o la pérdida permanente del conocimiento, principalmente en niños, lo que representa un incremento en la incidencia de desajuste psicológico y neurológico (HHS, 2012).

### 2.5.1.2 Efectos hematológicos

En el sistema hematopoyético, el Pb tiene una acción tóxica sobre los eritrocitos y la síntesis de hemoglobina; esto causa anemia hipocrómica y reduce la producción de eritrocitos y su vida media; esto último se debe al incremento en la fragilidad de la membrana eritrocitaria y a su ruptura, así como a la acción tóxica del metal sobre los precursores del eritrocito en la medula ósea (Ahamed, 2007).

Las principales reacciones que el Pb inhibe en la síntesis del hemo son:

- a) La transferencia del ácido  $\delta$ - aminolevulínico ( $\delta$  ALA) en porfobilinógeno, que es catalizada por la deshidratasa del ácido  $\delta$ - aminolevulínico ( $\delta$  ALAD).
- b) La inserción de Fe en la protoporfirina, que es catalizada por las ferroquelasa.
- c) La inhibición de las sintetasa del  $\delta$  ALA y la coproginasas, y la deshidratasa del  $\delta$  ALA, lo que causa la acumulación en la sangre de  $\delta$  ALA y coproporfirina, que se eliminaran por orina.
- d) Bloqueo mitocondrico que ocurre a través de dos mecanismos: la inhibición del transporte del Fe a través de la membrana y la acción directa sobre la ferroquelatasa (Ahamed, 2007).

### 2.5.1.2 Efectos cardiovasculares

La evidencia ocupacional, clínica y de estudios en poblaciones sugiere que el plomo afecta el sistema cardiovascular. A niveles sanguíneos altos (40-100  $\mu\text{g/dL}$ ) produce lesiones cardiacas y anormalidades en el electro-cardiograma. En adultos

existen pruebas de que el incremento de Pb en sangre produce ligero aumento de la presión arterial (De Flora *et al.*, 1989).

#### 2.5.1.3 Efectos Renales

En los trabajadores, la exposición al Pb se asocia a nefropatía, en niveles de concentración en sangre estén entre 40-100 µg/dL. Entre las características de esta nefropatía están: la inclusión de cuerpos nucleares, cambios mitocondriales y citomegalia de las células epiteliales del tubo proximal, así como disfunción de los túbulos proximales (Anemia de Fanconi) que se manifiesta por aminoaciduria, glucosuria, fosfaturia con hipofosfatemia e incremento de sodio con decremento en la excreción del ácido úrico (Palus *et al.*, 2003).

#### 2.5.1.4 Carcinogénesis

No existe suficiente evidencia de la carcinogenicidad del Pb en humanos, sin embargo la IARC lo ubicó en 1989 en el grupo 2B, como posible carcinógeno para la humanidad (IARC, 2006).

#### 2.5.1.5 Teratogénesis

En la actualidad no se tiene una conclusión definitiva sobre la asociación entre la exposición prenatal a Pb y la inducción de malformación congénita en humanos. En ratas y ratones expuestos a Pb no hay evidencia de teratogenicidad, sin embargo, en algunos estudios en los que se administraron sales de Pb por vía intraperitoneal, como acetato, nitrato y cloruro, se observó que causa productos de bajo peso (Jabeen, 2010).

#### 2.5.1.6 Efectos sobre la reproducción

A concentraciones altas (40-100  $\mu\text{g/dL}$ ), el Pb tiene efectos adversos en la reproducción humana a niveles continuos en sangre de 40-50  $\mu\text{g/dL}$  afecta a los espermatozoides en los hombres ya que disminuye el número (densidad) de estos (EPA, 2006).

#### 2.5.1.7 Poblaciones de alto riesgo.

Conforme a la EPA, por exposición a este metal, las poblaciones de alto riesgo son los lactantes, preescolares, fetos, mujeres y embarazadas y en estado de lactancia, poblaciones que viven cerca de industrias en las que se utiliza plomo, personas con enfermedades neurológicas o deficiencias nutricionales, principalmente de Ca, Fe, P y proteína, alcohólicos y fumadores (EPA, 2006).

### 2.5.2 Efectos en el ambiente

#### 2.5.2.1 En el medio abiótico

Las sales de Pb se liberan al ambiente a través de los tubos de escape de los coches, camiones, motos, aviones, barcos y aerodeslizadores y casi todos los tipos de vehículos motorizados que utilicen derivados del petróleo como combustible, siendo las partículas de mayor tamaño las que quedarán retenidas en el suelo y en las aguas superficiales, una vez que el plomo ha llegado al suelo permanece indefinidamente y solo una pequeña parte es transportada por la lluvia (Patrick, 2006).

Se debe considerar al suelo como uno de los principales depósitos de este contaminante provocando su acumulación en los animales con la posibilidad de llegar hasta a la población humana a través de la cadena alimentaria (Tiradon, 2005).

En el suelo las concentraciones de este elemento varían de 2 a 200  $\mu\text{g/g}$  peso seco mientras que en suelos urbanos, la concentración llega a ser extremadamente elevada. En las calles urbanas, de carreteras, industrias o de fundidoras llega a concentrarse de 1 600-2 400  $\mu\text{g/g}$ . La concentración en suelo depende de la cantidad de Pb emitido, del tipo de vegetación, de las condiciones atmosféricas, del viento, la lluvia, así como de otros factores como la distancia a la fuente de contaminación y la profundidad del suelo (Allen-Gil, 1997).

Otro efecto significativo del Pb en las aguas superficiales, es que provoca perturbaciones en el fitoplancton, que es una fuente importante de producción de oxígeno en los océanos y de alimento para algunos organismos acuáticos (Rubio *et al.*, 2004).

#### 2.5.2.1 Efectos en el medio biótico.

Diversos estudios han mostrado que el Pb produce diversos efectos tóxicos en los organismos. En concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/mL, retarda la degradación de la materia orgánica. Las plantas que crecen en suelos contaminados por el Pb tienden a concentrarlo sobre todo en su sistema radicular (Díaz, 2006).

Algunos animales, como las lombrices tienden a acumular Pb y pueden ser una de las rutas por las que este elemento entra a las cadenas alimentarias. La



acumulación en los animales como en mamíferos puede causar graves efectos en su salud por envenenamiento, e incluso la muerte por paro cardio-respiratorio. (Järup, 2003).

## 2.6 Biomarcadores de genotoxicidad.

Los biomarcadores son variables que indican un determinado momento en el proceso conducente a una enfermedad. Tienen especial interés en la evaluación de enfermedades progresivas donde los síntomas se manifiestan tras un largo periodo de exposición a agentes genotóxicos. En general los biomarcadores se clasifican en tres grupos: de exposición, efecto o susceptibilidad (Cook *et al.*, 2008).

Los biomarcadores de efecto, miden las acciones biológicas tempranas, es decir, alteraciones moleculares, celulares y bioquímicas que se presentan antes de que exista o se manifiesten las alteraciones clínicas, los cuales pueden ser por daño oxidante y capacidad antioxidante, y alteraciones genéticas. Existen diferentes tipos de técnicas utilizadas como biomarcadores de efecto temprano en poblaciones humanas tales como los intercambio de cromátidas hermanas (ICH), micronúcleos, aberraciones cromosómicas, microRNAs, microarreglos, aductos de ADN entre otras (Autrup *et al.*, 1999).

Los biomarcadores de exposición permiten la medida de la dosis interna mediante el análisis químico del compuesto tóxico o un metabolito del mismo en fluidos corporales; los biomarcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de la

respuesta individual frente a la agresión de un tóxico o grupo de tóxicos (Gil, 2001).

En los últimos años estas técnicas han tomado gran relevancia, como consecuencia del gran número de agentes que alteran el material genético, que directamente o indirectamente pueden afectar a las poblaciones humanas en sitios contaminados.

### 2.6.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG)

Dentro de los biomarcadores de estrés oxidante por metales pesados, la 8-OH-dG (Fig. 2), es el mejor biomarcador molecular de daño oxidante al ADN, esta base oxidada, es un marcador de predicción temprana de desarrollo de diversas enfermedades (Bogdanov *et al.*, 1999).

La 8-OH-dG, representa el 5 % del total de bases oxidadas del ADN se genera por acción del radical  $\bullet\text{OH}$  sobre la base guanina (Fan *et al.*, 2012). Es un premutágeno, que causa transversiones de *G*- a *T* (Cheng *et al.*, 1992).

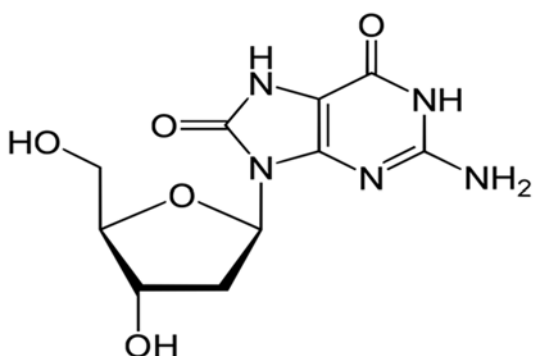


Figura 2. Estructura química de 8-OH-dG (Valavadini, 2011).

El incremento en los niveles de la 8-OH-dG están asociados al desarrollo diversas enfermedades, tumores y cáncer (Cook *et al.*, 2000; 2008). Existen diversos métodos para cuantificar, identificar y detectar 8-OH-dG en ADN, en muestras de orina y suero sanguíneo producidos por contaminantes ambientales, los más usados son los métodos cromatográficos (HPLC-EM) y los inmunoensayos basados con anticuerpos mono y policlonales como inmunohistoquímica y ELISA (Santella, 1999; Shimoi *et al.*, 2002; Breton *et al.*, 2003).

Actualmente este ensayo tiene grandes ventajas como: tener gran sensibilidad, exactitud y poca variación en los análisis, a diferencia de los métodos cromatográficos; los inmunoensayos son más rápidos, menos caros, fáciles de llevar cabo, el análisis es con mayor número de muestras, no requieren de equipos muy sofisticados ni el uso de radioisótopos (Shimoi *et al* 2002; Chiou *et al.*, 2003; Rodríguez Romero *et al.* 2012).

Recientemente, se ha obtenido buen consenso y correlación entre los valores del 8-OH-dG en la orina detectado por ELISA. La evaluación de los niveles en orina tanto *in vivo* como *in vitro* de este ensayo ha sido validado, aceptado y comparado su sensibilidad con los métodos cromatográficos, además los valores basales son muy similares con los obtenidos en diferentes laboratorios (Evans *et al.*, 1999, Chiou *et al.* 2003; Breton *et al.*, 2003).

#### 2.6.2 Ensayo cometa alcalino.

El ensayo cometa alcalino es un método que permite evaluar a las células de manera individual para evidenciar rompimientos de una o doble cadena del ADN,

es la prueba más utilizada tanto in vivo como in vitro debido a la sensibilidad, reproducibilidad, rapidez con la que se realiza con cualquier tipo celular y por requerir poca cantidad de células interfásicas (Cofiño, 2007).

Los resultados de la electroforesis unicelular alcalina permite identificar daño directo sobre el ADN, que es visible y medible bajo un microscopio de fluorescencia, se basa en que ADN fragmentado adquiere una carga neta que le permite migrar hacia el ánodo de un campo eléctrico y dependiendo del tamaño de los fragmentos, sus velocidades serán diferentes, de esta manera se puede observar la fragmentación del ADN con la forma de un cometa, donde la cabeza es el núcleo y la cola el ADN fragmentado (Figuras 3 y 4). La longitud y la intensidad de la cola dependen del número de lesiones que se han producido por agentes genotóxicos (Kassie *et al.*, 2000).

Asimismo, esta técnica ha sido utilizada con gran éxito para detectar efectos genotóxicos de metales pesados sobre la biota por lo que es usado en biomonitoreo ambiental. En relación al ensayo cometa solamente un número limitado de estudios lo han empleado para evaluar el efecto de metales pesados en poblaciones expuestas. Se utilizan células de descamación del epitelio bucal por ser una forma no invasiva e indolora para la toma de muestras (Singh *et al.*, 2005).

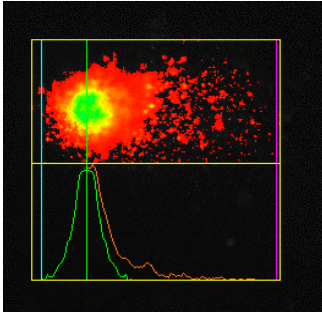


Figura 3. Núcleo con moderado daño al ADN o con poca fragmentación del ADN de la célula epitelial de la mucosa bucal (Calderón, 2014). Imagen vista en el microscopio en la cual se evidencia fragmentación moderada en el DNA en célula epitelial de la mucosa bucal, el nucleo esta representado con fluorescencia color verde, el arrastre provocado por electroforesis genera una figura similar a un cometa (color rojo) debido a la fragmentación del DNA.

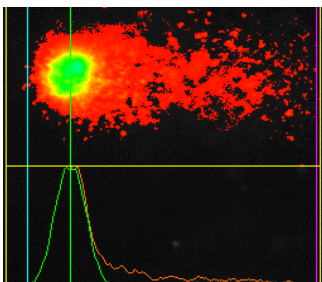


Figura 4.. Núcleo con severo daño al ADN o con gran fragmentación del ADN en la célula epitelial de la mucosa bucal. (Calderon, 2014). Imagen vista en el microscopio en la cual se evidencia severa fragmentación en el DNA en una célula epitelial de la mucosa bucal, el nucleo esta representado con fluorescencia color verde, el arrastre provocado por electroforesis genera una figura similar a un cometa (color rojo) debido a la fragmentación del DNA.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios científicos demuestran que concentraciones bajas ( $<10\mu\text{g/dL}$ ) de Pb en el organismo pueden causar daño en diversos tejidos biológicos tales como nervioso, sanguíneo, óseo, así como provocar inteligencia reducida, déficit de aprendizaje y dificultad para concentrarse; también se ha reportado que la exposición durante la niñez puede alterar la secreción de la hormona del crecimiento, impidiendo el desarrollo e incrementando la tendencia a la obesidad. En raros casos, niños con altas concentraciones en sangre ( $150\ \mu\text{g/dL}$ ) pueden morir de encefalopatía o daño masivo del cerebro. En la comunidad del Horconcito, Guerrero la población se encuentra expuesta a Pb por consumo de agua. En México son escasos los estudios genotóxicos en poblaciones no urbanas que consumen agua contaminada con Pb, siendo los niños más susceptibles ya que se estima que la absorción de este metal es cinco veces mayor en lactantes y niños pequeños, y aumenta ante el déficit de Ca, P, Zn, Fe, ácido ascórbico y proteínas

Por las razones expuestas es necesario hacer estudios sobre posibles efectos en poblaciones infantiles expuestas, sobre todo en zonas no urbanas. Ya que la ausencia de información con respecto al efecto de la ingesta de plomo limita el desarrollo de estrategias que puedan dar solución al problema. Realizar estudios genotóxicos en poblaciones representa el primer paso para el desarrollo de una estrategia integral que proteja a las poblaciones.

#### **4. HIPOTESIS**

La población del Horconcito, Guerrero está expuesta a la ingesta de plomo por contaminación del agua; se conocen los efectos tóxicos del plomo en las células y tejidos, siendo los niños más susceptibles, por lo anterior se evidenciarán lesiones en el ADN en células de la mucosa bucal; así como aumento en los niveles de 8-OH-dG en muestras de orina en niños expuestos a este metal, en comparación con un grupo control.

## 5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto genotóxico en células del epitelio bucal y los niveles de 8-OH-dG en muestras de orina en la población infantil expuesta a plomo por el consumo de agua en el Horconcito, Guerrero.

Objetivos particulares:

- Estimar el daño en el ADN en células del epitelio bucal en las poblaciones infantiles del Horconcito Guerrero, Ciudad de Chilpancingo así como de la Ciudad de México, mediante la técnica de Ensayo Cometa Alcalino cuantificando tres parámetros: frecuencia de cometas, la longitud de la cauda y el momento de la cauda.
- Determinar los niveles de 8-OH-dG en muestras de orina de las poblaciones infantiles del Horconcito Guerrero y de la Ciudad de Chilpancingo.



## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Zona de estudio.

Horconcito se encuentra en la parte de noreste del estado de Guerrero; se localiza entre las coordenadas geográficas  $18^{\circ} 32.5'$ ,  $-18^{\circ} 35'$ , de latitud Norte y  $99^{\circ} 42.5'$ ,  $-99^{\circ} 45'$ , de longitud oeste, en una porción de  $8 \text{ Km}^2$ . La distancia entre la cabecera municipal de Taxco de Alarcón y el poblado del Horconcito es de 27 km (Fig 6). Las altitudes del área de estudio varía entre 1, 300-2, 540 msnm y la máxima elevación corresponde al cerro Tepatule, sin ninguna actividad industrial en sus cercanías; sin embargo los niveles elevados de plomo se encuentran de forma natural en la roca. Se realizó un estudio de biomonitoreo genotóxico en niños de edades 2-12 años (Gama *et al.*, 2010).



Figura 5. Ubicación del Horconcito, Guerrero.

### 6.2 Selección de la población infantil

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, aprobó los procedimientos de esta investigación genética y se consideraron los criterios de la Declaración de Helsinki (2008). Antes de iniciar

este estudio se obtuvieron cartas de consentimiento informado de los padres de todos los niños participantes del Horconcito (grupo expuesto), de Chilpancingo (grupo de referencia) y de la Ciudad de México (grupo de referencia positivo). Los padres de todos los niños incluidos, contestaron un cuestionario para obtener información sobre la historia clínica de enfermedades, exámenes médicos, hábitos, tratamientos médicos y dentales, tipo de dieta, exposición a rayos X, y años de vivir en las zonas de estudio. Se excluyeron de este estudio a los niños con enfermedades cardiovasculares, respiratorias y que estuvieron usando algún tipo de medicamento. Los grupos infantiles del Horconcito y de Chilpancingo fueron de 50 niños, el grupo infantil de la Ciudad de México fue de 30 niños; los cuales se agruparon en rangos de edades de 2-4; 5-7; 8-10; y de 11-12 años.

### 6.3 Ensayo cometa alcalino

Se realizó el ensayo cometa alcalino de acuerdo a los métodos de Singh *et al.* (1988) y Calderón Segura *et al.* (2007). Las muestras de la mucosa bucal de cada niño se obtuvieron con una cucharita estéril se transfirió a un microtubo estéril con suero fisiológico; se mezclaron y se le agregaron 90  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (0.5 % LMPA, Gibco) a 37 °C, posteriormente, se colocaron 100  $\mu$ L de la mezcla en portaobjetos esmerilados con una monocapa de agarosa normal (NMA 1% Gibco); se elaboraron dos laminillas por muestra. Posteriormente los portaobjetos con las células se colocaron en solución de lisis final recién preparada (2.5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Trizma-base pH 10), aforada a 100 ml con Tritón 1% X-100 y DMSO 10% en vasos couplin a 4°C por 1 h. Posteriormente, los geles se colocaron en la cámara de electroforesis

(Thermoscientific) con amortiguador de electroforesis alcalino frío [NaOH (300 mM) + 1 mM de EDTA] a pH 13.0 (para desenrollar el ADN) a temperatura ambiente por 20 min en oscuridad, la electroforesis se realizó a 300 mA y 25 Volts durante 20 min. A continuación los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante Tris (0.4 M pH 7.5) por 5 min. Después de la neutralización para fijar los geles, se dejaron en metanol absoluto frío por 10 min, finalizado este tiempo, las laminillas se dejaron secar por completo y se mantuvieron en cajas para su observación.

Para estimar el efecto genotóxico en las células del epitelio bucal de las poblaciones infantiles del grupo expuesto, de referencia y referencia positivo se le agregaron 50  $\mu$ L de Gel Red (10 %) y se cuantificaran los siguientes parámetros indicadores del daño al ADN: a) la frecuencia de cometas, b) la longitud de la cauda (migración del ADN,  $\mu$ m), y c) el momento de la cauda del cometa. La evaluación se hizo en 100 núcleos consecutivos (50 núcleos por laminilla) usando el programa Comet IV integrado en el microscopio de fluorescencia Carl Zeiss modelo Axiostar Plus H-BO-100, a 40X con filtros de excitación de 515-560 nm y de barrera de 590 nm (Speit *et al.*, 2005).

#### 6.4 Evaluación de los niveles de 8-OH-dG en la orina por ELISA

Se obtuvieron muestras de la primera orina de la mañana de los niños del grupo expuesto (n=50), el grupo de referencia(n=50) en contenedores estériles, se almaceno a -20 °C para analizar 8-OH-dG por ELISA. Se usó 100  $\mu$ l de orina de cada niño y el Kit 8-OH-dG-orina (ENZO, Life Sciences Assay, USA) para ELISA,

siguiendo los pasos del protocolo indicado por los fabricantes. Paralelamente se realizó la curva estándar de 8-OH-dG. La placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISA (ELx800 BioTec), usando el programa Gen 5 ELISA. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  de creatinina y con un límite de detección de 0.59 ng/ml (Rodríguez-Romero *et al.*, 2012).

### 6.5 Análisis estadísticos

Los resultados de la frecuencia de cometas, de la longitud de la cauda y del momento de la cauda, así como de 8-OH-dG en la orina se reportan como media  $\pm$  error estándar ( $\bar{x} \pm \text{E.E.}$ ). Se realizó ANOVA y t-Student para determinar las diferencias entre las poblaciones infantiles (grupos expuestos y no expuestos al Pb). Para la frecuencia de cometas se utilizó una chi cuadrada para saber si existe relación entre el sexo y la edad de las poblaciones infantiles respecto a los parámetros de daño ADN y MANOVA para encontrar diferencias significativas entre las poblaciones expuestas y los parámetros analizados, el nivel de significancia fue de  $\alpha = 0.05$ . Los análisis estadísticos se efectuaron en el programa Prisma VI.

## 7. RESULTADOS

Se analizaron en total 260 muestras del epitelio de la mucosa oral y 200 de orina ya que se realizaron por duplicado; las cuales corresponden al grupo de niños del poblado del Horconcito, Guerrero (n=50), de la Ciudad de México (n=30) y de la Ciudad de Chilpancingo (n=50).

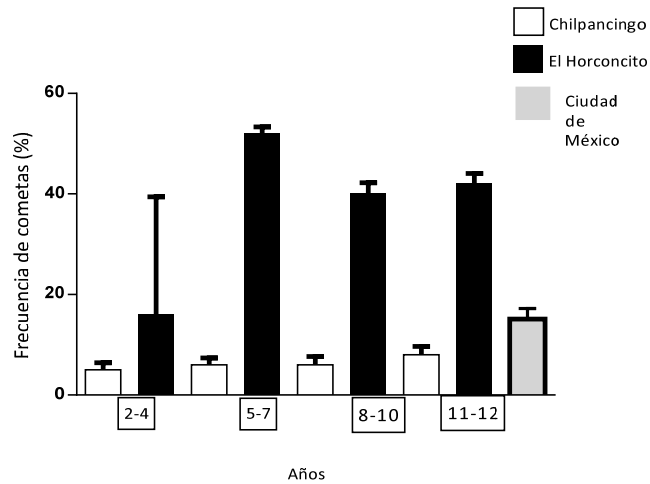
### 7.1 Genotóxicidad en epitelio de la mucosa bucal

Los resultados del análisis genotóxico en epitelio de la mucosa bucal de los niños del Horconcito se muestran en la tabla 1. Se encontró incremento significativo en la frecuencia de cometas  $25.0 \pm 10.07$  en la longitud  $52.63 \pm 2.28$  y en el momento de la cauda  $7.77 \pm 4.22$  en comparación con los valores de la población del sitio de referencia (Chilpancingo)  $8.0 \pm 1.52$  en la frecuencia de cometas,  $14.44 \pm 1.0$  en la longitud, y  $21.09 \pm 2.21$  en el momento de la cauda ( $p < 0.05$ ) (Figuras 5-8) y de la población de referencia positivo (CdMx)  $15.14 \pm 2.082$  en la frecuencia de cometas,  $32.520 \pm 1.694$  en la longitud de la cauda y  $3.710 \pm 0.4353$  para el momento de la cauda (Grafica 1, 2 y 3).

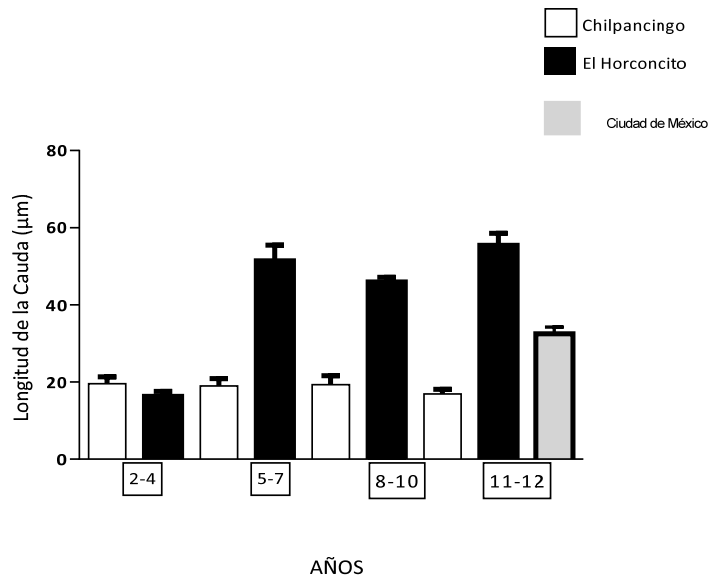
Tabla 1. Genotóxicidad en células epiteliales de la mucosa bucal de la población infantil del Horconcito, Chilpancingo Guerrero y de la Ciudad de México. (\*P< 0.05, \*\*P< 0.01 t-student. H= Horconcito y C= Chilpancingo).

<b>Rangos de edades (años)</b>	<b>Población Infantil</b>	<b>n</b>	<b>Frecuencia cometas Media ± DS</b>	<b>Longitud de la cauda Media ± DS</b>	<b>Momento de la cauda Media ± DS</b>
	Horconcito	50	25.0 ± 10.07*	52.63 ± 2.28**	7.77 ± 4.22**
	Chilpancingo	50	8.0 ± 1.52	14.44 ± 1.02	1.09 ± 2.21
	Ciudad de Mex.	30	15.14 ± 2.082	32.52 ± 1.694	3.71 ± 0.4353
<b>2-4</b>	H	6	16.0 ± 23.40*	16.32 ± 1.22*	6.44 ± 1.02**
	C	6	5.0 ± 1.44	19.56 ± 1.78	0.91 ± 2.3
<b>5-7</b>	H	14	52.0 ± 1.31**	51.41 ± 4.08**	4.94 ± 2.64**
	C	14	6.0 ± 1.38	18.99 ± 1.88	1.58 ± 2.77
<b>8-10</b>	H	12	40.0 ± 2.23**	45.99 ± 1.20	7.77 ± 3.88**
	C	12	6.0 ± 1.66	19.33 ± 2.33	1.16 ± 2.65
<b>11-12</b>	H	12	42.0 ± 2.1**	55.44 ± 3.10	7.25 ± 4.55**
	C	12	8.0 ± 1.66	16.89 ± 1.23	1.86 ± 2.65

En la comparación de daño genético por rangos de edad se observó que los niños del Horconcito muestran diferencias significativas en el momento de la cauda con respecto al rango de edad ( $p < 0.05$ ). Los niños de edades de 8 a 10 años mostraron aumento significativo en los promedios del momento de la cauda ( $7.77 \pm 3.88$ ) y los niños en los rangos de edades de 5-7 en la longitud de la cauda ( $51.41 \pm 4.08$ ). En los rangos de edades de 5-7, 8-10 y 11-12 de la población del Horconcito mostró incremento significativo con respecto a la longitud y con el momento de la cauda del cometa ( $p \leq 0.01$ ) con relación al grupo de referencia.

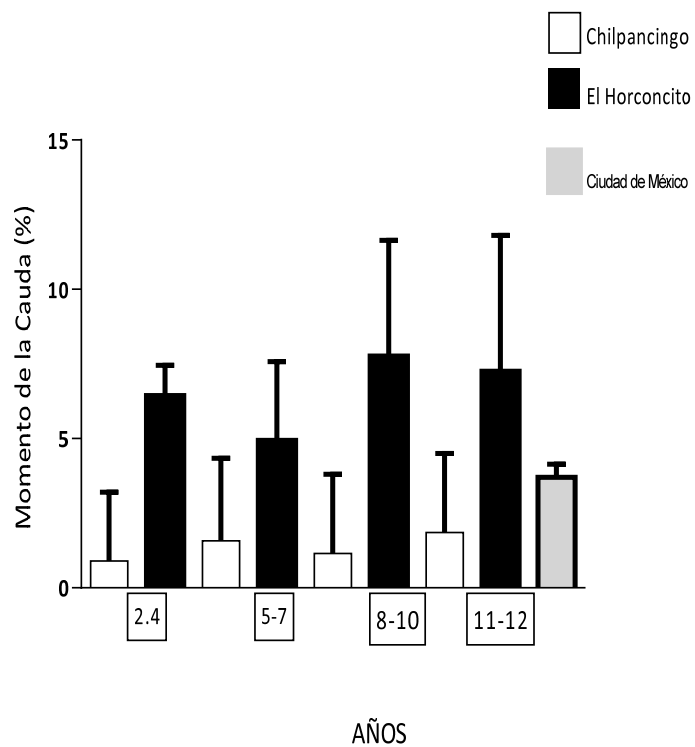


Gráfica 1. Frecuencia de cometas del Horconcito comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo) por rango de edad (n=50), y referencia positiva (CdMx, n=30), t Student  $P < 0.05$ . Se observa la barra (negra) que representa los datos obtenidos para la población del Horconcito muestran que son superiores particularmente para el rango de edad de los 5-7 años. A diferencia de lo observado en el grupo de Chilpancingo (barra blanca) y de la Ciudad de México (barra gris).



Gráfica 2. Longitud de la cauda de la población del Horconcito n= 50 comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo) n=50 y de referencia positivo (CdMx) n=30, t Student  $P < 0.01$ . Se observa la barra (negra) que representa los datos obtenidos para la población del Horconcito muestra que son superiores particularmente para el rango de edad de los 11-12 años, comparado con el grupo de Chilpancingo (barra blanca). La Ciudad de México (barra gris) también presenta diferencia significativa comparada con el grupo control.





Gráfica 3. Momento de la cauda de la población del Horconcito comparado con el grupo de referencia (Chilpancingo). n=50 y de referencia positivo (CdMx) n=30, por rango de edad, t Student  $P < 0.01$ . Se observa la barra (negra) que representa los datos obtenidos para la población del Horconcito muestra que son superiores particularmente para el rango de edad de los 8-10 años, comparado con el grupo de Chilpancingo (barra blanca). La Ciudad de México (barra gris) también presenta diferencia comparado con el grupo control.

Se realizó una Chi cuadrada para comprobar si existe relación entre los tres parámetros de la población expuesta (Horconcito), con los valores del sitio de referencia (Chilpancingo) respecto a la edad y al sexo, con esta prueba se observó que la frecuencia de cometas se encuentra relacionada con la edad. Los niños de edades de 5-7 años muestran aumento significativo en la frecuencia de cometas (núcleos con fragmentación en el ADN) ( $p < 0.05$ ), que los de la población de referencia ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5) y referencia positivo. Sin embargo, no se encontró relación entre la frecuencia de cometas y el sexo ( $p < 0.05$ ). Los resultados arrojaron que el género no influye en los valores de los parámetros medidos en los cometas ( $p < 0.05$ ). Se comprobó que en el poblado del Horconcito, los niños presentan valores elevados en la longitud de la cauda y en el momento de la cauda del cometa respecto al sitio de referencia (Chilpancingo) ( $p < 0.01$ ) (Grafica 2 y 3) (Tabla 1).

Se realizó la prueba estadística t-Student en cada población para buscar diferencias entre género respecto a la longitud y momento de la cauda del cometa ( $p < 0.01$ ). El grupo de referencia difiere significativamente de la población expuesta ( $p < 0.01$ ), todos los niños muestran niveles basales que están dentro de los reportados para las poblaciones infantiles sin exposición a contaminantes ambientales (Brito, 2012; Salinas, 2012).

Se analizó la relación de las variables edad y sexo respecto a los parámetros longitud y momento de la cauda de cada población, la población del Horconcito presenta relación entre la variable tiempo y los parámetros medidos relacionados al daño de ADN ( $p < 0.05$ ). Así mismo, en la población de referencia (Chilpancingo)

no se observó ninguna relación con los parámetros medidos ni interacción entre las variables edad y sexo ( $p < 0.05$ ). Los niños de la Ciudad de México mostraron aumento significativo en la frecuencia de cometas  $13.00 \pm 2.082$ , en la longitud  $31.07 \pm 1.694$  y en el momento de la cauda  $3.100 \pm 0.4353$ , en comparación con los valores de la población testigo (Chilpancingo  $p < 5$ ).

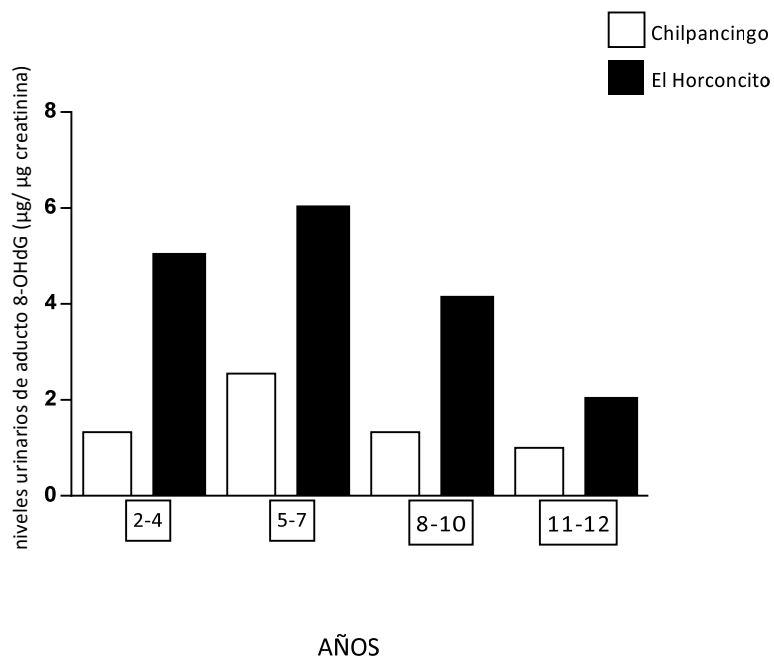
## 7.2 Niveles de 8-OH-dG por ELISA

Los resultados obtenidos en los niveles de 8-OH-dG en la orina por ELISA muestran que la población del Horconcito presenta aumento significativo ( $3.78 \pm 1.80$ ) respecto a la población de referencia ( $1.0 \pm 0.082$  ng/mL) ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de 8-OH-dG en muestras de orina de la población infantil del Horconcito, Taxco de Alarcón Guerrero. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 t-student. H= Horconcito y C= Chilpancingo.

Rangos de edades (años)	Población Infantil	N	Media $\pm$ DS
	Horconcito	50	$3.78 \pm 1.80^{**}$
	Chilpancingo	50	$1.0 \pm 0.82$
<b>2-4</b>	C	6	$1.33 \pm 0.94^{**}$
	H	6	$5.0 \pm 1.44$
<b>5-7</b>	C	14	$2.55 \pm 1.31^{**}$
	H	14	$6.0 \pm 1.38$
<b>8-10</b>	C	12	$4.11 \pm 2.23^{**}$
	H	12	$1.33 \pm 1.66$
<b>10-12</b>	C	12	$2.0 \pm 2.1^{**}$
	H	12	$8.0 \pm 1.66$

Se compararon los niveles de 8-OH-dG para cada rango de edad de cada población y se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), los niños del rango de edad de 5-7 años fue el grupo que mostró diferencias significativas en los niveles de 8-OH-dG seguido del rango de niños 2-4 años (Gráfica 4).



Gráfica 4. Niveles de 8-OH-dG en muestras de orina de las poblaciones infantiles del Horconcito comparado con el grupo infantil testigo Chilpancingo, por rango de edad (n=50), t Student  $P < 0.05$ . Se observa la barra (negra) que representa los datos obtenidos para la población del Horconcito muestra que son superiores los niveles de 8-OH-dG particularmente para el rango de edad de los 5-7 años, comparado con el grupo de Chilpancingo (barra blanca).

## 8. DISCUSIÓN

Los rocas de manera natural contienen diversos metales como el plomo que se transportan a las comunidades vecinas por el aire, el agua o el suelo; en este proceso pueden contaminar los alimentos vegetales y animales (Oyoo-Okoth *et al.*, 2012). El plomo es uno de los metales que tiene diversas aplicaciones en la industria por sus propiedades fisicoquímicas, además de formarse por el desgaste de partes de automóviles. Persiste en el agua, suelo o en el polvo por largos periodos. La ruta principal de entrada al cuerpo es por la vía gastrointestinal y en segundo lugar por inhalación. Cuando es inhalado puede llegar hasta los alveolos donde es absorbido por fagocitosis. Se distribuye principalmente en la sangre, hígado, riñones y en los huesos. En la sangre, la concentración a partir de 10 µg/dL o más ya se considera tóxica aunque ningún nivel es seguro, esta concentración en los niños desencadena problemas neurológicos, cognitivos, hipertensión y el desplazamiento del calcio de los huesos por la acumulación del Pb (Schnaas *et al.*, 2004).

La relación entre los problemas neurológicos y la exposición a este metal, parece ser que radica en la capacidad para inhibir al receptor N-metil-D-aspartato que se une a los sitios reguladores de Zn<sup>2+</sup> y lo inactiva, el cual es importante para el aprendizaje y la memoria en el hipocampo (Ahamed, 2007).

Los niños son más vulnerables a la exposición del plomo en relación con los adultos porque: a) reciben altas dosis de metales kilogramo-por-kilogramo, consumen más alimentos; b) su intestino absorbe más rápidamente lo que han

ingerido (Needleman, 2004); c) sus sistemas antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos; así como las enzimas del metabolismo no están totalmente expresados (Neal, 2012); d) la concentración tóxica puede ser menor pero con mayores consecuencias (Flora *et al.*, 2012); y f) porque su sistema nervioso aún no está totalmente desarrollado (ATSDR, 2007).

Talavera-Mendoza *et al.*, 2008, mencionan que la concentración de plomo en el agua del poblado del Horconcito es muy variable (<0.010-0.069 mg/L-1), la cual es utilizada por los habitantes como una fuente principal para los cultivos, animales y consumo doméstico incrementando de manera significativa la exposición y las vías de entrada del plomo al organismo, tal como lo menciona Chen *et al.*, 2001 respecto a diversas rutas que tienen los metales pesados para entrar al organismo, las cuales son: inhalación de partículas de polvo, por ingesta de animales o plantas, comestibles contaminados, y por el consumo de agua, además de la exposición dérmica.

En este estudio se usó el ensayo cometa alcalino como biomarcador de efecto temprano ampliamente usado para detectar daño al ADN (Singh *et al.*, 1988) inducido *in vivo* e *in vitro* por genotóxicos ambientales, plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (Carreras *et al.*, 2013)

Los resultados del ensayo cometa alcalino evidencian incremento significativo de lesiones en el ADN en las células del epitelio de la mucosa bucal de la población del Horconcito respecto a la población de referencia. Con respecto a los niños de la Ciudad de México, es un grupo que habita en una ciudad muy contaminada por

metales pesados tales como AL, Cu, Ni, Cd, incluyendo el plomo en comparación con la población de referencia .Chilpancingo (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 1999)

Resultados similares a este estudio han sido publicados por Maimulov, 1998, quien reportó incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal de niños expuestos a contaminantes del aire urbano. Calderón-Garcidueñas *et al.*, 1999, reportaron aumento significativo en la longitud de la cauda de cometas (41-80  $\mu\text{m}$ ) en células del epitelio nasal de niños expuestos a ozono, hidrocarburos y metales pesados del aire urbano de la Ciudad de México.

Yáñez *et al.*, 2003, encontraron resultados elevados en la longitud y momento de la cauda de cometas (58.3-79.3  $\mu\text{m}$ ) en linfocitos periféricos de niños de 3 a 6 años de edad expuestos a concentraciones elevadas de arsénico y plomo de un sitio minero en Villa de la Paz, México.

Tiradon *et al.*, 2005, mostraron incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos y de intercambio de cromátidas hermanas en niños expuestos a plomo.

Gamboa *et al.*, 2008, demostraron que niños expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos presentan valores elevados la frecuencia de cometas, la longitud de la cauda y momento de la cauda en linfocitos periféricos. (Jasso-Pineda *et al.*, 2011); Jasso-Pineda *et al.*, 2012, evaluaron daño genético mediante ensayo cometa en linfocitos periféricos de niños expuestos a arsénico y plomo, así como niños residentes de zonas mineras.



Se realizó una comparación por rangos de edad en los parámetros, se encontraron diferencias significativas con relación a la edad ( $p < 0.05$ ). En la longitud de la cauda se encontraron valores significativamente mayores en el rango de edad 11-12 años en la población del Horconcito comparado con los de Chilpancingo. Estos resultados pueden deberse a diversos factores, dentro de los cuales se puede destacar el tiempo de exposición para que se acumulen las lesiones en el ADN de los niños. Sin embargo, en los niños de 8 a 10 años los valores del momento de la cauda son significativamente mayores con los niños de los mismos rangos de edades del grupo de referencia, este parámetro nos indica el ADN lesionado, y quizá esté involucrado en la ineficiencia del sistema de desintoxicación para reducir el estrés oxidante del cuerpo de los niños manteniéndose el daño en el ADN.

En los niños de 8-12 años posiblemente los cambios hormonales pueden influir en el funcionamiento general del individuo. Sin embargo, se requiere analizar factores de alimentación, historial clínico, talla y peso, entre otros, para deducir con exactitud lo que ocurre en estos rangos de edad.

Es importante hacer notar que algunos factores individuales como el género, la edad y el índice de masa corporal también se deben de tomar en cuenta en este tipo de estudios, así como factores de comportamiento (como la mano a la boca, los hábitos de actividad física), además de otros factores internos tales como la variabilidad en la susceptibilidad genética (Hu *et al.*, 2007).

Se realizó una Chi cuadrada para comprobar si existe relación entre la frecuencia de cometas respecto a la edad y al sexo. Los resultados mostraron que la frecuencia de cometas está relacionada a la edad mas no se encuentran relacionados al sexo. Ejemplo de algunos experimentos donde si hay relación de síntomas con el sexo; Vahter *et al.*, 2001, mencionan que la diferencia de género en la exposición a Ni se ve representada por una mayor incidencia de alergias y eczemas en manos de mujeres que de hombres. Así mismo, la dosis interna de Cd es generalmente mayor en mujeres que hombres, debido a una mayor absorción gastro-intestinal en presencia de reservas bajas de Fe (Wasowicz *et al.*, 2001).

El Pb es acumulado principalmente en huesos y se ha demostrado un incremento endógeno en mujeres durante la menopausia (Shayesteh *et al.*, 2015).

En este estudio se evaluó la relación entre la edad y el sexo respecto a los parámetros genotóxicos medidos, así como la interacción entre las variables. Los datos mostraron que la población infantil del Horconcito no presenta relación entre las variables ni interacción entre las mismas ( $p < 0.05$ ) solo se encontró interacción entre las variables respecto a la frecuencia de cometas, longitud y el momento de la cauda ( $p < 0.05$ ) con la edad y no con el sexo.

En este estudio se evaluó también la concentración de 8-OH-dG en orina de las poblaciones infantiles antes mencionadas, el cual es el mejor biomarcador molecular de daño oxidante al ADN por metales pesados, es un marcador de predicción temprana de enfermedades incluyendo el cáncer y sus niveles pueden

ser medidos con excelente sensibilidad usando ELISA (Rodriguez-Romero *et al.*, 2012). El incremento en los niveles de la 8-OHdG está asociado al desarrollo de diversas enfermedades como tumores y cáncer, ya que refleja lesiones de ADN que no son reparadas en personas expuestas a genotóxicos ambientales, en pacientes diabéticos, y con Alzheimer (Wu *et al.*, 2004].

El análisis en la orina de 8-OH-dG en la población del Horconcito muestran mayor oxidación de la base guanina ( $3.78 \pm 1.80$ ) contrarrestado con el grupo de referencia ( $1. \pm 0.82$ ). De acuerdo al análisis estadístico realizado se comprueba que los niños expuestos presentan mayor daño oxidante en el ADN respecto a los niños no expuestos ( $p > 0.05$ ). Estos resultados se avalan por los estudios realizados por Fan *et al.*, 2012, donde midieron el daño oxidante en el ADN por inmunoensayo de ELISA en niños expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos, encontrando altos niveles de 8-OH-dG en orina.

Xu *et al.*, 2008, reportaron niveles elevados de 8-OH-dG en orina de niños expuestos a As. Yang *et al.*, 2009, determinaron altos niveles de 8-OH-dG en orina de niños con leucemia aguda, así como valores altos de Cr en la orina de los mismos. Buthbumrung *et al.*, 2008, mostraron altos niveles de 8-OH-dG en orina de niños expuestos a benceno. Yang *et al.*, 2009, encontraron correlación significativa en la cantidad de metales pesados detectados en orina, respecto a la concentración elevada de 8-OH-dG en niños con leucemia. Wong *et al.*, 2005, reportaron concentraciones elevadas de 8-OHdG en orina de niños expuestos a As, Cr y Ni.

La presencia de altas concentraciones de contaminantes como lo menciona Peluso *et al.*, 2005 puede generar daño al ADN por carcinógenos, el cual puede tener diferentes formas: puede resultar en rupturas en el grupo fosfato-azúcar, en una de las hebras de la doble hélice e incluso en las dos.

Se realizó una comparación de la concentración de 8-OH-dG en orina de las poblaciones infantiles en diferentes rangos de edades. Los resultados mostraron que existen diferencias significativas en el daño oxidante en el ADN respecto a la edad ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la interacción entre la edad se reflejó en los niveles de 8-OH-dG en la población infantil del Horconcito ( $p < 0.05$ ) con relación al nivel promedio de 8-OH-dG del grupo infantil de referencia (Ciudad de Chilpancingo).

Es importante mencionar que la presencia de concentraciones de plomo que rebasan los límites permisibles en el agua de consumo humano en el sitio del Horconcito, pueden producir estrés oxidante y daño en el ADN del epitelio bucal como lo mencionan varios investigadores como Kopjar *et al.*, 2006; Stadtman y Levine 2003; Sánchez *et al.*, 2004, se ve reflejado en el incremento de daño al ADN y en los niveles de moléculas oxidadas que se excretan en la orina, tal es el caso de 8-OH-dG evaluado en el estudio.

La toxicidad del plomo ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual induce diversas alteraciones celulares, tisulares y en órganos o sistemas se han identificado varias vías tales como: 1) estrés oxidante, al inducir la formación del oxígeno simple, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxido tales como los aniones superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), y

los radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como el peroxil-nitrito; 2) disminución de los niveles de glutatión (por afinidad a los grupos sulfhidrilos), además de agotar la síntesis y actividad superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y la deshidrogenasa del ácido delta amino-levunílico, también a bajas concentraciones de plomo, puede inhibir algunas ATPasas (Ahamed *et al.*, 2008).

La exposición a plomo puede alterar la composición de los lípidos de membrana y repercutir en su permeabilidad y función. Este metal también produce apoptosis como respuesta al daño al ADN, al mal funcionamiento de la mitocondria o por desequilibrio entre los niveles de Bax/Bcl2 y a la activación de las caspasas (Flora *et al.*, 2012; Valko, 2011).

Es muy conocido que los ROS, son altamente reactivos con los lípidos, proteínas y el ADN, en cual producen alteraciones como rompimientos de una o dos cadenas en el ADN y oxidaciones de sus bases. El daño o fragmentación del ADN es considerado como un tipo de lesión potencialmente promutagénica y si el daño al ADN no es reparado, las alteraciones podrían ser acumuladas, lo cual podría ser un evento inicial en el proceso químico de la carcinogénesis y eventualmente podría ocurrir el desarrollo de tumores (IARC, 2007). Sin embargo los efectos adversos a la salud dependen de múltiples factores tales el polimorfismo genético, susceptibilidad individual, la eficiencia de los sistemas de reparación al ADN, los niveles de antioxidantes endógenos, la dieta, el estilo de vida entre otros (Wiseman *et al.*, 1995).

La realización de estudios con dos marcadores biológicos como los usados en este estudio, deberían ser una herramienta necesaria para dar seguimiento a las poblaciones expuestas a elementos potencialmente tóxicos con el objeto de conocer el riesgo a desarrollar cáncer y otras enfermedades desde etapas tempranas y apoyar a las políticas de protección a la salud de los niños y de la población en general. Así mismo, los resultados corroboran que el ensayo cometa alcalino y el aducto 8-OH-dG son excelentes biomonitores de exposición y de efecto temprano de genotóxicos ambientales en poblaciones infantiles.

## 9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir lo siguiente

- La población expuesta medida a través de biomarcadores presenta lesiones al ADN con respecto a las poblaciones no expuestas.
- La población expuesta tiene diferencias significativas en los parámetros de frecuencia de cometas, longitud de la cauda y el momento de la cauda comparada con la población de referencia y referencia positivo.
- Se presentó aumento en los niveles de guaninas oxidadas (8-OH-dG) en las muestras de orina del grupo infantil expuesto (Horconcito, Guerrero), comparada con el grupo infantil (Chilpancingo, Guerrero).
- No hay una relación entre los parámetros genotóxicos y 8-OH-dG con el género de las poblaciones infantiles expuestas y no expuestas al plomo.
- El ensayo cometa alcalino en la mucosa del epitelio bucal y el aducto 8-OH-dG son biomarcadores adecuados para mostrar efectos genotóxicos por exposición a agentes contaminantes en poblaciones infantiles.

## 10. Referencia Bibliográfica

- Ahamed M., Siddiqui M. K.J. 2007. Low level exposure and oxidative stress: Current opinions. *ScienceDirect*. 383, 57-64.
- Allen-Gil S. M., Gubala C. P.; Landers D.H., Lasorsa B. K. Crecelius E.A. Curtis L.R. 1997. Heavy metal accumulation in sediment and freshwater.
- Amarasiriwardena Ch., Bellinger D.C.,Chettle D.R., Hussain j., Nie L. H., Pejović-M. A., Shannon M. Woolf A., Wrigth R.O. 2011. Blood lead levels and cumulative blood lead index (CBLI) as predictors of late neurodevelopment in lead poisoned children. *Biomarkers*. 16(6): 517–524.
- Archbold J. 2014. Impacts of lead in drinking water. Technical report. Toronto Public Health.
- Armienta, A., Talavera, O., Morton, O., Barrera, M. 2003. Geochemistry of metals from mine tailings in Taxco, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 713, 87-393.
- Armstrong, T. W., Zaleski, R. T., Konkell, W. J., Parkerton ,T. J. 2002. A tiered approach to assessing children's exposure: a review of methods and data. *Toxicology Letters*. 127, 111-119.
- ATSDR. 2005. Toxicological Profile for Lead. Public Health Service.
- ATSDR. 2007. Lead. Division of Toxicology and Enviromental Medicine. 7434:1-92.
- Autrup, H., Daneshvar, L. O., Gamborg, M., Hansen, A.M., Loft, S., Okkels, H., Nielsen, F., Nielsen, P. S., Raffn, E., Wallin, H., Knudsen L. E. 1999. Biomarkers for exposure to ambient air pollution-comparison of carcinogen-



DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Journal Environmental Health Perspectives*. 107, 233-238.

- Baghurst, P. A., McMichael A. J., Wigg N. R., Vimpani G. V., Robertson E. F., Robert R. J., Tong S. L. 1992 Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. The Port Pirie Cohort Study. *The New England Journal of Medicine*. 327, 1279-1284.
- Bogdanov, M. B, Beal, M. E, McCabe, D. R., Griffin, R. M., Matson, W. 1999. A carbon column based LCEC approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measurements in urine and other biological matrices. *Free Radical Biology and Medicine*. 27, 647-666.
- Breton, J., Sichel F., Bianchini, F., Prevost, V. 2003. Measurement of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by a commercially available ELISA test: comparison with HPLC/electrochemical detection in calf thymus DNA and determination in human serum. *Analytical Letters*. 36,123-134.
- Bruce S G., Arbieva Z. Gavin M. I. 2012. Analysis of lead toxicity in human cells. *BMC Genomics*. 13, 344-352.
- Buthbumrung, N., Ruchiwarat M., Navasumrit P., Settachan D., Tuntaviroon J. y Sharma S., 2008. Measurement of genotoxic air pollution exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 206, 207-214.
- Calderón, J., Navarro M. E., Jiménez-Capdeville, M. E., Santos-Díaz M.A., Golden, A., Rodríguez-Leyva, I., Borja-Aburto, V., Díaz-Barriga, F. 2001,

Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental Research*. 85, 69-76.

- Calderón, S. M.E., López, G., L., Zúñiga-Reyes, R. 2007. Metabolic activation of herbicides Products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicol. In Vitro*. 19, 24-37.
- Calderón-Garcidueñas, L., Wen, W.L., Jing, Z.Y., Rodríguez, A.A., Osnaya, N., Villareal, C.A., Santella, R.M., 1999. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a Major Mutagenic Oxidative DNA Lesion, and DNA Strand Breaks in Nasal Respiratory Epithelium of Children Exposed to Urban Pollution. *Environmental Health Perspective*. 107, 469-474.
- Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Molina-Alvarez B., Villalobos-Pietrini R.,
- Caravanos J., Dowling R.,Tellez A.,Kobrosly R.,Estrada D.,Orjuela M., Gualteros S., Ericson B., Rivera A., Fuller R. 2014. Niveles de Plomo en Sangre en México y su implicación para la Carga Pediatrica de la Enfermedad. *Annals of Global Health*. 80.
- Carreras, H. A., Calderón, S.M.E., Gómez, A.S. 2013. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. *Environ. Poll. V.178*: 403-410.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Preventing lead poisoning in young children. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC.

- Cervantes C., Moreno R. 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. AGT Editor S.A. Primera Edición. México.
- Chen, F., Ding, M., Castranova, V., Shi, X. L., 2001. Carcinogenic metals and NF-kappa B activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 222, 159-171.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura S. Loeb, L. A. 1992. 8-Hydroxyguanine an abundant form of oxidative DNA damage causes G-t and A-C substitution. *Journal of Biology and Chemistry*. 267, 166-172.
- Chiba, M., Shinohara, A., Matsushita, K., Watanabe, H., Inaba, Y., 1996. Indices of lead exposure in blood and urine of lead exposed workers and concentration of major and trace element and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *Tohoku Journal Experimental Medicine*. 178, 49-62.
- Chiou, C. C., Chang, P. Y., Chan, E. C., Wu, T. L., Tsao, K. C., Wu, T. W. J., 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogues as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica Chimica Acta*. 334, 87-94.
- Cofiño, M., G., Gutiérrez M., A., Pardo A., B., Gámez M.,R., Curveco S.,D. 2007. Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo cometa). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 38, No. 3.

- Cooke, M. S., Olinski, R., Loft, S., 2008. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesion in Urine. *Cancer Epidemiologic. Biomarkers and Prevention*. 17, 3-14.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Herbert, K. E., Lunec, J. 2000. Urinary 8-Oxo-21-Deoxyguanosine- Source, Significance and Supplements. *Free Radical Biology & Medicine*. 32, 381-397.
- Cousins, R. J., McMahon, R. J., 2000. Integrative aspects of zinc transporters. *Journal of Nutrition*. 130, 1384-1387.
- De Flora, S., Wetterhahn, K. E., 1989. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chemistry Reports*. 17, 169-244.
- Del Bosque, F. H. 2005. *Química inorgánica*. Mc Graw Hill.
- Díaz-Villaseñor E. 2006. Transferencia de Metales entre suelo y plantas de maíz (*Zea mays* L.), sembradas en terrenos impactados por jales mineros en la región de Taxco, Guerrero. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Guerrero. Iguala, Gro.
- EPA. 2006. What is Lead? Center Disease of Cáncer.
- Evans, M. D., Cooke, M. S., Podmore, I. D., Zheng, Q., Herbert, K. E., Lunec, J., 1999. Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: Implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochemical and Biophysics Research Communication*. 259, 374-378.
- Fan, R., Wang, D., Mao, C., Ou, S., Lian, Z., Huang, S., Lin, Q., Ding, R. y She, J., 2012. Preliminary study of children's exposure to PAHs and its

association with 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Guangzhou, China. *Environment International*. 42 (2012) 53-58.

- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A. 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates *Interdiscip Toxicol*. Vol. 5(2): 47–5.
- Flora, S. J. S., Flora, G., Saxena, G., Mishra, M., 2007. Arsenic and Lead Induced Free Radical Generation and Their Reversibility Following Chelation. *Cell Molecular Biology*. 53, 24-46.
- Flores – Mundo, N. 2002. Caracterización química mineralógica de los jales El Fraile, Taxco de Alarcón, Guerrero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero. México: 98 pp.
- Gama, G. A., Gómez, B. A. y Aguirre, A. J. 2010. Amplificación Sísmica en Chilpancingo, Guerrero. *Revista Digital Universitaria*. 11(01) 1067-6079.
- Gamboa, T. R., Gamboa, R. A., Bravo, H. A. y Ostrosky, P. W. 2008. Genotoxicity in child populations exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the air from Tabasco, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 5(5) 349-355.
- Gil, F., Pla, A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal Applied Toxicology*. 21, 245-255.
- Gurer-O.,H., Handan U., S., Hilal Ö. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 195, 147–154.
- HHS. 2012. Health effects of Low-Level Lead. National Toxicology Program.

- Hu, H., Shine, J., Wright, O. 2007. The challenge posed to children's health by mixtures of toxic waste: the Tar Creek superfund site as a case-study. *Pediatric. Clinics of North America*. 54, 155-175.
- IARC. Inorganic and organic Lead Compounds. 2006. Monographs of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 87.
- Jabeen R., Tahir M., Waqas S. 2010. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 22 (1). Disponible en: [http://www.ayubmed.edu.pk/JAMC/PAST/76 22-1/Jabeen](http://www.ayubmed.edu.pk/JAMC/PAST/76%2022-1/Jabeen).
- Järup, L., 2003, "Hazards of heavy metal contamination," *British Medical Bulletin*. 68, 167–182.
- Jasso-Pineda, Y., Díaz-Barriga, F., Calderón J., Yáñez L., Carrizales L., Pérez-Maldonado, I. N. 2012. DNA damage and decreased DNA repair in peripheral blood mononuclear cells in individuals exposed to arsenic and lead in a mining site. *Biological Trace Elements Reserch*. 146, 141-9.
- Jasso-Pineda, Y., Espinosa-Reyes, G., González-Mille, D., Razo-Soto, I., Carrizales, L., Torres-Dosal, A., Mejía-Saavedra, J., Monroy, M., Ize, A. I., Yarto, M., Díaz-Barriga, F., 2007. An Integrated Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 3, 344-350.
- Kasperczyk S., Kasperczyk A., Otałowska A., Dzinwicz M., Birkner E. 2004. Activity of glutathione one peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol Trace Elem Res*. 102: 61-72.

- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. 463. 13-31.
- Kopjar, N., D. Zeljezic and V. Garaj-Vrhovac, 2006. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim. Pol.*, 53: 321-336.
- Larese F., Boeniger M., Adam G., Spinelì P., Damian A. 2006. Skin Absorption of inorganic lead (PbO) and the effect of skin cleansers. *American College of the occupational and Environmental Medicine*. 48: 692.699.
- Ludivina R.O., Sabath E. 2014. Breve Historia de la intoxicación por plomo: de la cultura egipcia al renacimiento. *Revista Investigación Clínica*. 88-91.
- Maimulov, V. G., Kitaeva, L. V., Vereshchagina, T. V., Mikheeva, E. A. y Shelomova, L. F. 1998. Cytogenetic aberrations in somatic cells of children living in areas with various levels of environmental pollution. *State Medical Academy*. 40, 686-689.
- Méndez-Gómez, J., García-Vargas, G. G., López-Carrillo, L., Calderón-Aranda, E. S., Gómez, A., Vera, E., Valverde, M., Cebrian, M. E., Rojas, E., 2008. Genotoxic Effects of Environmental Exposure to Arsenic and Lead on Children in Region Lagunera, Mexico. *Annals of the NewYork Academy of Sciences*. 1140, 358–367.

- Murata, K., Iwata, T., Dakeishi, M., Karita, K., 2008. Lead toxicity: does the critical level of lead resulting in adverse effects differ between adults and children? *Journal Occupational Health*. 51, 1-12.
- Neal, A.P., Guilarte, T.R. 2012. Mechanisms of Heavy Metal Neurotoxicity: Lead and Manganese. *Drug Metab. Toxicol.* V.2-13.
- Needleman, H., Gatsonis, C. 1990, Low-level lead exposure and the IQ of children. *Journal of the American Medical Association*. 263, 673-678.
- Needleman, H. 2004. Lead poisoning. *Annu. Rev. Med.* 55, 209–222.
- Oyoo-Okoth, E., Admiraal, W., Osano, O., Manguya-Lusega, D., Ngure, V., Kraak, M. H, Chepkirui-Boit, V., Makwali, J., 2012. Contribution of soil, water and food consumption to metal exposure of children from geological enriched environments in the coastal zone of Lake Victoria, Kenya. *International Journal of Hygiene Environmental Health*.
- Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Nataranjan A., Nilsson R. 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 540, 19-28.
- Patrick, L., 2006. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1. Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*. 11, 2–22.
- Peluso M., Airoidi L., Autrup H., Hoek G., Krzyzanowsky M., Munia A, Veglia F. 2005. DNA Adducts and Lung Cancer Risk: A Prospective Study *Cancer Research*. 65: 17.
- Polańska, k., Wojciech H., Wojciech S., Małgorzata T., O., M., Danuta., Strugała, S., H., 2014. Predictors of environmental lead exposure among



pregnant women – a prospective cohort study in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21: 1, 49–54.

- Rafael, M. , Beyer ,N.W., Spann , Hoffman,D.J., Ramis A.(2003) Relationship Between Oxidative Stress, Pathology, and Behavioral Signs of Lead Poisoning in Mallards, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 66:17, 1371-1389.
- Rodríguez, R.I., Gómez A.S., Villalobos, P.R., Martínez V.C. 2012. Evaluation of 8-hidroxy-2'-deoxiguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral lymphocytes in vitro exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol. Mech. Methods*. 11, 1-27.
- Rodríguez-Romero M. I., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Martínez-Valenzuela C., Calderón-Ezquerro M. C., Cortés-Eslava J., Arenas-Huertero F., Calderón-Segura M. E. 2012. Evaluation of 8-hidroxy-2'-deoxiguanosine (8-OH-dG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral lymphocytes in vitro exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicology Mechanism Methods*. 22, 170-83.
- Rubio C. G., Izquierdo. A.J., Revert R.E. Lozano G., Hardisson A. El plomo como contaminante alimentario. 2004. *Revista de Toxicología*. 21. 72-80.
- Saldivar O.L., Tovar T.A., Namihira G.D. *Introducción a la Química*.1994. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Santella, R.M., 1999. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8, 733-739.
- Schnaas, L., Rothenberg, S.J., Flores, M.F. 2004. Blood Lead Secular Trend in a Cohort of Children in Mexico City (1987-2002). *Environ. Health Perspect.* 112, 1110–1115.
- Shayesteh T., Khajavi F., Ghaturi A., Mahjub R. 2015. Development and validation of a novel, simple and accurate spectrophotometric method for the determination of level in human serum. *Environ Monit Assess.* 2-9.
- Shen, J., Deininger, P., Hunt, J., Zhao, H., 2007. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer.* 109, 574-580.
- Shimoi, K., Kasai, H., Yokota, N., Toyokuni, S., Kinae, N., 2002. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 767-770.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Experimental Cell Research.* 175, 184-191.
- Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* 291, 85-95.
- Stadtman E., Levine R. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues proteins. *Amino Acids.* 25, 207-218.

- Talavera-Mendoza, O., M., Moreno, T. R., Dótor, A. A., Flores, M. N., Duarte, G. C. 2005. Mineralogy and Geochemistry of Sulfide-Bearing Tailings From Silver Mines in the Taxco, México Area to Evaluate their Potential Environmental Impact. *Geofísica Internacional*. 44, 49-64.
- The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2007. *Medicine for Case Studies Environmental. Lead Toxicity*.
- The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2005. U.S. Department of Health and Human Services.(DHHS). *Toxicological Profile for Lead*.
- Tiradon, Ascarrunzme, Cutim., 2005. Detección de daño genotóxico en niños expuestos a metales pesados en Alto Lima - La Paz. *BIOFARBO*. 13, 11-1
- Vahter M., Berglund M., Akesson A., Lidén C. 2001. *Metals and Women's Health*. Elsevier Science. 88, 145-155.
- Valavanidi, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C., 2008. 8-hydroxy-2\_-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. 27, 15- 50.
- Valko, M. Jomova, K., , 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283, 65-87.
- Wasowicz W., Gromadzinska J., Rydzynski K. 2001. Blood concentration of essential and heavy metals in workers exposed to lead and cadmium. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 3, 223-229.

- Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. 1995. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett* 93:113–120.
- Wong, R. H., Kuo, C. Y., Hsu, M. L., Wang, T. Y., Chang, P. I., Wu, T. H., Huang, S., 2005. Increased levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine attributable to carcinogenic metal exposure among schoolchildren. *Environmental Health Perspectives*. 113(10): 1386–1390.
- World Health Organization (WHO). 2010. Childhood Lead Poisoning.
- Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., Wu, T. J., 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*. 339, 1-9.
- Xu, Y., Wang, Y., Zheng, Q., Li, X., Li, B., Jin, Y., Sun, X., Sun, G., 2008. Association of oxidative stress with arsenic methylation in chronic arsenic-exposed children and adults.
- Yáñez, L., García-Nieto, E., Rojas, E., Carrizales, L., Mejía, J., Calderón, J., Razo I., Díaz-Barriga, F., 2003. DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. *Environmental Research*. 93, 231-40.
- Yang, Y., Tian, Y., Yan, C., Jin, X., Tang, J., Shen, X., 2009. Determinants of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Chinese children with acute leukemia. *Environmental Toxicology*. 24, 446-52.
- Zota, A. R., Schaider, L. A., Ettinger, A. S., Wright, R. O., Shine, J. P., 2011. Metal sources and exposures in the homes of young children living

near a mining-impacted superfund site. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 21, 495-505.

Anexo. Concentraciones de plomo detectados en cuatro manantiales del pueblo del Horconcito Guerrero (Talavera y Mendoza. En trámite).

