



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**“ESTUDIO DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE
ARSÉNICO Y FLÚOR SOBRE LA FORMACIÓN DE
ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS EN EL SISTEMA DE
CULTIVO DE CORTES DE HÍGADO DE RATÓN
BALB/c”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
Lillian Rojas Escárcega

Asesor: Dra. Patricia Ramírez Noguera

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉX

2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio de los efectos tóxicos de arsénico y flúor sobre la formación de aductos ADN-proteínas en el sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón Balb/c"

que presenta la pasante: Lillian Rojas Escárcega
con número de cuenta: 9423277-2 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Biólóga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Junio de 2004

PRESIDENTE	<u>Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez</u>	
VOCAL	<u>DRA. Sandra Díaz Barriaga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>DRA. Patricia Ramírez Noguera</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.C. Lidia Rangel Trujano</u>	

AGRADECIMIENTOS

Gracias SEÑOR por estar presente en todos y cada uno de mis días, y por permitirme vivirlos con amor, plenitud y alegría. Porque en mi vida haz puesto pruebas y personas de gran valor, que me permiten construir un mejor ser humano.

Solo te pido que me des la sabiduría, fortaleza y humildad suficientes para poder continuar el camino que he decidido transitar.

- ☺ A MIS PADRES: Dos seres maravillosos que me permitieron llegar a este mundo y ser parte de una familia “única e irremplazable”. Gracias por darnos lo mejor de ustedes (han formado dos seres que los aman y admiran), y enseñarnos el valor que tiene la vida. Sin sus lecciones de amor y su apoyo no estaría escribiendo esta dedicatoria.
- ☺ A mi hermano IVAN: ¡por que eres único!!! Me has enseñado grandes cosas que me hacen sentir orgullosa de tí. Sé que el día de mañana mostrarás al mundo la grandeza que llevas implícita en tu ser.
- ☺ A mi tía HERLINDA: Un hermosísimo ser humano que nos ha enseñado grandes valores; amorosa y magnánima como pocas personas. Gracias por amarnos, ayudarnos a crecer juntos, y ser parte de nuestra familia.
- ☺ Especialmente A MI ABUELA: Desde el lugar en el que te encuentras, quiero agradecerte por permitirme crecer al lado del ser mas amoroso que he conocido. Tu corazón y el nuestro siempre seguirán juntos.
- ☺ AMBAR: ¡Eres mi regalote, y lo sabes!!! Gracias por todo tu amor, gran apoyo y enorme paciencia; por permitirme conocer el maravilloso ser humano que eres, y con quien estoy orgullosa de compartir este maravilloso lapso de mi vida.

- ☺ DANY y TETÉ: Cada uno de ustedes, en diferentes momentos de mi vida, han sido grandes maestros y amigos, que han puesto en mi camino “un rayito de luz”. Es poco lo que puedo expresarles (ustedes ya lo saben), pero mucho lo que puedo agradecerles.
- ☺ VLADIMIR 8a: Gracias por tu apoyo y tu gran amistad; y por tantas charlas, consejos y buena vibra. *SUERTE* con la ingeniería, ella sabrá recompensarte.
- ☺ DR. ARMANDO RIVAS: Gracias por todas tus atenciones, tu cariño y tu apoyo.
- ☺ CONCHITA: Por tu cariño y por permitirme compartir buenos momentos, *GRACIAS*. Eres un ser muy especial.
- ☺ A mis amigos de la PREPA: Todos y cada uno de ustedes son seres especiales, que cada vez que los veo me hacen sentir feliz y afortunada de haberlos conocido, y seguir contando con ustedes. *GRACIAS POR SU CARIÑO Y APOYO*.
- ☺ A mis amigos del cubículo, especialmente a ALMA y al FUNDA: Las experiencias que viví con ustedes ayudaron a que mi vida cambiara de rumbo y se abriera a otro nivel. Han sabido luchar “desde abajo”, con amor y profunda convicción. Gracias por su apoyo y por recordarme que, “cuando realmente se quiere” es posible. *Los quiero mucho*.
- ☺ DRA. PATY: Lleva en su ser la semilla del amor, la sabiduría y la visión, que con su “muy particular estilo” ha sabido compartir con cada uno de nosotros. Gracias a personas como usted, el ámbito científico es capaz de dar “más y mejores frutos”. *!!!Muchísimas GRACIAS y MUCHO ÉXITO!!!*
- ☺ NIDIA, SANDY, ARLETTE, VERO, IRIS e ISRAEL: Su presencia, su apoyo y sus risas, han hecho que mi estancia en el laboratorio sea una experiencia única. *!!!GRACIAS y MUCHA SUERTE!!!*

- ☺ NANCY, ENRIQUE, OLGA LIDIA y MAGADALA, RUTH. NORMA EDITH, CHUCHO, GUSTAVO, GABY, ANGIE y EZEQUIEL: Gracias por enriquecer mi vida con su compañía, alegría y buenos detalles. Personas como ustedes, hacen de este planeta un sitio más feliz.

- ☺ A todos los que me faltan y han formado parte de mi vida: *GRACIAS, siempre los recuerdo con mucho cariño.*

Gracias a la UNAM por ser “nuestra casa”, y porque ha sabido dar y seguirá dando lo mejor para engrandecer a nuestro país.

“LA ENSEÑANZA SIN AMOR NO LLEVA TRASCENDENCIA”

INDICE GENERAL	PÁGINA
Índice de tablas	4
Índice de figuras	4
Índice de gráficas	5
Glosario de abreviaturas	6
Resumen	8

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.0.- <u>Generalidades de los Analitos de estudio: Arsénico y Flúor</u>	11
1.1.-Fuentes en la naturaleza	12
1.2.-Fuentes naturales	12
1.3.-Fuentes antropogénicas	17
1.4.-Contaminación en el mundo	19
1.5.-Contaminación en México	22
1.6.-Problemática actual en el mundo y en México respecto a las áreas de contaminación endémicas por arsénico y flúor	25

CAPÍTULO II BIOTRANSFORMACIÓN Y MECANISMOS DE TOXICIDAD

2.0.- <u>Biotransformación y destoxificación</u>	30
2.1.- Metabolismo de arsénico y flúor en conjunto	35
2.2.- <u>Mecanismos de toxicidad</u>	37
2.2.1.-Mecanismo de toxicidad del arsénico pentavalente	37
2.2.2.-Mecanismo de toxicidad del arsénico trivalente	37
2.2.3.-Mecanismo de toxicidad de los arsenicales metilados trivalentes	39
2.2.4.-Mecanismo de toxicidad del flúor	40

CAPÍTULO III	CARCINOGENESIS	PÁGINA
<u>3.0.-Mecanismos Moleculares asociados a la carcinogénesis</u>		41
3.1.-Estudios de Genotóxicidad <i>in vitro</i>		41
3.2.-Co-mutagénesis		46
3.3.-Co-carcinogénesis		46
3.3.1.-Genotoxicidad <i>in vivo</i>		46
3.4.-Amplificación de genes		49
3.5.-Alteración en el sistema de reparación del ADN		49
3.6.-Alteración en la metilación del ADN		50
3.7.-Estrés oxidativo		51
3.8.-Proliferación celular		53
3.9.-Transformación celular		55
3.10.-Promoción de tumores		56
3.11.-Otros sitios blanco		57
3.11.1.-Arsénico		57
3.11.2.- Flúor y Enfermedad de Alzheimer		59
3.11.3.- Flúor asociado a síndrome de Down, mortalidad y demencia senil		59

CAPÍTULO IV **EXPOSICIÓN**

<u>4.0.-Exposición</u>	60
4.1.-Síntomas de toxicidad	60
4.2.-Fuentes de exposición y sus efectos	62
4.3.-Fuentes de exposición y sus efectos en conjunto	64
4.4.-Disminución de los efectos a través de la dieta	64

CAPÍTULO V	ESTUDIO DE LOS ADUCTOS ADN-PROTEÍNAS	PÁGINA
5.0.- <u>Cultivo de cortes de tejido</u>		66
5.1.- <u>Biomarcadores</u>		70
5.1.1.-Biomarcadores de exposición		70
5.1.2.-Biomarcadores de efecto		71
5.1.3.-Biomarcadores de susceptibilidad		71
5.2.-Estudio de los aductos ADN-proteínas		72
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>		76
<u>HIPÓTESIS</u>		77
<u>OBJETIVO GENERAL</u>		77
Objetivos específicos		77
<u>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</u>		78
Cultivos de cortes de hígado		78
Determinación de K^+ intracelular (viabilidad)		79
Precipitación de los aductos ADN-proteínas		80
Determinación de los aductos ADN-proteínas por fluorescencia		84
<u>RESULTADOS</u>		85
Cuantificación de K^+ intracelular a las tres horas de tratamiento		85
Determinación de aductos ADN-proteínas		87
Análisis estadístico		92
<u>DISCUSIÓN</u>		94
<u>CONCLUSIONES</u>		107
<u>PERSPECTIVAS</u>		108
<u>Glosario</u>		113
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>		116

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINA
TABLA 1: Concentraciones en los mantos acuíferos de los países afectados por arsénico	13
TABLA 2: Arsénico contenido en el suelo de varios países	14
TABLA 3: Contenido de Flúor en alimentos vegetales y animales (1949-1956)	15
TABLA 4: Contenido de Flúor en algunos alimentos en España (2002)	16
TABLA 5: Concentraciones normales del flúor en los tejidos y fluidos corporales	33
TABLA 6: Cambios en la expresión de genes ocasionados por Arsenito	38
TABLA 7: Efectos citogenéticos del Flúor en Cultivo de células de mamífero	43
TABLA 8: Efectos adversos ocasionados por la exposición a Arsénico	57
TABLA 9: Efectos de la exposición crónica a Arsénico sobre diversos sistemas	61
TABLA 10: Análisis de la inducción de DPC por flúor y arsénico en diferentes exposiciones	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Regiones en riesgo de envenenamiento por arsénico	20
FIGURA 2: Países con fluorosis endémica debido al exceso de flúor en el agua potable	22
FIGURA 3. Biotransformación del Arsénico	30
FIGURA 4: Metabolismo del Flúor	31
FIGURA 5: Inducción de daño por radical peroxilo y la reacción de la dimetilarsina en la dimetilación del arsénico trivalente y el O ₂	51
FIGURA 6: Precipitación de Complejos ADN-proteínas	82
FIGURA 7: Determinación indirecta de DPC por fluorescencia.	84

ÍNDICE DE GRÁFICAS	PÁGINA
GRÁFICA 1: Viabilidad de los cortes de hígado	86
GRÁFICA 2: Inducción de DPC	88
GRÁFICA 3: Inducción de DPC por arsénico	89
GRÁFICA 4: Inducción de DPC por flúor	89

GRÁFICA 5: Inducción simultánea de DPC por As y F 1×10^{-2} M	90
GRÁFICA 6: Inducción simultánea de DPC por As y F 2×10^{-2} M	90
GRÁFICA 7: Inducción simultánea de DPC por As y F 4×10^{-2} M	90
GRÁFICA 8: Inducción simultánea de DPC por As-9 y F	91
GRÁFICA 9: Inducción simultánea de DPC por As-5 y F	91

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

As: arsénico

iAs: arsénico inorgánico

AsIII: arsénico inorgánico trivalente

AsV: arsénico inorgánico pentavalente

ADP: difosfato de adenosina

ADN: ácido desoxirribonucleico

As-n/Fn: exposición conjunta a As 1×10^{-2} y $F \mu \times 10^{-2}$.

ARN: ácido ribonucleico

ATP: trifosfato de adenosina

Ca²⁺: ion calcio

CK18: citoqueratina 18

DL₅₀: dosis letal 50

DMAs^{III}: ácido dimetil arsénico trivalente

DMAs^V: ácido dimetil arsénico pentavalente

DPC: DNA protein cross links ó, entrecruzamientos ADN-proteínas

F: flúor

F⁻: ion flúor

GSH: glutatión

GSH red: glutatión reductasa

HF: fluoruro de hidrógeno

H⁺: hidrogenión

K⁺: ion potasio

KCl: cloruro de potasio

Mg²⁺: ion magnesio

Na⁺: ion sodio

MMAs^{III}: ácido monometil arsénico trivalente

MMAs^V: ácido monometil arsénico pentavalente

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido

NaF: fluoruro de sodio:

Ni²⁺: ion níquel

·O₂⁻: radical oxígeno

·OH: radical hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

P⁵⁺: ion fosfato

PBS: buffer de fosfatos pH 7.2

PK: proteinasa K

PMN: polimorfonucleares

ppm: partes por millón

rpm: revoluciones por minuto

SAM: S-adenosil metionina

SDS: dodecil sulfato de sodio

SiF₄: fluoruro de silicio

SOD: superóxido dismutasa

SOLN. A (IISIS): SDS 2%, Tris-HCl 20mM, PMSF 1mM; pH 7.5

SOLN. B: KCl 100mM, tris-HCl 20mM; pH 7.5

SOLN. C: KCl 100mM, Tris-HCl 20mM; pH 7.5

SOLN. D: KCl 100mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 10mM, pH 7.5

TMA^{III}: trimetil arsénico trivalente

TMA^vO: óxido de trimetil arsina
pentavalente

TRX: tioredoxin reductasa

US EPA: United States Environmental
Protection Agency

UV: ultravioleta

WHO: World Health Organization, en español
OMS.

Unidades

hr: hora

dl: decilitro (100ml)

Kg: kilogramo

L: litro

µg: microgramo

µM: micromolar

mM: milimolar

mg: miligramo

ml: mililitro

ng: nanogramo

RESUMEN

El ARSÉNICO es un metaloide que se puede encontrar en la naturaleza en diversas formas químicas y estados de oxidación (-3, 0, +3, +5); y además de ser uno de los veinte elementos más abundantes en la naturaleza (ampliamente distribuido en el aire, agua y suelo) es uno de los doce más comunes en el cuerpo humano.

Sus diversos usos industriales y terapéuticos, su distribución natural y la actividad industrial, lo han llevado a contaminar desde las aguas potables hasta los alimentos.

Tanto la International Agency for Research on Cancer (1980, 1987) y la U.S. Environmental Protection Agency (1988) lo han clasificado como un conocido carcinógeno humano; y actualmente existen un gran número de efectos tóxicos, evidenciados en una enorme cantidad de pobladores en varias regiones de todo el mundo.

Por otro lado, el FLÚOR, es el elemento más electronegativo de la naturaleza y el decimotercero más abundante en la corteza terrestre. Su amplia distribución en la naturaleza (agua, aire y suelo), hace que sea prácticamente imposible que cualquier dieta normal en cualquier lugar del mundo este exenta de un mínimo contenido de flúor. Además de sus usos industriales y terapéuticos, el reconocimiento de su efectividad en la prevención de la caries dental, ha hecho que la fluoración del agua sea actualmente la base de todo programa de prevención de la caries. Por ello, en 1984 la Organización Mundial de la Salud publicó una guía que sugiere la adición de flúor al agua potable en las áreas con clima templado hasta alcanzar óptimas concentraciones de flúor de 1mg/L (1ppm), pudiendo aumentar a 1.2 mg/L en los climas fríos.

No obstante, hoy día más y más científicos cuestionan seriamente los beneficios de la fluoración, en pequeñas cantidades, debido a la gran cantidad de estudios sobre los efectos tóxicos del flúor, que dependiendo de la dosis de exposición, puede generar varios efectos tóxicos, *in vivo* e *in vitro*; convirtiéndose en un problema de salud pública.

Evidencias en áreas de contaminación endémicas han arrojado datos alarmantes sobre un gran número de casos en el padecimiento de diversas enfermedades relacionadas con la exposición aguda y crónica a flúor y arsénico, por separado. Dada la gravedad del problema, hemos hecho una recopilación de 16 países cuyas poblaciones actualmente están sufriendo graves trastornos en la salud ó están bajo un gran riesgo, por ser áreas endémicas de contaminación para flúor y arsénico, entre las cuales desgraciadamente figuran varias regiones de *México* (Comarca Lagunera, Durango, Chihuahua y S. Luis Potosí).

Puesto que la exposición a múltiples agentes tóxicos se da en el medioambiente de forma simultánea, en el caso particular de la acción conjunta del arsénico y el flúor, son muy pocos los estudios toxicológicos que se han efectuado hasta la fecha, por lo que el conocimiento a este respecto es mínimo. En la actualidad existen pocos estudios sobre el impacto en la salud que tiene la acción conjunta de ambos elementos. Por todo lo anterior, este trabajo está enfocado a generar conocimientos (sumamente útiles en áreas endémicas) sobre la acción conjunta de estos elementos.

Puesto que los entrecruzamientos ADN-proteínas se ha propuesto su uso como biomarcador de exposición y daño (cuya inducción ha sido reportada por reconocidos agentes tóxicos como níquel, cromo, arsénico, cis-platino, formaldehído, Beta-propiolactona, luz UV, mitomicina), hemos enfocado esta tesis al estudio de la capacidad inductora de entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC) después de la exposición a arsénico y flúor, empleando un sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón. Los DPC son entrecruzamientos irreversibles y covalentes (inducidos por tóxicos) que se dan por interacciones entre el ADN y las proteínas que normalmente no están unidas fuertemente al ADN y que están implicadas en la expresión de genes. Cuando los DPC no son reparados por la maquinaria genética, ocasionan diversas alteraciones que pueden llevar al mal funcionamiento o inclusive a la interrupción de las funciones metabólicas del ADN. Estos entrecruzamientos han sido detectados en diversos modelos humanos y animales, tanto *in vitro* como *in vivo*, y han sido asociados con carcinogénesis.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el arsenito de sodio, a concentraciones de 1×10^{-9} - 7×10^{-5} M tiene la capacidad de inducir DPC después de tres horas de exposición de manera no dependiente de la dosis; teniendo una mayor inducción de DPC con 1×10^{-9} (Gráficas 2 y 3).

El flúor a dosis de 1×10^{-2} , 2×10^{-2} y 4×10^{-2} M, induce la formación de DPC de manera dosis-dependiente, siendo mayor que la inducida a todas las concentraciones de arsénico probadas (Gráficas 2 y 4).

La inducción de DPC al administrar arsénico y flúor en conjunto es mayor que la que se presenta por casi todas las concentraciones de As; siendo las mayores concentraciones de ambos elementos (As 1×10^{-5} M/F 4×10^{-2} M) aquellas que generan un efecto mayor.

Al analizar la inducción de DPC por flúor (F 1×10^{-2} , 2×10^{-2} y 4×10^{-2} M) con las exposiciones simultáneas de arsénico, se observa que existe una mayor regresión lineal para el grupo de As 1×10^{-5} M con todas las concentraciones de F (Gráfica 5 y Tabla 11).

Las regresiones observadas indican que en exposiciones simultáneas, el incremento en la formación de DPC esta dado: primeramente por la exposición de As a dosis altas (1×10^{-5} M), y por la exposición a F en dosis altas (Tabla 11).

En **general** podemos decir que la inducción de DPC por As parece verse favorecida por la presencia del F en exposiciones conjuntas. Sin embargo, la capacidad del F por inducir este tipo de daño es mayor si la comparamos con la que se presenta en las exposiciones con As solamente.

En la discusión se plantea que la menor *capacidad inductora de DPC por As en comparación con la del F*, puede deberse a que los sistemas de reparación del ADN pudieran ser inducidos mas eficientemente por As que por F; o bien a la capacidad del arsénico por incrementar la producción de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD) (Hamadeh y cols., 2002) y que no se presenta con F.

La SOD podría proteger a las células hepáticas contra los radicales libres generados durante el metabolismo del As, reduciendo la posibilidad de formación de los DPC.

Los resultados observados acerca de la *capacidad inductora de DPC por F* son relevantes en virtud de su uso y de los antecedentes a los efectos tóxicos reportados al momento, mismos que se desconocían del todo. Consideramos que el estudiar los efectos tóxicos conjuntos de elementos que coexisten en la naturaleza, permite sentar las bases en el estudio del conocimiento de los DPC que se han propuesto como biomarcadores de efecto y daño en monitoreo medioambiental.

En este trabajo se comentan los resultados en base a los posibles *mecanismos a través de los cuales As y F* pudieron haber inducido estos aductos; además de la relevancia de las *consecuencias genéticas* que pueden tener lugar por la formación de DPC en exposiciones conjuntas.

1.0.-Generalidades de los Analitos de estudio: Arsénico y Flúor

ARSÉNICO.- El arsénico es un elemento químico, cuyo símbolo en la tabla periódica es As y se ubica en el periodo 4 del grupo VA. Posee un peso molecular de 74.921, su número atómico es 33 y es un metaloide que se puede encontrar en la naturaleza como polvo, cristales o amorfo, en diversas formas químicas y estados de oxidación (-3, 0, +3, +5). El arsénico elemental es insoluble en agua, no así el arsenato y arsenito de calcio que son medianamente solubles en agua, en tanto que sus sales de sodio son solubles en etanol. (Hughes, 2002; Mandal y Suzuki, 2002)

Fue descubierto por Alberto Magno, aproximadamente en el año 1250. El nombre de éste elemento proviene del vocablo griego "*arsenikon*". Desde la antigüedad se utilizaba un pigmento con el que se fabricaba pintura de color amarillo y que los griegos asociaban al sexo masculino, por lo cual le daban el nombre de *arsenikon*, que provenía de "*arsen*" que significaba varonil. Los romanos lo llamaron "*oropimente*", del latín *auripigmentum*; es decir, pigmento áureo o pigmento de oro, llamado así por su color amarillo. Se cree que fue obtenido por Alberto Magno calentando jabón junto con oropimente (trisulfuro de diarsénico). (<http://mineral.galleries...>)

FLÚOR.-El flúor, con símbolo F, es un elemento químico con un peso molecular de 18.9984 y cuyo estado de oxidación es -1. Pertenece al grupo VII de la tabla periódica, de los denominados halógenos, cuya característica principal es la de ser no metales sumamente activos. Es el elemento más electronegativo de la naturaleza, por lo cual nunca se le encuentra aislado y siempre está presente en forma de compuestos, denominados fluoruros. En estado puro, en el laboratorio, es un gas sumamente tóxico, de color amarillo claro y olor irritante.

En 1529, el minerólogo alemán Jorge Agrícola descubrió que su uso facilitaba la fundición de otros minerales, aportando un valioso ahorro de combustible y energía. Agrícola lo llamó flúores (proveniente del latín *Fluere*), porque se licuaba y fluía fácilmente. (Herazo, 1988)

1.1 -Fuentes en la naturaleza

ARSÉNICO.- El arsénico es uno de los veinte elementos más abundantes en la naturaleza y uno de los doce más comunes en el cuerpo humano. Su abundancia en la corteza terrestre es de aproximadamente 1.5-3 mg/Kg, encontrándose distribuido tanto en la naturaleza (fuente natural) como en diversos productos fabricados por el hombre (fuente antropogénica). (Hughes, 2000; Tesis, López Macay, UNAM, 2004; Hamadeh y cols., 2002; Mandal y Suzuki, 2002)

FLÚOR.- El flúor (F) es el decimotercer elemento más abundante en la corteza terrestre. La mayor parte de éste elemento existe tanto en la naturaleza como en la industria y se encuentra combinado en forma de fluoruros. Entre los fluoruros manufacturados predominan los compuestos orgánicos. En la naturaleza, acompañado por el sodio, constituye el mineral conocido como “villumita” y en los fluoruros dobles como “criolita”, F_6AlNa_3 , y “criolitionita”, $3FNa$, $3FLi$ y $2F_3Al$. (Herazo, 1988; Zeiger, 1993).

1.2.-Fuentes naturales

ARSÉNICO.- El arsénico es un contaminante natural ampliamente distribuido, presente en agua, suelo y aire. Generalmente se le encuentra asociado con más de 245 minerales que contienen sulfuros, cobre, níquel, plomo, cobalto y otros metales. Se le puede encontrar en la naturaleza en dos formas químicas, 1) como arsénico inorgánico (iAs), formando sales de arsenato (III) y arsenito (V) que son respectivamente las formas aniónicas de los ácidos arsínico y arsenioso; ó bien, 2) formando compuestos orgánicos tales como los ácidos monometil (MMA^{III} y V) y dimetil arsénico (DMA^{III} y V), que son los metabolitos metilados más estables producidos por los mamíferos a partir del iAs, y son excretados en la orina. (Hughes, 2002; <http://www.iespana...>)

Es importante señalar que el máximo nivel de arsénico permitido en el agua es de 50 µg/L (aunque varios datos epidemiológicos sugieren que esta asociado con un sustancial incremento en el riesgo de cáncer) y el valor recomendado tanto por la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) como por la World Health Organization (WHO, OMS en español) es de 10 µg/L (16 de enero del 2001, una regla final establecida por la US EPA). (Thomas y cols., 2001; Mandal y Suzuki, 2002)

En una revisión publicada en el 2002, Mandal y Suzuki compilaron el contenido de arsénico en el agua y suelo de varios países, que se muestra a continuación:

TABLA 1: Concentraciones en los mantos acuíferos de los países afectados por arsénico

Localización	Periodo de muestreo	Fuente de arsénico	Concentración (µg/L)
<i>Hungría</i>	-	Mantos acuíferos profundos	68 (1-174)
<i>Sureste de Finlandia</i>	1993-1994	Pozos de agua; de origen natural	17-980
<i>E.U.A., New Jersey</i>	1977-1979	Pozos de agua	1 (media), 1160 (máx)
<i>Oeste de E.U.A.</i>	-	Ambientes geoquímicos	48 000 (máx)
<i>Sureste de E.U.A</i>	1970-	Acuíferos aluviales	16-62
<i>E.U.A: Sur de Iowa y Oeste de Missouri</i>	-	Origen natural	34-490
<i>Noroeste de Ohio</i>	-	Región natural	<1-100
<i>Norte de México, Región Lagunera</i>	-	Pozos de agua	8-624
<i>Argentina, Córdoba</i>	-	-	>100
<i>Chile</i>	-	-	470-770
<i>Argentina, Córdoba: Pampa</i>	-	2-15m, 61°45' -63° W; 32°20-35'00' S	100-3810
<i>China, Xinjuiang: Kuitun-Usum</i>	1983	Pozos de agua	0.05-850
<i>China, Shanxi</i>	1988	Pozos de agua	0.03-1.41
<i>Taiwan, Hsinchu</i>	-	Pozos de agua	<0.7
<i>India, Oeste de Bengala</i>	1989-1996	Sedimento rico en arsénico	0.003-3700
<i>India, Calcuta</i>	1990-1997	Cercana a una planta productora de pesticidas	<50-23 080
<i>Bangladesh</i>	1996-1997	Pozos de agua	<10 - >1000
<i>Tailandia, Thammarat: Nakhon Si</i>	1994	Mantos acuíferos aluviales; actividad minera.	503.5 (1.25-5114)
	1994	Mantos acuíferos profundos; actividad minera.	95.2 (1.25-1032)
<i>Japón, Fukuoka</i>	1994	Origen natural	0.001-0.293
<i>Vietnam, Hanoi</i>	1999-2000	Sedimento rico en arsénico	159 (1-3050)

FUENTE: Modificado de Mandal y Suzuki, 2002.

TABLA 2: Arsénico contenido en el suelo de varios países.

País	Tipo de suelo/sedimento	Rango (mg/ Kg)	Media (mg/Kg)
<i>India, oeste de Bengala</i>	Sedimentos	10–196	
<i>Bangladesh</i>	Sedimentos	9.0–28	22.1
<i>Argentina</i>	Todos tipos	0.8–22.5	
<i>China</i>	Todos tipos	0.01–626	11.2
<i>Francia</i>	Todos tipos	0.1–5	2
<i>Alemania, Berlín</i>		2.5–4.6	3.5
<i>Italia</i>	Todos tipos	1.8–60	20
<i>Japón</i>	Todos tipos	0.4–70	11
		1.2–38.2	9
<i>México</i>	Todos tipos	2–40	14
<i>Sudáfrica</i>		3.2–3.7	3
<i>Switzerland</i>		2–2.4	2.2
<i>Estados Unidos</i>	Varios estados	1.0–20	7.5
		1.6–72	7.5

FUENTE: Modificado de Mandal y Suzuki, 2002.

FLÚOR.- Respecto al flúor, éste se encuentra en grandes cantidades en forma de fluoruros, presentes en el agua de mar, el agua potable, en los yacimientos minerales de espato-flúor, criolita y fluoroapatita, y en el polvo superficial que se encuentra en las inmediaciones de algunos de estos yacimientos.

En la atmósfera, se encuentra en los polvos precedentes de suelos fluorurados, y en las emanaciones de gas de las regiones volcánicas. (Herazo, 1988)

En los suelos, el flúor se encuentra presente en las rocas y suele formar parte de otros minerales. Los fluoruros, por lo general, se encuentran en forma de fluorita, fluoruro de calcio o espato-flúor (sinónimos), con un contenido de hasta 49% en flúor, dando concentraciones muy elevadas de flúor en los terrenos rocosos, que son la principal fuente de los compuestos comerciales en la actualidad. (Herazo, 1988)

En el agua, se encuentra presente tanto en las aguas dulces como en las saladas. En las aguas dulces (ríos, manantiales y mantos freáticos), cuando el agua contiene fluoruros, este elemento se encuentra en forma del ión (F⁻), pero puede aparecer como FF⁻² o HF no disociado. En soluciones diluidas a pH neutro casi todo el flúor se encuentra como iones F⁻, pero a pH menor los iones desaparecen. El

contenido de fluoruros en el agua depende de la existencia de contaminantes atmosféricos o de minerales fluorados en las fuentes naturales. Así, la mayor o menor cantidad depende de la porosidad de las rocas y suelos donde corre el agua, de la corriente, de la temperatura en la interacción agua-rocas, y de la concentración de iones H^+ y Ca^{2+} en el agua, siendo las aguas alcalinas con elevada temperatura donde existe mayor posibilidad de encontrar mayores concentraciones de flúor.

En las aguas saladas (mares) se encuentran concentraciones de fluoruros entre 0.8 y 1.4 ppm. (Herazo, 1988)

El contenido de flúor en los alimentos vegetales depende de la cantidad del mismo en el terreno donde son cultivados; o de su presencia en el hábitat natural, agua potable y alimentación, para el caso de los animales. Es por ello que es prácticamente imposible que cualquier dieta normal en cualquier lugar del mundo, este exenta de un mínimo contenido de flúor; haciendo sumamente difícil evaluar la trascendencia de dicho elemento en los procesos de crecimiento, desarrollo y todos los demás procesos fisiológicos del cuerpo humano. (Herazo, 1988)

Respecto a los alimentos, McClure en 1949, Trujaut en 1955 y Bredeman en 1956 (Fluoruros y Salud-OMS 1972, Ginebra Suiza) compilaron el contenido de flúor en alimentos vegetales y animales. (Herazo, 1988)

TABLA 3: Contenido de flúor en alimentos vegetales y animales (1949-1956)

<i>VEGETALES</i>	<i>p.p.m</i>	<i>VEGETALES</i>	<i>p.p.m</i>	<i>ANIMALES</i>	<i>p.p.m</i>
Naranja	0.07-0.17	Remolacha	0.2	Pescados:	
				Caballa	84
Limón	0.02-0.05	Coliflor	0.1-1.0	Salmón	19
Manzana	0.22-1.32	Repollo	0.7	Sardinas	16.1
Plátano	0.23	Zanahoria	0.4	Bacalao	7.0
Uvas	0.16	Ajo	17.2	Ostras	0.7
Mango	0.18	Lechuga	0.3	Cangrejo	2.0
Papáya	0.15	Cebolla	0.6	Arenque	3.5
Piña	0.14	Perejil	0.8	Huevos	1.2
Melón	0.20	Papa	0.2-6.4	Pollo	1.4
Fresa	0.18			Buey	2.0
Sandía	0.111			Cerdo	0.2
Té	97			Carnero	0.2
Maíz	0.1-0.6			Ternero	0.9

Trigo 0.2-4.0

Hígado de Res 5.2-5.8

Arroz 0.1-0.6

Riñones de Res 6.9-10.0

FUENTE: Herazo, 1988

El agua en España (como fuente de flúor), en la mayoría de las aguas embotelladas no sobrepasa los 0,5 mg/L de flúor; así mismo, los contenidos de flúor reportados en algunos alimentos (España) en el 2002 se citan a continuación:

TABLA 4: Contenido de Flúor en algunos alimentos en España (2002)

<i>Alimentos</i>	<i>Flúor µg/100 g</i>	<i>Alimentos</i>	<i>Flúor µg/100 g</i>
Arroz	10-67	Almendras	90
Avena	25	Avellanas	30
Harina de trigo	27-35	Queso	16-160
Berro	100	Buey	29-200
Acelgas	20	Cerdo	34-98
Guisantes	60	Cordero	120
Rábano	80	Pollo	140
Zanahoria	40	Ternera	90
Soja	130	Arenque ahumando	350
Ciruela	21	Bacalao fresco	700
Melón	20	Ostras	65
Pomelo	36	Huevo	120
Café	20-160	Té	200

FUENTE: Martínez, 2002.

1.3.-Fuentes antropogénicas

ARSÉNICO.- Del mismo modo se puede encontrar al arsénico como contaminante antropogénico; generalmente se le emplea asociado a otros elementos, entre cuyos usos se encuentran: en los bronce, en pirotecnia y como dopante en transistores; como arseniuro de galio en la construcción de laceres; como óxido de arsénico (III) en la industria del vidrio ó como veneno; la arsina (trihidruro de arsénico) en estado gaseoso es extremadamente venenosa; los sulfuros de arsénico en colorantes; en la agricultura como pesticida y herbicida; en medicina se emplea en el tratamiento de leucemia y asma bronquial crónico; el arsenato de sodio en el tratamiento de enfermedades parasitarias, crónicas de la piel y anemia; etc... El arsénico ha sido históricamente el veneno de elección para muchos suicidios y asesinatos, tanto en la realidad como en la ficción. (Hughes, 2002; <http://www.iespana...>)

FLÚOR.- Por su parte, el flúor se puede encontrar en el ambiente en los humos industriales y en la incineración del carbón en las zonas habitadas (en las zonas populosas constituye una de las principales fuentes de fluoruro atmosférico).

El contenido de flúor en alimentos vegetales y animales es de gran importancia, ya que al sumarlo al ingerido en el agua o con los tópicos en dentríficos puede beneficiar o perjudicar a la persona que lo consume; además algunos recipientes fabricados con teflón (polímero a base de flúor) pueden ceder parte del mineral a los alimentos que en él se cocinan. (Herazo, 1988; Martínez, 2002)

Entre sus usos industriales figuran: para colar acero, en composiciones de soldadura, en fundentes de metalurgia, como limpiador de acero inoxidable, como insecticida y preservativo de madera, como opacador; en la fabricación de esmaltes, papel cuché y vidrio, refrigerantes, propelentes, solventes y lubricantes.

Entre sus usos terapéuticos resalta: como antihelmíntico, anti fermentativo, antiséptico, en la conservación y dilución de sueros hemolíticos, y en la fluoración del agua.

(Herazo, 1988; <http://www.med.uwo.ca/ecosystemhealth...>)

Respecto al último de sus usos, las observaciones realizadas por Bear y colaboradores, a cerca de la influencia del fluoruro de sodio sobre la caries dentaria, muestran que la cantidad de caries que presentan los moradores de una región determinada se halla en razón inversa del contenido de flúor en el agua potable que consumen. Así, una parte por millón de flúor (1ppm) en el agua, causa

dientes resistentes a la caries; en cambio, si el contenido de flúor es de dos partes por millón (2ppm), origina fluorosis dentarias, esmalte vetado, etc.

La distribución del flúor en diversos tejidos del diente no es uniforme; el esmalte de los dientes resistentes a la caries (incisivos superiores) posee un contenido de flúor muy superior al de los susceptibles al ataque (los molares). En cambio, la dentina y otros, presentan igual contenido de flúor.

La acción anti-caries del flúor se halla en su capacidad de interferir en la formación de los ácidos, que son producidos en la boca por la descomposición de los carbohidratos, en la última fase de su degradación. (Herazo, 1988)

En transcurso de 60 años con más de 10 000 investigaciones realizadas en todo el mundo, se ha demostrado categóricamente que la dieta natural de fluoruros no reduce la caries dental; en promedio, el hombre requiere una dosis adicional de 1 mg diario del ión flúor, o sea 2.2 mg de fluoruro sodio o calcio. (Herazo, 1988; Guan y cols, 1998). Por ello, en 1984 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una guía en la que establece al flúor como un agente efectivo en la prevención de la caries dental cuando es tomado en "óptimas cantidades"; pero un simple "nivel óptimo" para el total intacto diario no puede ser agregado debido a que las variaciones del estado nutricional de los individuos influyen el valor de absorción corporal (una dieta pobre en calcio, incrementa la retención corporal del flúor).

Puesto que el agua es la mayor fuente de flúor intacto, la guía de la OMS (1984) sugirió que en las áreas con clima templado, las óptimas concentraciones de flúor que podían ser agregadas al agua potable debían alcanzar hasta 1mg/L (1ppm) (en los climas cálidos se bebe mas agua), y en los climas fríos podía aumentar a 1.2 mg/L; la guía valoro como limite máximo permisible de flúor en agua potable 1.5 mg/L, considerando un umbral donde el beneficio de la resistencia del diente todavía no da matices de decaimiento dentro de un significativo riesgo de fluorosis dental. No obstante, la guía de la OMS para la fluoridación en el agua no es universal: por ejemplo: en 1998 en la India, se alcanzaron concentraciones por arriba del máximo establecido. (UNICEF; World Health Organization, 1996)

De acuerdo con un reporte del "Department of Health, Education, and Welfare, U.S.", realizado en 1979, un gran número de estudios ha comprobado la reducción de 40 a 50% de caries en la dentición primaria y de 50 a 65% en la secundaria, en niños que beben agua fluorada desde el nacimiento.

Hoy en día, la gran mayoría de la población estadounidense tiene acceso a agua potable con concentraciones importantes de flúor (>0.7 ppm). (Pinkham, 1996; Ruiz, 1997)

La OMS propuso además la fluoración en productos de uso cotidiano, como pastas dentales, complementos y productos odontológicos, ya que por décadas se creía que la fluoración en pequeñas cantidades no causaba efectos adversos en la salud, y además proveía beneficios en la prevención de la caries dental. De esta manera, la fluorización o fluoración del agua, actualmente es la base de todo programa de prevención de la caries; siendo el método más eficaz, económico, práctico y confiable para reducirla, y proporcionar sus beneficios a la población, ya que no depende del consentimiento personal. (Pinkham, 1996)

No obstante, hoy día más y más científicos cuestionan seriamente los beneficios de la fluoración, en pequeñas cantidades, cuya efectividad esta dada por dos aspectos:

1.-El flúor inhibe enzimas bacteriales orales que a partir de los alimentos producen ácidos, que destruyen el esmalte dental. Pese a que esta observación es válida, algunos científicos creen que es mayor el impacto dañino del flúor sobre otras enzimas, que la extensividad de sus efectos benéficos en la prevención de la caries.

2.-Los iones flúor se unen a los iones calcio, fortaleciendo el esmalte dental durante su formación en niños. A pesar de la validez de este hecho, varios estudios realizados en los pasados 10 a 15 años en la India y otros países han proporcionado datos conflictivos; por lo que varios investigadores han llegado a un acuerdo universal, el flúor intacto excesivo conduce a la pérdida de calcio de la matriz dental, agravando la formación de cavidades y disminuyendo su vida útil, causando fluorosis dental; además de que, la sobre-exposición crónica y acumulativa puede causar una incurable fluorosis esquelética. (UNICEF; World Health Organization, 1996)

1.4.-Contaminación en el mundo

ARSÉNICO.- El arsénico y sus compuestos son móviles en el ambiente. El arsénico contenido en las rocas puede entrar en el ciclo del arsénico como polvo, disolviéndose en la lluvia, ríos, o aguas subterráneas. En estas últimas la contaminación por arsénico es un serio problema que involucra a la humanidad en todo el mundo. A través de estas fuentes también puede entrar en los alimentos con

una amplia distribución sobre las plantas y animales, donde las frutas, peces y vegetales contienen menos del 10% de arsénico en su forma inorgánica. Debido a esto, muchos alimentos de consumo cotidiano como leche, carne y cereales contienen al rededor de 65–75% de arsénico inorgánico. Un estudio reciente reporta 85–95% de iAs en arroz y vegetales.

Puesto que los humanos están expuestos a este tóxico a través del aire, alimentos y agua, miles de personas están sufriendo sus efectos tóxicos alrededor del mundo, sobre todo, debido a la contaminación de los mantos acuíferos subterráneos, que es acrecentada por el afluente industrial y los problemas de drenaje. (Mandal y Suzuki, 2002)

La tendencia cada vez mayor de beber el agua de fuentes subterráneas está causando una epidemia global del envenenamiento por arsénico. Decenas de miles de personas han desarrollado lesiones de piel, cánceres y otros síntomas, y muchos han muerto. Ahora se piensa que cientos de millones pueden estar bajo serios riesgos. El numero de personas y las regiones afectadas son las siguientes:

- | | | |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1. EUA: desconocido | 6. Hungría: 20,000 | 11. Vietnam: millones |
| 2. México: 400,000 | 7. Rumania: 36,000 | 12. Taiwan: 200,000 |
| 3. Chile: 437,000 | 8. India: 1,000,000 | 13. China: 720,000 |
| 4. Bolivia: 20,000 | 9. Bangladesh: 50,000,000 | 14. Nepal: desconocido. |
| 5. Argentina: 2,000,000 | 10. Tailandia: 1,000 | |

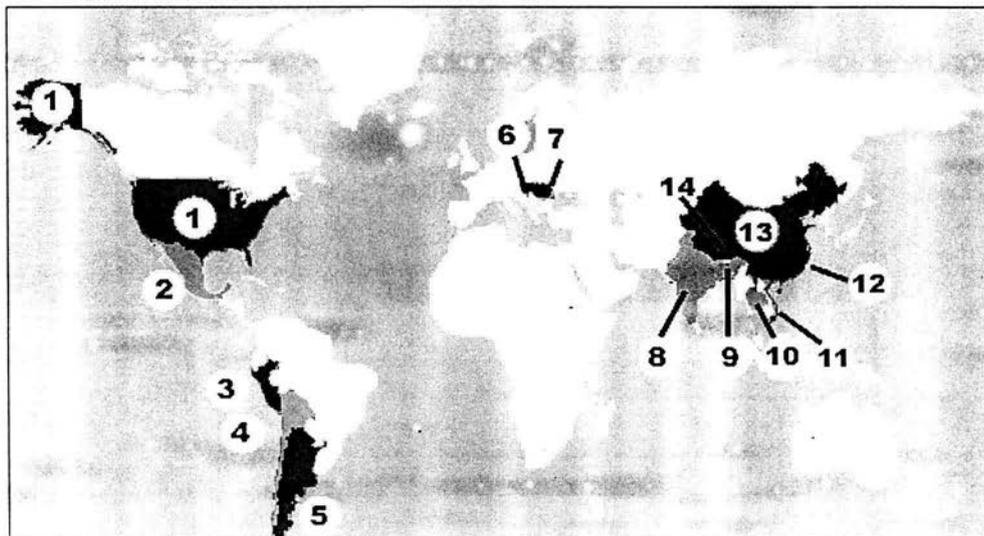


FIGURA 1: Regiones en riesgo de envenenamiento por arsénico.

FUENTE: <http://www.mindfully.org/Water...>

Falta página

N° 21

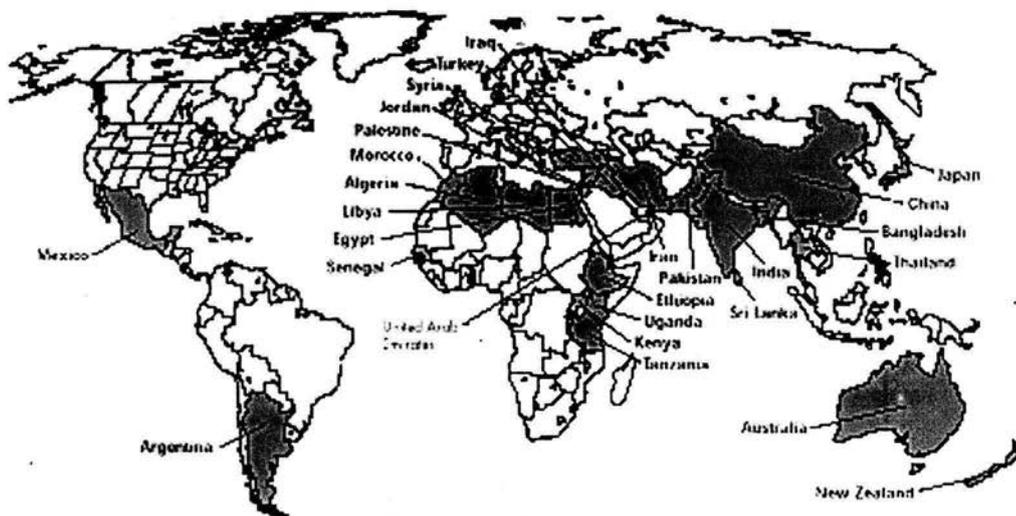


FIGURA 2: Países con fluorosis endémica debido al exceso de flúor en el agua potable.
 FUENTE: <http://www.unicef.org/programme/wes/info/fluor.htm>

No obstante, algunos gobiernos no están completamente conscientes del problema del flúor o convencidos del impacto adverso sobre sus poblaciones. Por consiguiente, es necesario aumentar los esfuerzos encaminados a soportar más investigaciones sobre este hecho y promover políticas sistemáticas por los gobiernos. Actualmente, la UNICEF está trabajando con el gobierno y con otros organismos en programas de defluoridación en la India y otros países, donde el exceso de flúor ha existido por muchos años en las aguas subterráneas. (UNICEF; World Health Organization, 1996)

1.5.-Contaminación en México

ARSÉNICO.- En México, la exposición crónica a arsénico en el agua potable fue reportada en seis áreas de la Región Lagunera, situada en la parte norte; con una población de 200,000 habitantes, de 1963–1983 (Cebrian y cols., 1983).

El rango total de las concentraciones de As encontradas fue de 0.008–0.624 mg/L, y en el 50% de las muestras fueron encontradas concentraciones mayores a 0.05 mg/L. En la mayoría del arsénico

inorgánico predominaba en un 93% la forma pentavalente (Del Razo y cols., 1990); y en el 36% restante entre el 20–50% correspondía a las especies trivalentes. También se observaron altas concentraciones de flúor en un rango de 0.5–3.7 mg/L y en el 20% de las muestras analizadas se encontraron concentraciones mayores de 1.5 mg/L (Del Razo y cols., 1993).

Entre los síntomas observados figuran manifestaciones cutáneas (cambios en la pigmentación de la piel, queratosis y cáncer de piel), enfermedades vasculares periféricas (BFD), disturbios gastrointestinales y alteración en la excreción de coproporfirina/uroporfirina (Albores y cols., 1979).

También se encontró que la proporción de los individuos con lesiones cutáneas se incrementa conforme la edad se aproxima a los 50 años. El grupo más pequeño es de 8 años para hipopigmentación, de 12 años para hiperpigmentación y queratosis palmo-plantar, de 25 años para queratosis papular y de 38 para lesiones ulcerativas (Cebrian y cols., 1983). Se asume que la fuente de arsénico es geológica (sedimentos volcánicos). (Del Razo y cols., 1990; Mandal y Suzuki, 2002)

FLÚOR.-En México la fluorosis es endémica en algunas áreas, siendo un problema de salud pública, como es el caso de ciudades ubicadas al noreste de México, que están localizadas en áreas donde el agua potable contiene excesivas cantidades de flúor natural. (Ortiz y cols., 1998)

La sobreexplotación de mantos acuíferos que abastecen a varias ciudades de México ha tenido como consecuencia la necesidad de obtener agua potable de pozos cada vez más profundos, teniendo como resultado que la concentración de fluoruro aumente debido a la precipitación de este ion en las profundidades de las fuentes de suministro de agua que abastecen a la población; y que consecuentemente conducen a la fluorosis.

En las áreas endémicas, los niveles de flúor en el agua potable de las localizaciones urbanas y rurales son mayores a 1.5mg/L; y al parecer la fluorosis afecta alrededor de 5 millones de personas en México, pero desgraciadamente, es un gran problema de salud poco reconocido. (Loyola y cols., 1998; Díaz-Barriga y cols., 1997)

En 1998, Loyola y colaboradores en un estudio de 52 pozos, encontraron en 44% de ellos 3.0 y 4.0 ppm; 1.0 y 2.0 ppm en 17%; 0.7 y 1.0 ppm en 16%, y menos de 0.7 ppm en 23% del total de pozos estudiados. Además detectaron como fuente adicional de flúor el consumo de bebidas embotelladas (refrescos y jugos de frutas), que independientemente de la localidad en donde eran



elaboradas, mostraban una relación directa con la contaminación de los diferentes mantos acuíferos de la región de donde se obtienen el agua para su elaboración. Otro problema detectado fue la falta de control de calidad en la adición de fluoruro a la sal doméstica; ya que en 1991 se dio inicio a un programa nacional de fluoración de sal doméstica con el objetivo de disminuir la incidencia de caries dental, en donde éste tipo de sal no iba a ser distribuida en poblaciones donde el agua de consumo tuviera concentraciones mayores a 0.7 ppm de flúor. Sin embargo, existen informes procedentes de algunos estados de la república, como es el caso de los estados de Chihuahua y San Luis Potosí, que indican lo contrario. (Loyola y cols., 1998)

Grimaldo y cols., en un estudio epidemiológico y bioquímico en 1992, identificaron tres factores de riesgo para la exposición humana al flúor en la misma ciudad (SLP), relacionados con la prevalencia de fluorosis dental: *la temperatura ambiental, la ebullición del agua, y la preparación de alimentos con agua hervida*. Se encontró que el 61% de las muestras de agua de varias fuentes tienen niveles de flúor de 0.7-1.2 ppm, siendo mas altos después de la ebullición; en el agua de la llave el rango de flúor fue de 0.33-6.97 ppm, siendo una fuente importante ya que el 82% de los niños beben agua de esta fuente; 31% también bebe agua embotellada y el 92% prepara sus alimentos con agua de la llave, 44% hierva toda el agua potable, y 91% usa agua embotellada como reconstituyente de las formulas infantiles.

La prevalencia y severidad de la fluorosis dental en niños (11-13 años de edad) se incrementa conforme la concentración de flúor lo hace. En el agua, niveles de flúor menores a 0.7 ppm generan una prevalencia del 69% de fluorosis dental, en tanto que en niveles de flúor mayores de 2.0 ppm se encontró una prevalencia de 98%. (Grimaldo y cols., 1995)

Ortiz y cols., (1998) en un estudio de fluorosis endémicas en la ciudad de Durango, México, estudiaron cuatro áreas de riesgo de acuerdo con los niveles de flúor en el agua en 212 muestras obtenidas de varios hogares, encontrando rangos que van desde 1.54 mg/L hasta 5.67 mg/L, estando el 95% de los habitantes de Durango (300,000 personas) expuestos a niveles de flúor mayores a 2.0 mg/L. También calcularon la dosis de exposición al flúor, encontrándose como la máxima dosis de exposición 1.86 mg/kg/día para infantes, 0.28 mg/kg/día para niños y 0.16 mg/kg/día para adultos. La Agency for Toxic Substances and Disease Registry establece los mínimos niveles de riesgo en 0.05 mg/kg/día para una exposición oral crónica, basándose en los más bajos efectos adversos observados a niveles de 0.48 mg/kg/día para un incremento en fracturas no vertebrales

evaluadas en mujeres osteoporóticas. Aunado a esto, los cálculos en esta investigación no toman en cuenta otras fuentes de flúor adicionales, existiendo un evidente riesgo en la salud de esta ciudad. (Ortiz y cols., 1998)

Ante este panorama resulta evidente que debe ser designado un programa de salud, tomando en cuenta todas las fuentes de flúor, incluyendo la dieta (Ortiz y cols., 1998). Al parecer, la introducción de programas educativos y de proyectos de investigación en ciertas universidades ha conducido a algunas mejorías; además es necesario efectuar la reducción de la prevalencia identificando los riesgos en el trabajo. (Diaz-Barriga y cols., 1997; World Health Organization, 1996)

1.6.-Problemática actual en el mundo y en México respecto a las áreas de contaminación endémicas por arsénico y flúor

Las investigaciones efectuadas en China, uno de los países más severamente afectado por los recurrentes efectos crónicos de flúor y arsénico (enfermedad endémica emergente en ese país) muestran lo siguiente:

Se han reportado casos de envenenamiento crónico por arsénico y flúor en provincias de China desde 1980: Xinjiang, Guizhou, Inner-Mongolia, que inicialmente habían sido reportados como riesgos de fluorosis simple y arsenismo simple en China y otros países. (Zheng y cols., 2002)

Huang y colaboradores, investigando de 1982 a 1989, encontraron 65 pacientes en Xinjiang con síndrome de arsenismo y fluorosis endémicos (SEAF, una clase de síndrome crónico resultado de los efectos de estos dos elementos combinados), en donde la neuritis periférica y los cambios cardiovasculares fueron más recurrentes en este síndrome que en arsenismo simple o fluorosis simple; y donde las cantidades excesivas de estos dos elementos en sangre pudieron tener un efecto sinérgico, dañino a los sistemas nervioso y circulatorio. También observaron problemas en la piel y tumores viscerales, sin poder llegar a ninguna conclusión. Se halló una incidencia del cáncer de piel con un 7,7%, y en el esófago de un paciente se encontró un carcinoma de células escamosas de grado II. (Huang y cols., 1992)

En 1996, Li y Cutress estudiaron los efectos del arsénico en la fluorosis y su interacción en conjunto en ratas, en cuya agua de bebida fueron adicionados arsénico (30 mg/L) y flúor (100 mg/L). Los resultados revelan (1) que el flúor causa fluorosis dental en ratas, similar a la observada en humanos; (2) no se detectó arsénico depositado en la dentina ni daños al diente; (3) no se observaron efectos obvios combinados de arsénico y flúor en tejidos dentales; a pesar de que los efectos tóxicos del flúor no estuvieron influenciados por el arsénico, (4) se observó un efecto sinérgicamente inhibitorio de ambos en el peso corporal. (Li y Cutress, 1996)

Finkelman y cols. (1999) reportan que la “combustión doméstica del carbón” ha tenido profundos efectos nocivos en la salud de millones de personas en todo el mundo; en China cientos de millones de personas queman comúnmente carbón crudo en las estufas, quedando sus hogares impregnados con altos niveles de metales tóxicos y compuestos orgánicos. Por lo menos 3 000 personas en la provincia de Guizhou en el sudoeste China están sufriendo de envenenamiento severo por arsénico y más de 10 millones de personas en la misma provincia y sus alrededores sufren de fluorosis dental y esquelética, donde la fuente primaria de arsénico y flúor parece ser el carbón con alto contenido de arsénico (35 000 ppm) y flúor, y los utensilios de arcilla (también con alto contenido de flúor). (Finkelman y cols., 1999)

Guoquan y colaboradores (2000), investigando las manifestaciones epidemiológicas y clínicas del envenenamiento endémico de arsenismo, fluorosis y de arsénico-flúor causado por agua potable en pozos con alto nivel de arsénico (0,1 mg/l o más) y flúor (1 mg/l o más) en agua, encontraron que el arsénico y el flúor tienen acciones independientes tanto en sus manifestaciones clínicas principales como en la producción de efectos tóxicos; en el área endémica, la pubertad de los niños era retardada, había problemas en la microcirculación de extremidades y el peso de los bebés al nacimiento era menor. También encontraron pacientes con tumores de piel y frecuentes carcinomas esofágicos. (Guoquan y cols., 2000)

En el 2000, Zhang y colaboradores encontraron que la exposición a fluoruro-arsénico en ratas afecta los niveles de macroelementos en suero: Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} descienden conforme aumenta la dosis, con cambios de K^+ y P^{5+} no significativos. Al detener la exposición después de 8 semanas, los niveles de Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} aumentan. (Zhang y cols., 2000)

En la cuarta conferencia anual sobre la “Exposición al Arsénico y Salud”, efectuada el 18 de junio del 2000, Aswathanarayana expuso que debido a las consecuencias del ambiente geoquímico (cenizas carboníticas altas en flúor), las aguas en la región de Kilimanjaro (norte de Tanzania) tienen una de las concentraciones más altas de fluoruro en el mundo, generando la endemidad de las fluorosis dental y esquelética en la región; además, ésta región también tiene la incidencia más alta de cánceres en Tanzania (38.2 % de población, contra el promedio nacional de 9,4 de la población 100 000). Puesto que en el pasado, los cánceres de estómago e hígado habían sido atribuidos a las nitrosaminas originadas por el volcanismo y las deficiencias alimenticias; actualmente, frente a la endemidad tanto de fluorosis como de los cánceres de vejiga e hígado en la provincia interna de Mongolia en China (Yamauchi et al., 1998), se ha propuesto que la endemidad de los cánceres de estómago e hígado en Tanzania, pueden ser una manifestación del arsenismo. Así, este autor propone un modelo metabólico que implica un sinergismo con el flúor. en un intento de explicar la endemidad concurrente de fluorosis y arsenismo en el norte de Tanzania. (Aswathanarayana, 2000)

Respecto a las pocas investigaciones efectuadas en México, las evidencias encontradas muestran lo siguiente:

Wyatt y cols (1998) estudiando el agua potable doméstica de pozos y tinacos en Sonora, encontraron un posible vínculo entre arsénico (0.117 ppm, 2 veces más altos que los permitidos) y flúor (7.36 ppm, 3.5 veces mayor que lo permitido), con una correlación positiva entre ambos ($r=0.53$, $P=0.01$, $n=116$); además de hallar altos niveles del Pb (0,05-0,12 ppm) y contaminación con mercurio en 42% de las muestras. (Wyatt y cols., 1998)

Para comprender mejor la gravedad de éste problema, se realizó una recopilación con información de varias fuentes, en la cual se encuentran presentes todos los países (y algunas de sus localidades), cuyas poblaciones actualmente están sufriendo graves trastornos en la salud ó están bajo un gran riesgo, por ser áreas endémicas de contaminación para flúor y arsénico (en sus mantos acuíferos, suelos, depósitos, o contaminación industrial):

Argentina
Australia

China
(Xinjuiang, Guizhou e Inner-Mongolia)

Bangladesh
Estados Unidos de Norteamérica

India
(Bengala y Calcuta)

Japón

México

*(Comarca Lagunera, Durango, Chihuahua y
S. Luis Potosí)*

Nueva Zelanda
Naciones Africanas

(Senegal, Kenya, Tanzania, Etiopía, Uganda)

Sri Lanka

Tailandia.

(FUENTES: UNICEF; Mandal y Suzuki, 2002; <http://www.mindfully.org/Water>; Huang y cols., 1992; Finkelman y cols., 1999; Aswathanarayana, 2000; Grimaldo y cols., 1995; Díaz-Barriga y cols., 1997; World Health Organization, 1996; Ortiz y cols., 1998; Loyola y cols., 1998; Cebrian y cols., 1983; Del Razo y cols., 1990, 1993)

Tomando en cuenta todas las evidencias sobre los efectos tóxicos en los humanos, ocasionados por las exposiciones aguda y crónica, a arsénico (desde dérmicos hasta carcinogénicos) y flúor (desde dentales, hasta neurológicos y genotóxicos) (Mandal y Suzuki, 2002; Tsutsui y Maizumi, 1982; Zeiger y cols., 1993; Meng y Zhang, 1997, www.gine.com/fluoride...), podemos observar el enorme riesgo que corren las personas que viven en las áreas endémicamente contaminadas por ambos elementos, entre las cuales figuran varias regiones de nuestro país (ver la lista anterior).

Bajo el mismo tenor, podemos agregar que una gran cantidad de alimentos y productos de uso cotidiano, pueden contener arsénico y/o flúor los cuales al ser usados en áreas de contaminación endémicas, pueden incrementar la acumulación corporal de estos elementos propiciando que los riesgos a la salud sean mayores, no solo en éstas áreas, sino también en varias localidades del mundo.

Podemos mencionar que es sumamente difícil conocer las cantidades de ambos elementos (As y F) en cada región del mundo, así como la forma en la que los individuos se exponen a cada uno de estos elementos, en forma separada y conjunta. Es por ello que, algunos gobiernos se están preocupando por controlar y disminuir las fuentes de exposición a estos agentes; para así lograr el establecimiento de medidas tendientes a controlar los efectos tóxicos en sus poblaciones. No

obstante, otros gobiernos actualmente no reconocen la existencia de los problemas que éstos generan en la salud pública de sus habitantes, como es el caso de México.

2.0.-Biotransformación y detoxificación

ARSÉNICO.- Los efectos tóxicos del arsénico están muy relacionados con su metabolismo, que es efectuado a través de reacciones secuenciales que involucran tres reducciones electrónicas (gracias al glutatión (GSH), que sirve como un donador de electrones en la reducción del arsenato a arsenito, en soluciones acuosas y de eritrocitos) y tres metilaciones oxidativas (en el que un grupo donador, por parte de la S-adenosil metionina (SAM) debe estar disponible para que estas reacciones procedan).

Al llegar al hígado, **1)** el arsénico pentavalente (^V) es reducido mediante el empleo del glutatión reducido (tiol) por acción de la enzima glutatión-S-transferasa a arsénico trivalente (^{III}), **2)** el cual sufre la primera metilación bajo la acción de la enzima S-adenosil metionina para generar ácido monometilarsonoso. **3)** A continuación, éste último es nuevamente reducido por la glutatión-S-transferasa a ácido monometilarsínico, **4)** que sufre la siguiente metilación gracias a la metiltransferasa, transformándose en ácido dimetilarsoso; **5)** el cual es reducido para formar ácido dimetilarsínico; **6)** que es finalmente metilado para ser excretado en la orina. Recientes estudios efectuados en orina de humanos expuestos crónicamente a iAs en agua potable, detectan la presencia de MMA^{III} y DMA^{III}. (Thomas y cols., 2001; Hughes, 2002)

El siguiente esquema fue propuesto por Cullen y asociados en 1984, para mostrar un panorama general sobre la reducción y metilación del As en el organismo:

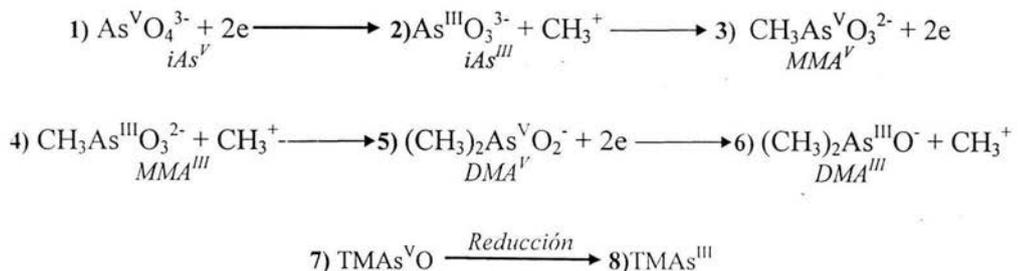


FIGURA 3. Biotransformación del Arsénico. FUENTE: Thomas y cols., 2001

El arsenito también puede ser metilado en una reacción tiol-dependiente, usando a la metilcobalamina como grupo donador metil. Existen evidencias de variaciones interindividuales en la capacidad de la metilación del As, asociadas con la edad y sexo, embarazo, etnicidad, enfermedades intercurrentes, humo del cigarro y beber alcohol; además del estado nutricional (estudios en la población Taiwanesa crónicamente expuesta al arsénico inorgánico (iAs) en agua potable reportan que la mala nutrición es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel; también se ha reportado una asociación sobre la concentración de beta-caroteno en suero, la extensión de la metilación de As, y el incremento en el riesgo de cáncer de piel y enfermedad cardíaca isquémica) y algunas genéticamente determinadas en la capacidad metabólica (modificación en la susceptibilidad de los efectos tóxicos y carcinogénicos del As; o polimorfismos genéticos en la capacidad de absorción, distribución, metabolismo o aclaración de los arsenicales bajo control genético). (Thomas y cols., 2001)

FLÚOR.- El siguiente esquema resume el metabolismo después de la ingestión de fluoruros.

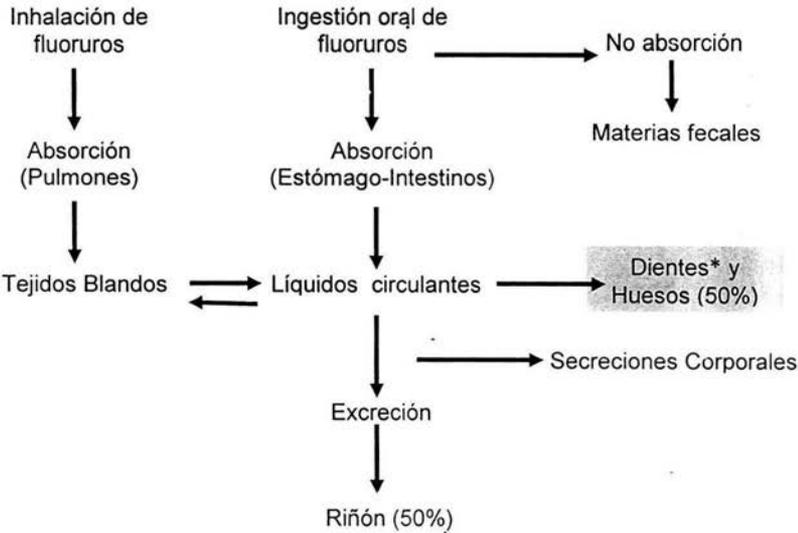


FIGURA 4: Metabolismo del Flúor. FUENTE: Modificado de Herazo, 1988.

El flúor contenido en el organismo humano oscila entre 2 600 y 4 000 mg en un individuo adulto de 70 Kg de peso. Del flúor ingerido en la dieta, entre el 40% y el 100% es absorbido (mayor en soluciones acuosas que cuando está ligado a las proteínas), en el estómago y principalmente en intestino delgado (aprox. 80%), el resto es eliminado a través de las deposiciones. (Ruiz, 1997; Martínez, 2002).

El flúor absorbido pasa al plasma sanguíneo (alcanzando entre 20 y 100 $\mu\text{g}/\text{decilitro}$) para ser distribuido a los diferentes tejidos, donde se mantiene en proporción respecto a las concentraciones en el plasma, gracias a un equilibrio dinámico, ya que el flúor no se encuentra unido a proteínas en el plasma y su difusión a través de las membranas es dependiente de gradientes de pH y no necesita de acarreadores; no obstante esta, regulación plasmática del flúor fracasa cuando el agua de bebida contiene más de 5,4 mg/L de flúor (Ruiz, 1997; Martínez, 2002).

En la sangre, la concentración de flúor inorgánico (dependiendo de la dieta) es de 10-50 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; en tanto que el flúor orgánico (dependiendo de la industrialización del medio y factores ambientales) en el medio rural es de 11 μg frente a 20-28 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ en el medio urbano. (Martínez, 2002)

No existen concentraciones de saturación en los diferentes compartimentos orgánicos, ya que el organismo humano no cuenta con mecanismos de regulación homeostática de flúor; no obstante, la concentración de éste en la leche materna es constante (0.008 ppm) e independiente de la concentración plasmática de flúor de la madre, mismo que puede considerarse como el único mecanismo de regulación homeostática presente en el ser humano. (Ruiz, 1997)

Después de su absorción, la concentración de flúor en los diferentes tejidos, depende de la ingesta y depuración plasmática; donde esta última se efectúa en proporciones iguales ya sea mediante la captación de flúor por tejidos calcificados (dientes y huesos) o por la excreción renal.

La afinidad de los tejidos calcificados por el flúor determina su retención y acumulación en el hueso, siendo mayor en los organismos en crecimiento. En el recién nacido el 90% del flúor absorbido es retenido en el hueso, esta afinidad decrece con la edad y se estabiliza aproximadamente en un 50% del flúor absorbido al completarse el desarrollo del esqueleto, siendo el 50% restante, excretado a través del riñón.

La excreción renal depende de la funcionalidad del riñón y pH urinario. A mayor acidez, la reabsorción tubular de flúor es mayor, pasando al intersticio y luego a los capilares, incrementando el pool plasmático. (Ruiz, 1997)

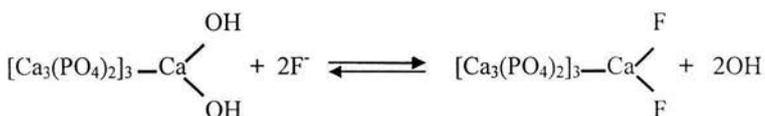
TABLA 5: Concentraciones normales del flúor en los tejidos y fluidos corporales

Tejidos o fluidos corporales	Concentración Normal de Flúor	Comentarios/Referencia
Esmalte Dental	900-1000 mg/Kg	Áreas con poco F ⁻ en el agua. (Berndt and Sterns, 1979)
Dentina	1800-3000 mg/Kg	Promedio 2-3 veces mas alta que en el esmalte. (US NAS, 1971)
Hueso	200-800 mg/Kg (peso seco) entre 20-30 años y 1000-2500 mg/Kg (peso seco) en personas de 70-80 años que consumen 0.5 mg/L de flúor en el agua potable.	Dependiendo del flúor intacto, edad, sexo, tipo de huesos y parte específica del hueso. (Weatherell, 1966)
Músculo	0.05 mg/Kg	(Pais, 1997)
Otros tejidos blandos	>1.0 mg/Kg (peso húmedo.)	Ejemplo: aorta, tendón, ligamentos, cartilago, y placenta prácticamente en equilibrio con el plasma. (US EPA, 1980)
Sangre (plasma)	10-15 µg/L	El flúor cruza la barrera placentaria con solo una barrera parcial existente a altos niveles de flúor. (Ekstrand, 1977)
Orina	>1.0 mg/L	La relación entre la absorción del flúor y su excreción depende del estado de remodelación ósea. (Vandeputte et al., 1977)
Saliva	6.5-9.8 µg/L	(Ekstrand et al., 1977a)
Sudor	Solo un pequeño % del total de flúor intacto	Arriba del 50% del flúor total es excretado durante periodos de intensa transpiración. (Crosby and Shepherd, 1957)

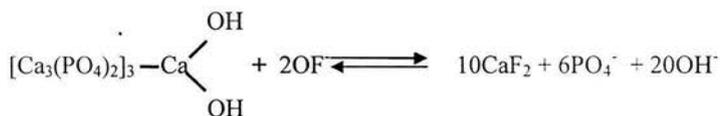
Heces	>0.2 mg/día	El total de la excreción de flúor por los riñones. (US NAS, 1971)
Leche materna	0.01 mg/L or 10 µg/L	Al rededor del 1% de las madres beben el flúor intacto del agua. (Ekstrand et al., 1981b)

FUENTE: <http://www.med.uwo.ca/ecosystemhealth/education/casestudies/fluorosismed.htm>

*La reacción química que se produce para la incorporación de los fluoruros al diente es la siguiente:



A diferencia del flúor sistémico, ingerido a través del agua o la sal, el flúor tópico produce la siguiente reacción química:



Lo anterior radica en la diferencia existente entre el flúor sistémico y el flúor tópico. Tomando como alusión la arquitectura de una pared, el flúor ingerido existe “entre los ladrillos de una pared”, y “la pintura de esa pared” sería el flúor tópico; es decir, el sistémico forma parte de la estructura y el tópico es superficial pero parcialmente duradero; es por ello que los odontólogos recomiendan repetidas aplicaciones. (Herazo, 1988)

Se han detectado incrementos en las cantidades de flúor en la orina y cerebro de animales tratados crónicamente con flúor, lo cual indica que este ión es acumulado en el cuerpo, incluyendo el cerebro. (Guan y cols, 1998.)

2.1.- Metabolismo de arsénico y flúor en conjunto

El conocimiento de la acción en conjunto de estos dos elementos es carente.

Tanto flúor como arsénico entran al cuerpo humano mediante la absorción vía tracto digestivo o por el tracto respiratorio, siendo la primera la mayor ruta de exposición al flúor y arsénico a partir del medio ambiente. Ambos elementos en el agua potable son “casi” enteramente absorbidos por el tracto gastrointestinal; sin embargo, sus valores de absorción en la dieta (10-90%) son bastante variables debido a la influencia de varios factores.

La exposición de ambos vía respiratoria, puede ocurrir en escenarios ocupacionales y a través de eventos accidentales. Los gases de flúor y arsénico son más rápida y enteramente absorbidos vía tracto respiratorio, pero, en comparación con la gran cantidad de flúor y arsénico absorbido por el tracto digestivo, la absorción por el tracto respiratorio es despreciable.

Pocas publicaciones están relacionadas con la absorción por la piel de flúor y arsénico, excepto por algunos usos médicos del As contenido en enyesados y daños accidentales en la piel por ácido fluorhídrico.

Orina, heces, bilis, leche, sudor, epidermis y cabello, pueden eliminar del cuerpo el flúor y el arsénico. La excreción renal juega el papel principal entre todas las vías de excreción. (Zheng y cols., 2002)

En un estudio efectuado por Zheng y cols. (2002), la absorción y excreción de flúor y arsénico fue medida en un grupo de seis voluntarios sanos (3 hombres y 3 mujeres de 20-35 años), sin antecedentes de exposición a flúor y arsénico, a los cuales se les dio de beber agua obtenida a partir de fuentes geológicas naturales procedentes de áreas endémicas de arsenismo y fluorosis, y envenenamientos en conjunto en China, con altas concentraciones naturales de flúor (2.3mg/L), altas concentraciones de arsénico (0.15mg/L); y altas concentraciones de ambos (F 2.25 mg/L, As 0.23 mg/L y F 4.05mg/L, As 0.58 mg/L). Los resultados indican que, para el As, la absorción, en proporción a la excreción urinaria y la vida biológica no muestran diferencias estadísticamente significativas entre beber agua que contiene altas cantidades de As, solo y beber agua que contiene diferentes niveles de altas concentraciones de As y flúor. No obstante, su excreción y retención correlacionaba con el arsénico total intacto.

El efecto del F y As en el cuerpo humano es independiente a pesar de las variaciones en las concentraciones de estos dos elementos en el agua potable. La potencial acumulación en el cuerpo para ambos, flúor y arsénico, es considerado como la base patológica para fluorosis y arsenismo endémicos. Al parecer no hay interacciones entre estos dos elementos con respecto a absorción y excreción. Además, la relación entre excreción urinaria y retención corporal con el total intacto del arsénico es más fuerte en el As que en el flúor, y el arsénico es más capaz de iniciar su acumulación en el cuerpo que el flúor. (Zheng y cols., 2002)

Por otra parte, la absorción de flúor es principalmente transmitida al plasma, mientras el arsénico absorbido se une principalmente a eritrocitos en la rata, y después de su posterior biotransformación, está listo para ser excretado en la orina, en humanos. El flúor usualmente es eliminado en sus formas sin cambios, pero la mayoría del arsénico en el cuerpo debe sufrir un proceso de metilación antes de ser excretado de la orina.

Cerca del 95% del flúor en el cuerpo se acumula dentro del esqueleto y dientes, en tanto que una extensiva distribución en el cuerpo es exhibida por el arsénico con relativamente más alto contenido en la piel y cabello. A pesar de que, tanto fluorosis como arsenismo son desordenes sistémicos crónicos del cuerpo humano, el traslape en la distribución de ambos en algunos órganos y tejidos es inevitable, lo cual hace probable que halla algunas interacciones entre flúor y arsénico en algunos índices biológicos, y que no es contradictorio con el hecho de que existen diferentes procesos metabólicos para arsénico y flúor con respecto a la absorción y excreción. No obstante, estudios experimentales en conejos sugieren un efecto antagonista entre el flúor y el arsénico.

Al parecer, los mecanismos sobre las interacciones entre flúor y arsénico son inciertos. (Zheng y cols., 2002)

Algunos estudios relacionados sobre las interacciones del F y As con otros elementos han reportado lo siguiente: el As acelera la excreción del selenio a través de la bilis; el cadmio reduce la absorción e incrementa la excreción del As; el aluminio promueve la excreción urinaria del flúor; el calcio y fosfato interfieren con la absorción gastrointestinal del flúor y el borato aumenta su proceso de eliminación. Finalmente, las evidencias de las interacciones entre el flúor y el As quedan inconclusas (Zheng y cols., 2002)

Falta página

N° 37

microarreglos de ADN de cadena sencilla muestran que al As^{III} provoca cambios en la expresión de genes que pueden contribuir a la carcinogenicidad y toxicidad, por una simultánea combinación de efectos que incluyen incremento en la expresión de genes que responden al estrés oxidativo (por ejemplo: superóxido dismutasa 1, *NAD(P)H* quinona oxidoreductasa y *serinil treoninacinas 25*), decremento en la expresión de genes asociados con la reparación del ADN (ejemplo: *p53*, *proteína específica del daño de unión el ADN*), e incremento en la proliferación de queratinocitos (por ejemplo; *ciclina G1*, *proteín cinasa C delta*), oncogenes y genes asociados con la transformación celular (ejemplo: *Gro-1* y *V-yes*). (Hamadeh y cols., 2002).

TABLA 6: Cambios en la expresión de genes ocasionados por Arsenito

GENES		MODULACIÓN	GENES		MODULACIÓN
ESTRES			INCREMENTO PROLIFERATIVO		
Metalotioneína Ie		+	Ras		+
Metalotioneína IL		+	GTP-proteína de unión		+
Metalotioneína IH		+	PKC delta		+
Metalotioneína II		+	GTPasa-activación proteína 1		-
Ciclooxigenasa 2		+	GTPasa-activación proteínas (GAP) SH3		-
Tiorredoxina		+	Guanina nucleótido factor de cambio		-
Tiorredoxin reductasa 1 (en tres genes diferentes)		+	GDP-disociación proteína inhibidor		+
Glutación S-transferasa (microsomal)		+	MAP cinasa fosfatasa 3		-
Glutación S-transferasa P		+	Interferon inducible guanilato proteína 2 de unión		-
γ Glutamilsteín sintetasa		+	Interferon inducido transmembranal proteína 2		-
Glutarredoxina		+	Interferon estimulado proteína, 15 kDa		-
Superóxido dismutasa 1 (Cu/Zn)		+	Gu proteína		-
Clusterina		+	Proteína que responde a ácido retinóico		-
Aldehído deshidrogenasa mitocondrial		+	Precursor inducido RIG E de ácido retinóico		-
NAD(P)H quinona oxidoreductasa		+	Receptor γ 1 de ácido retinóico		-
DnaJ proteína homóloga 1, hsp40		+	Proteína 1 que responde al desarrollo temprano		-
DnaJ proteína homóloga 2, hsp40		+	ERG1 proteína 1 de unión		-
Hsp40 homóloga		+	Ciclina G1		+
MAP cinasa fosfatasa 1		+	Factor de transcripción hEZF dedo de Zinc		-
Serina/treonina cinasa 25, Ste20-like		+	Ciclina D2		-
Fosfatasa alcalina		+	Cdc25b		-
Pou factor de transcripción 2		+	Proteína MAD2L1 control mitótico de retroalimentación		-
S100 proteína respondiente a calcio A10		+	MAD, MAX proteína de unión		-
DISMUNICIÓN EN LA REPARACIÓN DEL ADN			Receptor de la transferrina, p90		+
Endonucleasa G		-	PCTAIRE proteína cinasa 3, relacionada a cdc2		+

G/T mismatch-especifica timina ADN glicosilasa	-	FGFR4	+
FLAP endonucleasa 1	-	BIOMARCADORES DE CARCINOGENESIS	
Urasil ADN glicosilasa 2	-	MM-1, proteína de unión a <i>c-myc</i>	+
ADN polimerasa delta	-	P21, Cip1, WAF1	+
APEX nucleasa	-	Encogen CRO 1, estimulación de crecimiento en melanoma	+
XP C	-	Proteína 1 insulina-inducida	+
Proteína de unión 2 específica de unión de daño al ADN (p48)	-	Factor de Crecimiento del tejido conectivo	+
P53	-	Gen A proliferación-asociado	+
ADN polimerasa epsilon	-	Factor 8 Kruppel	+
REV3 subunidad catalítica de ADN polimerasa zeta	-	LUCA C1 tumor supresor	+
Mut S (E. coli) MSH 5	-	Antígeno L6 tumor-asociado	+
Mut Y (E. coli) homóloga	-	Señal transductora 2 Tumor-asociado	+
ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1	-	Oncogen <i>V-yes</i>	+
HnRNP metiltransferasa	-	ADHESIÓN CELULAR/MODELACIÓN ESTRUCTURAL	
SEÑALIZACIÓN		Proteína tirosina fosfato, receptor tipo f polipéptido	-
TNF- α	-	Laminina β 2	-
NF κ B-1, p105	-	Laminina β 4	-
NF κ B-1, p65	-	Matriz metaloproteinasas 2	+
Jun	-	Matriz metaloproteinasas 1 (en dos genes diferentes)	-
Fos	-	Antígeno Bullus pemfigoide, plectina	-
CREB proteína de unión	-	Proteína capping, filamento α 1 actina	+
TGF- β receptor	-	Proteína 2 de unión a colágeno, chaperona	+
TNF tipo 1 receptor asociado a proteína	-	Glicoproteína de membrana celular, antígeno	+
NOTA: (+) inducción relativa; (-) represión. FUENTE: Hamadeh y cols., 2002.			

2.2.3.-Mecanismo de toxicidad de los arsenicales metilados trivalentes

Los intermediarios metilados arsenicales (MMA^{III} y DMA^{III}) presentan una más alta toxicidad aguda in vivo e in vitro, así como una acción genotóxica directa in vitro sobre el ADN, siendo la metilación más que un mecanismo de detoxificación.

Las células humanas son más sensibles a los efectos citotóxicos (en orden creciente de toxicidad) del DMA^{III} que es más tóxico que el MMA^{III} (y los arsenicales inorgánicos), y este a su vez más que el iAs^{III}. Por ejemplo, el MMA^{III} tiene una Dosis letal (DL₅₀) más baja que el arsenito en hámster. La unión del MMA^{III} y DMA^{III} a proteínas *in vitro* ocurre en mayor proporción que con las formas orgánicas pentavalentes. Además, estos metilados trivalentes son detectados en la orina de individuos después de la exposición al arsénico inorgánico. (Hughes, 2002, Styblo et al., 1995)

2.2.4.-Mecanismo de toxicidad del flúor

En los humanos y ratas, el flúor disminuye la actividad de la enzima superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Además, éste elemento se acumula en el cerebro. (Rzeuski y cols., 1998; Guan y cols, 1998.)

La administración crónica oral de flúor en ratas (3-7 meses, 30-100 ppm F-), y su acumulación en el cerebro, ocasiona las siguientes alteraciones, que se cree pueden estar envueltas en la patogénesis de daño cerebral: 1) Desmielinización focal, decremento en las células de Purkinje, espesamiento y desaparición de dendritas, hinchamiento de sustancia de Nissl, y picnosis de neuronas individuales. 2) Decremento inicial en la ubiquinona 9 y 10 y su posterior incremento tardío. 3) Peroxidación de los lípidos de la membrana. 4) Modificación de los fosfolípidos cerebrales (decremento 10 a 20%;) y los lípidos neutrales. 5) Disminución de 15% del contenido de proteínas. 6) Disminución del dolicol. (Guan y cols, 1998.)

CAPÍTULO III CARCINOGENESIS

3.0.-Mecanismos Moleculares asociados a la carcinogénesis

ARSENICO.- El As inorgánico ha sido clasificado por la International Agency for Research on Cancer (1980, 1987) y por la US Environmental Protection Agency (1988) como un conocido carcinógeno humano. Existe suficiente evidencia para clasificar al arsénico como un carcinógeno en los humanos, no así en los animales de laboratorio. En varios estudios, el efecto carcinogénico no se ha presentado en animales después de cierto tiempo de exposición a arsénico inorgánico en agua potable (As 5 ppm), la dieta (As, 5-125 ppm) o después de intubación oral (0.1 mg/Kg arsenato, 5 días/semana); reportándose en ratas, perros y monos. Sucede lo mismo en cuanto al no-desarrollo de tumores. No obstante, ha habido varios reportes positivos sobre la carcinogenicidad del arsénico en modelos animales cuyo mecanismo de acción es desconocido (en 1980 sobre hámsteres vía intratraqueal; Gernolec en 1997, ratones transgénicos con el oncogen mutante *v-Ha-ras*). (Hughes, 2002)

Respecto a los mecanismos propuestos para la carcinogenicidad del arsénico en humanos, se encuentran genotoxicidad, proliferación celular, alteración en la reparación del DNA y metilación del DNA por estrés oxidativo, co-carcinogenesis, y promoción de tumores.

Por todo lo anterior, es difícil definir un solo mecanismo de acción para la carcinogenicidad del arsénico. (Hughes, 2002; Hamadeh y cols., 2002)

FLÚOR.- Pese a que la exposición al flúor no ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer, comparte con el arsénico varios mecanismos como son: genotoxicidad, alteración en la reparación del ADN y estrés oxidativo. (Zeiger y cols., 1993)

3.1.-Estudios de Genotoxicidad *in vitro*

La Genética Toxicológica es una disciplina encargada de identificar y analizar la acción de los agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos (compuestos genotóxicos). Su objetivo primordial es detectar y entender las propiedades de los

agentes genotóxicos físicos y químicos que producen efectos hereditarios, desde deletéreos hasta letales.

A finales de los setentas se demostró que existe una correlación en la inducción de mutaciones y el desarrollo de algunos tipos de cáncer por diversos agentes químicos. Esta correlación se estableció debido a que la mayoría de los carcinógenos interactúan directa o indirectamente con los ácidos nucleicos, y por lo tanto tienen la capacidad de producir cambios heredables.

Para poder establecer la correlación existente entre la exposición a los agentes xenobióticos de estudio y la inducción de alteraciones genéticas en las células de los organismos, hemos recurrido a esta ciencia multidisciplinaria; la cual nos ayudará a definir los efectos que estas toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos.

(Carballo Marta; <http://omega...>)

ARSÉNICO.- El arsénico inorgánico es mutagénico en los ensayos estándar con microorganismos; sin embargo, el iAs^{III} induce mutaciones por deleciones (multilocus) en células híbridas de hámster y humanas.

Aberraciones cromosómicas (GAPS), agujeros en las cromátides, rupturas y fragmentación, endoreduplicación, y rupturas en las cromátides; dependientes de la dosis y mayores en arsenito que en el arsenato; entrecruzamientos DNA-proteínas e intercambio de cromátides hermanas han sido observadas sobre células embrionarias de hámster, linfocitos humanos y fibroblastos después de la exposición a arsénico inorgánico.

Los metilados pentavalentes son genotóxicos a dosis mucho más grandes que los arsenicales inorgánicos. Los efectos incluyen tetraploidías en exceso (DMA^V , $TMAO^V$), arresto mitótico (MMA^V , DMA^V y $TMAO^V$), rupturas en ADN de cadena sencilla (DMA^V) y entrecruzamientos ADN-proteína.

Estudios recientes muestran que MMA^{III} y DMA^{III} son directamente genotóxicos y dañan también al DNA de linfocitos humanos, siendo 386 y 77 veces más potentes, respectivamente, que el arsenito. (Hughes, 2002)

FLÚOR.- El F⁻ no es mutagénico en sistemas bacteriales estándar, pero induce aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (presentes en los loci *tk* y *hgpri* en linfoblastos humanos, y ausentes en *hgpri* en hígado de rata y *tk* en ovario de hámster Chino), y en cultivos de células de

mamíferos. Existe un desacuerdo en varios estudios en cuanto a la habilidad del F⁻ para inducir aberraciones cromosómicas en cultivo de células humanas y de roedores, no obstante, varios autores han llegado a la conclusión de que la exposición al F⁻ genera un incremento en las aberraciones cromosómicas en dichos sistemas. El NaF induce primeramente rupturas de cromátides y GAPS de cromátides, indicando que las células de roedores responden en la fase G2 del ciclo celular. En contraste, estudios con células humanas sincronizadas indican que la fase S es más sensitiva (más efectiva cuando el tratamiento ocurre en los estadios inicial y medio de la fase S del ciclo celular, y menos efectiva en el tardío de la fase S al igual que en G2; con sensibilidad nula en G1).

Las mutaciones génicas se presentan en cultivos de células de roedores y humanos en la mayoría de los estudios. Desafortunadamente, varios estudios citogenéticos *in vivo* e *in vitro* han sido denominados por varios autores como “de cuestionable utilidad” en cuanto a los protocolos usados, la calidad de las respuestas reportadas, o las interpretaciones de los datos. (Zeiger y cols., 1993)

A continuación se presenta una tabla realizada por Zeiger y colaboradores (1993), que recopila los efectos citotóxicos de algunas especies de flúor sobre diversos sistemas celulares mamíferos.

TABLA 7: Efectos citogenéticos del Flúor en Cultivo de células de mamífero

Tipo celular	Parámetro evaluado*	Rango dosis	L.E.D.	Resultado	Protocolo y comentarios	Referenc.
<i>Células de roedores</i>						
DON	ABS	25-75 µg/ml	25 µg/m	+	Anafase-telofase células señaladas;12, 24, y 36 hr exposición, el valor espontáneo fué inusualmente alto	Bale and Mathew, 1987
CHO	ABS	1-1,276 µg/ml	25 µg/m	+	3 y 4 hr exposición, cosecha a 3, 8 y 20 hr, en G2 células mas sensibles	Aardema et al, 1989
CHO	ABS	16-1,600 µg/m	400 µg/ml	+	Positivo a 12 hr cosecha. S9	NTP, 1990

Tipo celular	Parámetro a evaluar*	Rango dosis	L.E.D.	Resultado	Protocolo y comentarios	Referencia
SHE	ABS	50-200 µg/m	50-µg/ml	+	16 y 28 hr exposición: las rupturas (GAPs) fueron vistas como daños primarios	Tsuitsui et al., 1984b
CHL	ABS	31-500 µg/ml		-	18, 24 y 48 hr de muestreo; +/- S9	Ishidate, 1987
CHO	SCE	1.6-1,600 µg/ml	66.7 µg/ml	+	Positiva a 31 hr cosecha	NTP, 1990
CHO	SCE	0.05-6.3 mM (2.1-265µg/ml)		-	2 hr exposición	Li et. al, 1987d
CHO	SCE	2-160 µg/ml		-	24 hr exposición; >ó = 80 µg/ml tóxico.	Tong et. Al., 1988
SHE	SCE	20-80 µg/ml	20 µg/ml	+	24 hr exposición	Tsutsui et al., 1984b
Monofluorofosfato de sodio (Na₂FPO₃)						
CHL	Abs	500-4000 µg/ml		-	18, 24 y 48 hr muestreo; +/- S9	Hishidate 1987
Otras células						
Red muntaj	ABS	0.3-3.0 mM (12.6-126 µg/ml)	0.3mM	+	2 hr tratamiento señaladas a 4hr, en Chino.	He et al., 1983
Red muntaj	SCE	0.03-3.0mM (12.6-126 µg/ml)	3.0mM	+	2 hr tratamiento	He et al., 1983
Células humanas						
Linfocito	ABS	20,40 µg/ml	20 µg/ml	+	28 hr exposición;-S9	Albanese 1987
Linfocito	ABS	0.26, 1.05 mM F(10.9, 44.1 µg/ml)		+	21 hr exposición; primariamente rupturas de cromátides	Sato et al., 1989
Leucocit.	ABS	0.03-3.15 mM F(1-132 µg/ml)	0.03mM	+	24 hr exposición	Himczak y Skotarczak, 1978

Continuación de la TABLA 7...

Linfocito	ABS	0.1-1.01mM (4.2-42 µg/ml)		-	2 hr exposición; +/- S9	Gebhart et al., 1984
Linfocito	ABS	0.25-10 ppm (0.25-10 µg/ml)		-	24, 48 y 72 hr exposición	Kralisz y Saymani ak, 1978
Linfocito	ABS	1-16 ppm (1-16 µg/ml)		-	24 hr exposición	Matsuda 1980
Linfocito	ABS	0.3-3.0 µM (12.6-126 µg/ml)		-	48 hr exposición	Thomso n et al., 1985
Leucocit.	ABS	1.0, 3.0 µM		-	2 hr exposición; no es claro en algunos tipos de ABS anotadas	Voroshil in et al., 1973
Leucocit.	ABS	1µM (42 µg/ml)		-	53 hr exposición	Slacik- Erben y Obe, 1976
Linfocito	SCE	2-160 µg/ml		-	72 hr exposición, 160 microg/ml tóxico.	Tong et al., 1988
Linfocito	SCE	0.1-10 µM (4.2 420 µg/ml)		-	48 hr exposición	Thomso n et al, 1985
Fluoruro de potasio (KF)						
Linfocito	ABS	0.03-3.0 µM (12.6-126 µg/ml)		-	48 hr exposición	Thomso n et al, 1985
Linfocito	SCE	0.1-10 mM (4.2-420 µg/ml)		-	48 hr exposición	Thomso n et al, 1985
*Parámetro a evaluar: ABS= Aberraciones cromosómicas, SCE= Intercambio de cromátidas hermanas						

3.2.-Co-mutagénesis

ARSÉNICO.- El arsénico inorgánico (As_2O_3 , iAs^{III} , iAs^V), es co-mutagénico con otros químicos (junto con el diepoxibutano en linfocitos ocasiona aberraciones cromosómicas debido a entrecruzamientos del ADN por el agente), radiaciones electromagnéticas y luz ultravioleta (aberraciones cromosómicas y mutaciones en células ováricas de hámster Chino) en células de mamíferos.

FLÚOR.- No se ha reportado este efecto.

3.3.-Co-carcinogénesis

ARSÉNICO.- Estudios de tumorigenicidad sobre animales bajo la interacción del As_2O_3 con benzo(a)pireno (presente en el humo del tabaco), muestra que los tratamientos de estos químicos, juntos y por separado desarrollan papilomas, adenomas y carcinomas a lo largo del tracto respiratorio; encontrándose en mayores cantidades al administrarse conjuntamente que en tratamientos por separado.

El arsenito es carcinogénico con radiaciones UV en la piel de ratones, con un incremento de 2.4 veces más en tumores, más grandes e invasivos que solo con radiación UV. (Hughes, 2002)

FLÚOR.- No se ha reportado este efecto.

3.3.1.-Genotoxicidad in vivo

ARSÉNICO.- El arsenito en ratones, genera un incremento dosis-dependiente en la formación de eritrocitos micronucleados policromáticos de células somáticas; en medula ósea se presentan aberraciones cromosómicas (agujeros en las cromátides ó GAPS, rupturas, y rearrreglos); y en pulmones y células parenquimatosas del hígado (suficientes en colina) se presenta un incremento de entrecruzamientos en el ADN después de exposiciones simples o múltiples. De la misma forma, el

DMA^V genera rupturas de ADN de cadena sencilla y entrecruzamientos ADN-proteínas en pulmones de ratones y ratas (Yamanaka et al., 1989^a, b, 1991; Brown et al., 1997; Hughes, 2002).

FLÚOR.- De acuerdo con Zeiger y colaboradores (1993), la capacidad del F⁻ como productor de daño cromosómico *in vivo* se puede considerar como irresuelta, ya que parece existir un conflicto entre varios estudios citogenéticos *in vivo* que es difícil de reconciliar. Hay reportes que muestran un incremento en las aberraciones cromosómicas en médula ósea y testículos de ratón, pero otros estudios, usando protocolos y rangos de dosis similares, reportan una no inducción de daño cromosómico. Algunos de los estudios han sido desarrollados a niveles tóxicos de F⁻, en tanto que otros, que muestran resultados positivos, fueron a concentraciones de F⁻ (1-5 ppm) equivalentes a los niveles de exposición humana.

Muchos resultados positivos han sido obtenidos con células en anafase, no obstante, similares protocolos de tratamiento en otros laboratorios muestran resultados negativos con células en metafase. Existen hallazgos de rupturas cromosómicas en anafase y metafase. (Zeiger y cols., 1993,)

En 1982, Tsutsui y Maizumi, al tratar células con 34 y 45 ppm flúor, encontraron que éstas habían adquirido la capacidad de proliferar de 50 a 200 días adicionales; además de desarrollar una fuerte capacidad de formación de tumores. Entre 100 y 200 días después, las células tratadas (34 y 45 ppm) fueron trasplantadas sub-dérmicamente en dos grupos de 10 hámsteres, mostraron los animales la aparición de tumores. De todos los sobrevivientes, tres hámsteres del grupo que recibió las células tratadas con 34 ppm desarrollaron cáncer en el sitio de la inyección; asimismo, ocho de los sobrevivientes con trasplantes de células tratadas a 45 ppm desarrollaron cáncer. Ninguno de los hámsteres que recibió células control desarrolló cáncer.

(www.gjne.com/fluoride...)

En el 2002, usando 25 bases de datos electrónicas, e incluyendo 214 estudios, McDonagh y colaboradores publicaron una revisión acerca de la seguridad y eficacia de la fluorización del agua potable; de 26 estudios, asociados con la fluoración del agua y cáncer, la incidencia de cáncer y mortalidad fue encontrada en 2 estudios con una significativa asociación, además de 20 análisis sobre cáncer de huesos. (McDonagh y cols., 2002)

En 1997, Meng y Zhang, estudiando los efectos de la exposición crónica de trabajadores (en una fábrica de fertilizantes) a los contaminantes del aire, principalmente HF y SiF₄, encontraron incrementos significativos en las aberraciones cromosómicas (en su mayoría: anillos, translocaciones y cromosomas dicéntricos) y micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica de los trabajadores. Estos autores resaltan el potencial tóxico de estos compuestos ya que, a pesar de que la concentración de los contaminantes químicos era baja, fue capaz de causar daño al material genético (a nivel cromosomal), pese a que la salud en general de los trabajadores de la fábrica era buena. También observaron que el daño cromosómico disminuyó aquellos trabajadores que habían laborado por más de 10 años en la fábrica; debido, probablemente al inicio de mecanismos de adaptación producidos por los contaminantes químicos, o a un equilibrio iniciado entre el daño cromosómico, la muerte de linfocitos y la renovación de éstos, y/o al daño al ADN y la reparación en estas células. (Meng y Zhang, 1997)

Respecto a sus mecanismos de genotoxicidad, el flúor no es un típico químico mutagénico, ya que no es capaz de formar aductos sobre las bases del ADN o de intercalarse dentro de la estructura secundaria del mismo. Los resultados de muchos estudios son conflictivos, y no ofrecen una clara visión de organismos o tipos celulares que son afectados por el flúor, o que responden a éstos efectos genéticos. No obstante, se sabe a cerca de la interacción del flúor con componentes celulares.

Existen especulaciones a cerca de los mecanismos de la toxicidad genética, basados en reacciones del flúor en solución con cationes divalentes o nucleótidos.

El NaF inhibe a ambos, proteínas y síntesis de ADN en cultivos de células de mamíferos. (Guan y cols, 1998; Zeiger y cols., 1993). La inhibición de la síntesis de ADN puede ser un efecto secundario sobre la inhibición de la síntesis proteica, ó bien, el resultado de la inhibición directa de la ADN polimerasa o de la síntesis de enzimas asociadas al ADN. El flúor puede reaccionar con cationes divalentes en la célula, y ésta interacción puede conducir a la interferencia con las actividades enzimáticas necesarias para la síntesis de ADN o ARN, o el metabolismo cromosómico o el mantenimiento; este puede reaccionar directamente con el ADN como parte de un complejo; ó esto podría irrumpir en otros procesos celulares como la diferenciación o el metabolismo energético. Al parecer, no existen reportes que relacionen los efectos genotóxicos por interacción directa del F⁻ con el ADN. (Zeiger y cols., 1993)

3.4.-Amplificación de genes

ARSÉNICO.- El arsénico genera la amplificación de genes para la enzima dihidrofolato reductasa. La amplificación génica por arsenito esta envuelta en los efectos carcinogénicos, a pesar de que el arsénico no es un mutágeno puntual, si es carcinogénico, siendo amplificados los oncogenes en varios tumores de animales y humanos. (Hughes, 2002)

FLÚOR.- No se ha reportado este efecto.

3.5.-Alteración en el sistema de reparación del ADN

ARSÉNICO.- La inhibición de la reparación del DNA es inhibida en células tratadas con arsénico, la cual puede resultar en un efecto co-mutagénico con rayos X, luz UV, y varios químicos, conllevando finalmente a un evento genotóxico. La reparación por excisión de dímeros de timina es inhibida en los fibroblastos humanos por iAs.

El arsénico inorgánico trivalente (iAs^{III}) inhibe indirectamente la actividad de la DNA ligasa por alteración celular en los niveles redox o afectando las señales de las vías de transducción y fosforilación de proteínas que interactúan en la actividad de la DNA ligasa.

El arsenito puede inhibir a la enzima poli-(ADP-ribosa) polimerasa (que posee dos grupos sulfhidrilo vecinos), generando un decremento en la actividad dosis-dependiente (50% actividad enzimática y 80% viabilidad celular) en células eucarióticas. Ésta enzima se encarga de la reparación de rupturas de cadena del DNA. (Hughes, 2002)

El As^{III} altera la expresión de genes relacionados con la reparación/replicación del ADN, en una relación dependiente del tiempo y la dosis; disminuye la regulación de varios genes como el gen supresor de tumores *p53*, *cdc25b* (esencial para la iniciación de la mitosis) y la proteína *MAD2* que controla la retroalimentación mitótica en el ciclo celular para que las células salgan de la mitosis. También reduce la expresión de varios genes encargados de la reparación al ADN como la *Mut S* homóloga 5 (*MSH5*, envuelta en la recombinación), la nucleasa *APEX*, (enzima reparadora del ADN con actividades exonucleasa y endonucleasa apurinica/apirimidinica), la *DNA polimerasa delta* y proteína 2 específica de daño de unión al ADN. (Hamadeh y cols., 2002)

El mecanismo de inhibición de la reparación ha sido atribuido a la unión física por afinidad del As^{III} a los grupos ditiolos vecinos inherentes a las enzimas reparadoras. (Hamadeh y cols., 2002)

FLÚOR.- El fluoruro de sodio (NaF) inhibe a ambos, proteínas y síntesis de ADN en cultivo de células de mamíferos; probablemente la inhibición de la síntesis de ADN puede ser un efecto secundario de la inhibición de la síntesis de proteínas, como resultado de la inhibición directa de la ADN polimerasa. Existen reportes conflictivos sobre la habilidad del NaF para producir síntesis de DNA no programada, que es una medida de la reparación del ADN. El NaF a dosis mayores de 160 $\mu\text{g/ml}$ no induce síntesis no programada en hepatocitos primarios de rata marcados por autorradiografía, sin embargo es positiva en fibroblastos humanos y queratinocitos orales humanos por arriba de 400 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, al usar conteo centellante. (Zeiger y cols., 1993)

3.6.-Alteración en la metilación del ADN

ARSÉNICO.- El arsenito incrementa la metilación de las citosinas presentes dentro del gen supresor de tumores p53. La habilidad de los factores de transcripción para unirse al DNA, la cual modifica la expresión del gen, puede estar alterada por la citosina metilada.

El DNA de células hepáticas transformadas de rata, por arsenito, está globalmente hipometilado dependiendo de la dosis y cantidad de exposición, pudiendo resultar en una expresión de genes aberrante, y conduciendo a la transformación de las células. Se ha observado que en las células transformadas los niveles de S-adenosil metionina (SAM) están disminuidos.

Después de la exposición a arsenito por varias semanas pueden existir ambos estados de hipo e hipermetilación del ADN, siendo más importante la alteración en la metilación de una secuencia específica del ADN que el nivel absoluto de la metilación del ADN. De esta manera, la alteración en la metilación del ADN puede jugar un papel prominente en el desarrollo de cáncer. (Hughes, 2002)

FLÚOR.- No se ha reportado este efecto.

Falta página

N° 51

reducción de quinonas, quinoniminas y azos, protegiendo a las células contra los radicales libres y ROS mediando la mutagenicidad y carcinogenicidad). (Hamadeh y cols., 2002)

También se han observado cambios en la expresión de genes de reparación del ADN correlacionados con cambios en la expresión génica al estrés oxidativo en queratinocitos. Cuando éstos son pre-tratados con concentraciones no tóxicas (5 μM) de N-acetilcisteína (NAC, protectora por sus propiedades nucleofílicas y antioxidantes) por 2 hr, antes de la exposición a 5 μM de As^{III} por 24 hr, se observa una atenuación parcial o completa de las alteraciones génicas mediadas por el As^{III} en el caso de *p53*, *PKC delta* y *cdc25b* (decrece 1.5-4.5 veces). (Hamadeh y cols., 2002)

Usando NAC para elevar el glutatión (GSH) intracelular (central en la detoxificación), se ha observado que los niveles elevados de GSH pueden atenuar cambios no específicos en la expresión génica mediada por el As^{III} en queratinocitos antes de la exposición al As^{III} . (Hamadeh y cols., 2002)

FLÚOR.- El flúor estimula el estallido respiratorio y la producción de radicales superóxido en neutrófilos de humanos, conejos y conejillos de indias. (Rzeuski y cols., 1998)

Las altas concentraciones de flúor inhiben a la superóxido dismutasa (SOD). En leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos, los efectos producidos por $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$ (dependientes de las concentraciones de flúor) no se superponen al agregar SOD exógeno y/o catalasa (CAT), prevaleciendo los radicales superóxido a altas concentraciones de flúor. El efecto de los radicales libres sobre las enzimas (superóxido dismutasa [SOD] y glutatión peroxidasa [GSH-Px]) genera un decremento en su actividad, lo cual ocurre en personas que viven en áreas endémicas de fluorosis, lo cual puede generar peroxidación de los lípidos de la membrana. (Guan y cols, 1998; Rzeuski y cols., 1998)

También puede desequilibrar la producción de antioxidantes que lidian con los radicales libres como son el ácido ascórbico y el glutatión (GSH), o la funcionalidad de enzimas protectoras como son la ascorbato peroxidasa y la SOD. (Rzeuski y cols., 1998)

Otro antioxidante, cuya producción se ve alterada por efecto de las especies reactivas de oxígeno, es la ubiquinona. Las ubiquinonas son lípidos endógenos solubles, que se encuentran presentes en todos los tejidos y membranas, y que son indispensables para la eficiente actividad respiratoria y la fosforilación oxidativa. Existe un número de estudios que demuestran que el papel de estos lípidos

en el cerebro es una de las medidas preventivas antioxidantes contra los efectos de los radicales libres y los metabolitos reactivos de oxígeno. Se ha observado un decremento inicial en las ubiquinonas, en la intoxicación con flúor, que puede ser causado por estrés peroxidativo; mismas que se incrementan de manera tardía, probablemente como una reacción compensatoria de las células para protegerse a sí mismas contra los radicales libres. Los cambios en la ubiquinona sugieren que los radicales libres pueden ser una parte importante en los mecanismos patológicos de la fluorosis. (Guan y cols, 1998.)

Por otro lado, algunos estudios han reportado que los radicales libres pueden generarse como un efecto secundario a la liberación de histamina, en cultivos de células cebadas de ratón previamente incubadas con flúor. Otro efecto relacionado con la producción de radicales hidroxilo por la presencia de iones flúor, ha sido observado en macrófagos de hígado de rata; en donde la liberación de ácido araquidónico (a través de su cascada) es capaz de producir estos radicales, que pueden dañar a las células vivas por intensificación de la peroxidación de lípidos. Resultados similares han sido observados con respecto a los leucotrienos en neutrófilos humanos. (Rzeuski y cols., 1998)

Los radicales pueden también formarse con la participación de radiación ionizante. La irradiación de cristales de fluoroapatita, que contienen varias cantidades de flúor, producen dobletes y singuletes con cantidades por arriba de 1.82% de contenido en flúor.

A pesar de numerosos reportes, la relación del flúor en reacciones de los radicales libres no queda clara. (Rzeuski y cols., 1998)

3.8.-Proliferación celular

ARSÉNICO.- El dimetil arsénico pentavalente (DMA^{V}) genera un incremento en la proliferación celular en vejiga y en riñón de rata después de su administración oral, mostrando la primera un incremento en la alteración superficial del epitelio y proliferación de células uroteliales.

El arsenito, en hígado de rata genera engrosamiento epidermal e hiperqueratosis; en cultivo de queratinocitos humanos ocasiona proliferación. A bajas dosis, iAs^{III} , MMA^{III} y DMA^{III} estimulan la proliferación de queratinocitos epidermales normales y aumentan la secreción de citosinas promotoras del crecimiento. Los múltiples genes y proteínas de las señales proliferativas y la mitogénesis en fibroblastos murinos es afectada por el arsenito. Fibroblastos expuestos al arsenito y

posteriormente estimulados con factor de crecimiento epidermal entran en la fase S del ciclo celular, incrementando la expresión de reguladores positivos de proliferación (*c-myc* y E2F-1) y disminuyendo la expresión de reguladores negativos (MAP cinasa fosfato-1 y p21^{kip1}).

La expresión de la ciclina D (proteína requerida en el ciclo celular que a la par con cdk4 y 6 inactivan a pRb, principal responsable del control anti-crecimiento) es incrementada a bajas dosis de arsenito. De esta manera, la proliferación celular incontrolada puede resultar en citotoxicidad y consecuentemente en regeneración de las células y/o directamente en mitogénesis. (Hughes, 2002)

De acuerdo con estudios realizados por Hamadeh y cols. (2002), el arsénico trivalente (As^{III}) modula la expresión de genes asociados con el incremento proliferativo, decremento en la reparación del ADN, e incremento en el estrés oxidativo en queratinocitos normales epidermales no transformados. El As^{III} modula la expresión de transcritos asociados con un incremento en la proliferación celular, como la *ciclina G1*, *proteína cinasa C delta*, oncogenes y genes asociados con la transformación celular (como *Gro-1* y *V-yes*); mismos que correlacionan con un incremento dosis-dependiente en la proliferación celular (48 hr de exposición) y en la mitosis (24 hr de exposición). (Hamadeh y cols., 2002)

La expresión de genes relacionada con la transducción de señales proliferativas es alterada post-tratamiento con As^{III}, generando descensos en la regulación de proteínas *tirosina fosfatasas* y diferenciación de genes, así como un incremento en la expresión de la *proteína cinasa C delta* y varios factores de crecimiento. Es por ello que Hamadeh y cols. (2002), sugieren que la proliferación asociada a la exposición de As^{III} puede estar mediada por múltiples mecanismos, como alteraciones en los reguladores del ciclo celular como la *Ciclina G1*, (sobre-regulada en proliferación tisular y rápida división celular), el descenso en la regulación de reguladores negativos de proliferación como la señal de la proteína *tirosina fosfatasa*, TGF- β o *TNF- α* . (Hamadeh y cols., 2002)

El gen PKC delta, sobre-regulado por As^{III} en queratinocitos, juega un papel importante en la activación de AP 1 en células JB6 inducida por arsénico en las vías de *MAP cinasa* (ejemplo: *ERKs*, *JNKs*, y *p38 cinasas*). Las alteraciones en *PKC delta/Ca²⁺* relacionadas con la señalización pueden contribuir al anormal crecimiento celular y diferenciación en la piel, a la par con el decremento en la expresión de genes asociados con la diferenciación como la *proteína responsiva al ácido retinóico*,

el precursor *RIG* inducido por el ácido retinóico, y el receptor γ 1 del ácido retinoico en células tratadas con As^{III} . El arsénico puede inducir a *MAP cinasa* y estrés relacionado con las vías de transducción de señales. Las proteínas *STE20* homologas (como *STK25*) implicadas en mamíferos en las vías de *MAP cinasa* como importantes transductores de oxidantes que median las señales a partir de GTPasas de la familia de *p21*, son activadas por estrés celular, y su expresión es elevada post-inducción As^{III} , mismas que están implicadas en la transducción de señales mitogénicas y de estrés mediadas por As; que pueden contribuir a la toxicidad y carcinogénesis en la piel. (Hamadeh y cols., 2002)

Múltiples estudios indican que el As^{III} influye la proliferación celular y la función del ciclo celular; las células que entran en mitosis se incrementan después de la exposición a 0.005-0.5 μM . Ocurre lo contrario en el índice mitótico a 5 μM a 2, 4, 6 y 8 horas de exposición, donde, al parecer es inducido un arresto en G_2/M . (Hamadeh y cols., 2002)

FLÚOR.- Tsutsui y Maizumi (1982) observaron que, en cultivos celulares con 34 y 45 ppm de flúor, las células desarrollan capacidades proliferativas. (ver: Genotoxicidad *in vivo*)
(www.gjne.com/fluoride...)

3.9.-Transformación celular

ARSENICO.- El arsenato y arsenito de sodio inducen una transformación dosis-dependiente en células embrionarias de hámster Sirian y células BALB/3T3, siendo el segundo de 4 a 10 veces más potente en la inducción de transformación, debido a una mas grande cantidad intacta en la célula. El análisis citogenético en células BALB/3T3 muestra endorreduplicación, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas. (Hughes, 2002)

La alteración en la expresión de genes inducida por arsénico trivalente (As^{III}) en queratinocitos puede conducir a eventos transformantes o carcinogénesis; con base en el incremento de varios biomarcadores asociados con transformaciones o tumores en queratinocitos tratados con As^{III} . Por ejemplo, los oncogenes *gro-1*, *v-yes*, *tumores asociados con la señal de transducción 2*, *el antígeno L6* (asociado a tumores), *proteínas capping*, y *MM-1*, muestran una inducción dependientes de la dosis y tiempo. También se observan descensos en la regulación de productos génicos relacionados

con la adhesión celular (documentada en varios cánceres), como la *laminina beta 2*, *metaloproteinas 1 e integrina beta 4*.

Al parecer estas alteraciones por la acción carcinogénica del As^{III} han sido observadas en células de carcinoma escamoso, en poblaciones humanas expuestas a relativamente altos niveles de arsénico en agua potable. (Hamadeh y cols., 2002)

FLÚOR.- El flúor genera un incremento dosis -dependiente en la frecuencia y morfología de las colonias transformadas de células SHE (50-100 $\mu\text{g/ml}$ NaF o Na_2FPO_3). La administración a células SHE y la inyección antes del nacimiento en hámster Sirian, (75 o 100 $\mu\text{g/ml}$ de NaF), produce formación de fibrosarcomas anaplásicos. El NaF y Na_2FPO_3 usados en conjunto con benzo(a) pireno muestran actividad promotora en células SHE *in vitro*. (Zeiger y cols., 1993)

En Agosto de 1982, en la sociedad Japonesa para la Investigación de Cáncer, el profesor Takeda Tsutsui y el Dr. Maizumi, comentaron que a 24 horas de contacto con soluciones del fluoruro de sodio a concentraciones de 34, 45, y 57 ppm (ion F^-), se generan cambios morfológicos y transformaciones malignizantes en células fetales de hámster de segunda generación.

(www.gjne.com/fluoride...)

3.10.-Promoción de tumores

ARSÉNICO.- El dimetil arsénico pentavalente (DMA^V), es un promotor de tumores en múltiples órganos (vejiga urinaria de rata, riñón, hígado, y glándula tiroideas; y pulmón de ratón) de ratas y ratones. (Hughes, 2002)

Se ha observado una elevada actividad de NADPH quinona oxidoreductasa por exposición al As^{III} , tanto en tejidos pre-neoplásicos como en el establecimiento de tumores. (Hamadeh y cols., 2002)

FLÚOR.- Se ha observado la aparición de tumores en hámsteres con trasplantes de células previamente tratadas con flúor. (ver: Genotoxicidad *in vivo*) (www.gjne.com/fluoride...)

3.11.-Otros sitios blanco

3.11.1.-Arsénico

Los múltiples incidentes ocasionados por la exposición a arsénico (a través de sus diferentes vías) han permitido conocer y estudiar sus efectos sobre diversos órganos, como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 8: Efectos adversos ocasionados por la exposición a Arsénico

<i>Efectos</i>	<i>Manifestaciones</i>	<i>Comentarios</i>
Respiratorios	Laringitis, bronquitis, rinitis, faringitis, dificultades respiratorias, congestiones nasales y perforación del septo nasal.	Humanos expuestos al arsénico inorgánico, de forma natural u ocupacional.
Pulmonares	Enfermedades pulmonares	Ingesta crónica de arsénico, en residentes de Antofagasta, Chile, oeste de Bengala.
Cardiovasculares	1.-Enfermedad de Raynaud: Corazón y arterias periféricas, infarto al miocardio, despolarización miocárdica, arritmias cardíacas. Perdida progresiva de la circulación en manos y pies, dolor, gangrena en las extremidades. Elevado riesgo de muerte por enfermedades cerebro vasculares. 2.-Hipertensión.	1.-En Taiwán, ingestión de agua contaminada con arsénico, dependiendo de la duración y niveles de exposición. 2.-Bangladesh.
Gastrointestinales	1.-Boca seca, náuseas, dolor abdominal y diarrea moderada. 2.-Irritación gastrointestinal, esofagitis o colitis, anorexia, mala absorción y pérdida de peso.	Intoxicaciones sub-agudas a bajas dosis. 2.-Bajas dosis, crónicamente.
Hematológicos	1.-Sistema hematopoyético: anemia (normocrómica, normocítica, aplásica y megaloblástica) y leucopenia (granulocitopenia, trombocitopenia, mieloides, mielodisplasia), por hemólisis directa, efectos citotóxicos o supresión de eritropoyesis.	1.-Exposición oral aguda y crónica. Eritrocitos humanos 1000 veces más sensibles al arsenato que al arsenito. Hemólisis con disminución de GSH intracelular, oxidación de grupos sulfhidrilo: hemocianina de Fe^{2+} a Fe^{3+} . La hemoglobina se combina con arsénico.
Hepáticos	Cirrosis, hipertensión portal, degradación de las grasas y neoplasia hepática primaria. Varices esofágicas. Infiltración de grasas, colangitis, colecistitis.	Acumulación del As por repetidas exposiciones (crónico). Daño mitocondrial. Interferencia en el metabolismo de porfirinas. Enzimas hepáticas elevadas en trabajadores expuestos por

		inhalación de polvos de As.
Renales	Daño en capilares, túbulo y glomérulo, conducentes a hematuria, proteinuria, o liguria, shock y deshidratación (con riesgo de falla renal), necrosis cortical y cáncer.	Acumulación de iAs por repetidas exposiciones. Mayor ruta de excreción y conversión de As ^V . Menos sensible que otros órganos y sistemas.
Dérmicos	melanosis, leucomelanosis, queratosis, hiperqueratosis, enfermedad de Bowen, y cáncer (de células basales o escamosas)	Exposiciones crónicas por ingestión o inhalación. Desordenes en piel documentados en varios estudios epidemiológicos en personas que consumen agua potable con As en dosis de 0.01–0.1 mg As/Kg/día o más.
Neurológicos	1.-Encefalopatía con dolor de cabeza, letargo, confusión mental, alucinaciones y coma. 2.-Neuropatía periférica	Varios estudios: ingestión de iAs pueden resultar en injuria neural. 1.-Exposición agua alta a 1 mg As/Kg/día o más. 2.- Exposiciones crónicas a 0.05-0.5 mg As/Kg /día.
Otros	1.-Asociación entre beber agua contaminada con As y defectos congénitos del corazón. 2.-Malformaciones congénitas. 3.-Abortos espontáneos. 4.- El arsénico cruza la barrera placentaria afectando el desarrollo fetal.	1 y 2.- Bebés nacidos de madres expuestas a altas concentraciones de As durante el embarazo. 3.- Mujeres en Suecia y este de Massachusetts
Inmunológicos	1.-La inducción de la estimulación en cultivo de linfocitos humanos con incremento de 49% con arsenito y 19% con arsenato.	1.- Arsenito 2×10^{-6} M y arsenato 5×10^{-6} M.
Diabetes mellitus	1.-Vínculo entre la enfermedad y beber agua contaminada con As. 2.- Exceso en la mortalidad por diabetes en poblaciones expuesta a As. 3.-Queratosis y elevación de los riesgos de diabetes al beber agua con As. 4.-significativo exceso de muertes por diabetes al beber As en el agua.	1.-Lai y colaboradores establecen una relación entre la ingesta de iAs y la prevalencia de Diabetes mellitus en 1891, en residentes adultos en el sur de Taiwán. 2.-Tsai y cols. 3.-Rahman y cols., en Bangladesh. 4.- Lewis y cols., en Utah.
Bioquímicos	Inhibición de más de 200 enzimas en humanos. 1.-La acción catalítica entre los tioles vecinos y el óxido de fenilarsina (PAO) inhiben el flujo placentario humano de Na ⁺ y H ⁺ . 2.- In vitro, el arsenito junto con enzimas sanguíneas humanas, inhibe 70–80% a la transaminasa glutamilpiruvato; la glutatión peroxidasa también es afectada. La glucosa -6-fosfatasa y colinesterasa son completamente	1.-Kulanthaivel y cols. 2.-Sheabar y Yanni.

	inhibidas. 3.-El arsenito de sodio incrementa la actividad celular de la hemo-oxigenasa en células Hela. 4.-Existe la teoría de que la alteración de la reparación del ADN es la causa de la carcinogénesis por As, ya que el AsIII se unen fuertemente a los ditioles al igual que a los sulfhidrilos vecinos, induciendo inhibición de la reparación del ADN, mutaciones genéticas o incremento de la proliferación celular.	
--	--	--

FUENTE: Mandal y Suzuki, 2002.

3.11.2.- Flúor y Enfermedad de Alzheimer

Informes recientes indican que la fuerte afinidad del fluoruro por el aluminio y la capacidad del flúor para atravesar la barrera hematoencefálica, permiten el fácil acceso del aluminio al tejido cerebral, el cual se sabe es neurotóxico y se encuentra anormalmente en altas concentraciones en el cerebro de las personas con Alzheimer, en víctimas de otras enfermedades neurológicas y en pacientes con SIDA.

En enero de 1987, el departamento de endocrinología en Newcastle, Inglaterra, y el departamento de física de la Universidad de Ruhana, Sri Lanka, demostraron que cuando el agua fluorada en 1 ppm, es utilizada al cocinar en utensilios (recipientes) de aluminio, la concentración de aluminio se eleva por arriba de 600 ppm, mientras que esto no sucede en el agua sin fluoruro. Experimentos bajo las mismas condiciones, usando el agua fluorada de Wisconsin, E.U.A. reportan un aumento en el contenido del fluoruro del 100%. (www.gjne.com/fluoride...)

3.11.3.- Flúor asociado a síndrome de Down, mortalidad y demencia senil

McDonagh y colaboradores (2002), evaluando 32 estudios, encontraron que la fluoración del agua puede tener estos posibles efectos negativos. (McDonagh y cols., 2002)

CAPÍTULO IV EXPOSICIÓN

4.0.-Exposición

La amplia distribución de ambos agentes, permite que el contacto con ellos se dé en las fuentes naturales, ya sea como resultado de la erosión eólica (tolvaneras) o el torrente de las aguas sobre los suelos y rocas que contienen a estos agentes, que principalmente son distribuidos a través de las aguas superficiales y subterráneas, y que además de surtir a las comunidades se distribuyen en varias localizaciones geográficas hacia las plantas y animales de los ecosistemas que constituyen los recursos alimentarios de las poblaciones humanas.

Antropogénicamente, la gran variedad de productos de uso cotidiano que contienen arsénico y/o flúor, como resultado de los procesos de fabricación o bien, en el caso de agentes terapéuticos, ocasiona una gran variedad de ambientes (ocupacionales, accidentales, como tratamientos o en pequeñas cantidades en objetos de uso común) que son propicios para la entrada de estos agentes hacia el interior del organismo.

4.1.-Síntomas de toxicidad

ARSÉNICO.- Los síntomas presentados en intoxicaciones agudas por As en humanos incluyen disturbios gastrointestinales, vomito, diarrea, sangre en la orina, anuria, shock, convulsiones, coma y muerte. En adultos, la dosis de arsénico inorgánico (iAs) productor de intoxicación aguda es de 1-3 mg As/Kg, la cual esta relacionada con su forma química y estado de oxidación; siendo mayor la del arsénico trivalente (As^{III}) que la del arsénico pentavalente (As^V). (Hughes, 2002)

Respecto a la toxicidad crónica, diferentes sistemas al interior del cuerpo son afectados por la exposición crónica al iAs; uno de los indicadores de toxicidad crónica por exposiciones orales son lesiones en la piel, caracterizadas por hiperpigmentación, hiperqueratosis e hipopigmentación. Otra enfermedad observada en individuos crónicamente expuestos al arsénico en su agua potable es la enfermedad del Pie Negro, una vasooclusión que conduce a la gangrena de las extremidades. (Hughes, 2002)

TABLA 9: Efectos de la exposición crónica a Arsénico sobre diversos sistemas

Sistema	Efecto
Piel	Lesiones en piel
Cardiovascular	Enfermedad del pie negro
Nervioso	Neuropatía periférica, encefalopatía
Hepático	Hepatomegalia, cirrosis, metabolismo del grupo hemo alterado
Hematológico	Depresión de la médula ósea
Endocrino	Diabetes
Renal	Degeneración del túbulo proximal necrosis papilar y cortical.

(Fuente: Hughes, 2002)

FLÚOR.- La toxicidad aguda del fluoruro de sodio, a una dosis de 0.25 g, genera irritación gástrica, que puede ocasionar dolor epigástrico, náuseas vómito y diarrea. (Herazo, 1988; Ruiz, 1997). La ingesta accidental o deliberada de productos con alta concentración puede ocasionar estado comatoso, acidosis, convulsiones, parálisis respiratoria o arritmia, seguida de muerte por falla cardíaca. (Ruiz, 1997)

La intoxicación crónica se presenta por la ingestión repetida (absorción regular) de pequeñas cantidades de compuestos fluorados, produciendo, *fluorosis*, que es un fenómeno de erosión que se puede presentar tanto en los dientes (hipoplasia del esmalte dentario inducida durante la etapa de formación de los dientes) como en los huesos. En la fluorosis dentaria, clínicamente se observan manchas que van desde un color blanquecino hasta un café oscuro, o incluso la pérdida de la continuidad del esmalte. (Loyola y cols., 1998)

En el caso de la fluorosis ósea, los síntomas tempranos incluyen dolor esporádico y rigidez de las coyunturas, dolor de cabeza, dolor estomacal y debilidad muscular pueden también ser signos de alarma (Herazo, 1988; UNICEF's; World Health Organization, 1996)

En poblaciones neurológicamente afectadas por exposición crónica, la acumulación cerebral genera parálisis facial de brazos y piernas, dolor de cabeza, y retardo mental. (Guan y cols, 1998.)

4.2.-Fuentes de exposición y sus efectos

ARSÉNICO.- El arsénico es un metaloide asociado con el incremento en la incidencia de cáncer en los humanos. Múltiples estudios epidemiológicos han asociados la exposición de humanos al arsénico en agua potable con cáncer de piel, cánceres internos, o en efectos no carcinogénicos como desordenes vasculares, neuropatía periférica, y diabetes. (Hamadeh y cols., 2002)

Se ha observado el desarrollo de cáncer en individuos sometidos a tratamiento médico con solución de Fowler (arsenito potásico), mediante la vía inhalatoria de esmaltes de cobre o por contaminación natural en el agua potable. Los tumores desarrollados post-inhalación se observan en los pulmones, al igual que después de la exposición oral en la piel. El cáncer de órganos internos ocurre en individuos que han consumido crónicamente agua potable contaminada con arsénico. Entre los sitios de tumores se incluyen vejiga, hígado y riñón. (Hughes, 2002)

FLÚOR.- Los humanos están expuestos a este elemento en los mantos acuíferos a niveles de menos de 0.1mg/L a más de 25mg/L, en el agua superficial y en alimentos preparados con agua a 0.01-0.3mg/lt, consumiendo el agua derivada de ambas fuentes. El flúor natural intacto varía con la geología de la región particular. El flúor también está presente en alimentos preparados y en productos dentales. La mayoría de la población de los Estados Unidos de Norteamérica está expuesta a niveles F^- de aproximadamente 1.0 ppm en el agua suplementada; estimándose un total diario de F^- intacto en comunidades con agua potable fluorada en un rango de 1.0 a 5.9 mg/Kg para adultos. (Zeiger, 1993)

La ingestión diaria de flúor que se estima segura oscila entre 1.5 y 4 mg diarios para los adultos. Los más jóvenes no deben sobrepasar los 2.5 mg diarios para evitar fluorosis dental (2- 8 mg/kg). Al ingerirse dosis superiores a 20-80 mg diarios de flúor, la toxicidad crónica afecta la solidez del hueso así como al riñón y, posiblemente al músculo nervioso. La dosis mortal de fluoruro sódico para los adultos, comprende entre 5 y 10 g 5. (Martínez, 2002)

Durante la intoxicación aguda vía oral, en el lumen gástrico, el flúor (presente como ácido fluorhídrico, HF) en su forma no ionizada atraviesa la membrana de las células epiteliales, en su interior se disocia en iones fluoruro e hidrogeniones, los cuales lesionan estructuras y alteran

funciones celulares por ruptura de la barrera mucosa gástrica. La aplicación tópica de una dosis única y de alta concentración del flúor en la cavidad bucal con deglución accidental, daña la mucosa gástrica y altera sus estructuras, misma que se intensifica al utilizar un gel fluorado y a mayor viscosidad del producto.

Estudios en humanos con aplicación de gel fluorado 12. 300 ppm, muestran síntomas epigástricos, cambios en los niveles de CAMP en plasma y tejidos, en el metabolismo de la glucosa y de la secreción de amilasa salivar. (Ruiz, 1997)

En 1989, Spak y col, estudiaron la ingesta de una dosis única de 20 mg de fluoruro de sodio (NaF) en voluntarios adultos con mucosa gástrica normal, encontrando daño de la mucosa gástrica y, después de 2 hrs el 100% presentaban petequias y erosiones en el cuerpo gástrico, el 50% presentó alteraciones en el antro gástrico, y en 20% se observó sangramiento sobre la mucosa gástrica. Tanto el epitelio (de menor tamaño que las normales, el más severamente dañado se disgregado o totalmente perdido) y estroma superficial como los acinos gástricos (dilatación irregular y ensanchamiento) se ven afectados. (Ruiz, 1997)

De acuerdo con Herazo (1988), para que puedan aparecer patologías relacionadas con la ingestión de dosis de flúor, éstas deben ser diarias y mayores de 1 ppm, durante 7 años o más, de acuerdo con lo siguiente:

- | | |
|--------------------------------|--|
| ☞ 1 a 2 ppm = fluorosis dental | ☞ 20 a 50 ppm = fluorosis anquilosante |
| ☞ 2 a 5 ppm = fluorosis ósea | ☞ 50 a 100 ppm = alteraciones tiroideas |
| ☞ 6 a 20 ppm = osteoesclerosis | ☞ 100 o más ppm = retraso en el crecimiento. |

En la intoxicación crónica, la acumulación persistente de flúor en el hueso puede llevar a una severa y permanente deformación esquelética (fluorosis ósea), ya que favorece la actividad osteoblástica, siendo el tejido óseo neoformado un hueso más denso pero menos elástico, mucho más susceptible de fracturarse. El estado siguiente es osteoesclerosis (endurecimiento y calcificación de los huesos), y finalmente la columna, los sistemas muscular y nervioso son dañados. Ambas fluorosis, dental y ósea son irreversibles y no existe tratamiento, siendo el único remedio la prevención del flúor intacto dentro de los límites seguros. (Ruiz, 1997; UNICEF; World Health Organization, 1996)

El envenenamiento por flúor puede ser prevenido o minimizado por el uso alternativo de otras fuentes de agua (agua superficial, agua de lluvia, y aguas subterráneas con bajo contenido en flúor), por remoción de flúor excesivo en el agua potable, y a través del mejoramiento del estado nutricional de las poblaciones en riesgo. (UNICEF; World Health Organization, 1996)

4.3.- Fuentes de exposición y sus efectos en conjunto

El conocimiento sobre la acción en conjunto de estos dos elementos es mínimo, y los resultados derivados de varios estudios no son concluyentes.

Investigaciones epidemiológicas sobre arsenismo y fluorosis endémicos en Xinjian, China, muestran diferentes órganos blanco para flúor y arsénico, que juegan roles independientes en la etiología. Un trabajo similar en Guizhou, China, sugiere que los efectos toxicológicos del flúor pueden ser intensificados por arsénico. Se han reportado resultados contradictorios en experimentos con animales que muestran acciones diferentes en conjunto, independientes, sinérgicas ó antagónicas con ratones blancos, ratas, conejos y otros animales. Al parecer los mecanismos de interacción de estos dos elementos en relación al desarrollo de las enfermedades endémicas es complicado y puede ser afectado por factores inciertos. (Zheng y cols., 2002)

4.4.-Disminución de los efectos a través de la dieta

ARSÉNICO.- El extracto crudo de ajo administrado después de la exposición a arsenito reduce el efecto clastogénico, ya que está compuesto por varios sulfuros que pueden interactuar con los arsenicales trivalentes e inhibir el efecto tóxico. Los antioxidantes como la vitamina E, metilamina y alcohol bencilico reducen la muerte de fibroblastos humanos por arsenito. (Hughes, 2002)

FLÚOR.- El pre-tratamiento con vitaminas A y C, o vitamina E solamente, genera un decremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. (Zeiger y cols., 1993). Datos clínicos indican que un adecuado contenido de calcio intacto esta claramente asociado con la reducción de riesgo de fluorosis dental. En el caso de intoxicaciones accidentales en niños, por el

consumo excesivo de flúor, se recomienda la ingesta de un vaso de leche, yogurt o cualquier otro líquido lácteo, ya que el calcio de la leche precipita el ion flúor y lo convierte en fluoruro de calcio, el cual no es absorbido y se excreta en las heces. (Herazo, 1988; World Health Organization, 1996)

5.0.-Cultivo de cortes de tejido

Los cortes de tejido han demostrado ser un sistema in vitro útil para los estudios de biotransformación y toxicidad. Puesto que los cortes se pueden preparar fácilmente a partir de una variedad de tejidos y especies, pueden ser utilizados para realizar investigaciones y comparaciones inter-especies. La realización de cortes de tejido humanos, permite realizar comparaciones (extrapolación) entre los animales de laboratorio y los seres humanos; además de que también pueden ser usados para examinar las interacciones tóxicas de productos químicos in vitro. (Gandolfi y cols., 1995)

Por su posición anatómica y equipo bioquímico, el hígado está implicado en el metabolismo y la disposición de muchas sustancias. A pesar de que la transformación metabólica de xenobioticos es considerada como un proceso de desintoxicación, algunos agentes que no son tóxicos se pueden convertir en productos tóxicos en el hígado. Existen también algunos productos químicos que son hepatotóxicos por sí mismos, sin requerir de la metabolización para activarse. El metabolismo de las sustancias ocurre principalmente en los hepatocitos, que constituyen cerca del 60% de las células y el 80% del volumen hepático. Otros tipos celulares presentes en el hígado incluyen a las células situadas en los sinusoides, endotelio, vías biliares, células de Kupffer y fibroblastos epiteliales, situados en los espacios porta.

La complejidad de la estructura del hígado y su multiplicidad de funciones metabólicas, homeostáticas, endocrinas y de biotransformación, han dado lugar a numerosos esfuerzos por desarrollar sistemas in vitro para el estudio de las funciones hepáticas. Entre los modelos desarrollados para reproducir las interacciones entre todos los tipos de células presentes en el órgano, se encuentran los cortes de hígado, que son una valiosa herramienta para tratar múltiples cuestiones relacionadas con la división en zonas metabólicas del hígado y las interacciones pluricelulares.

Entre las características más importantes de los cortes de hígado figuran:

- 1) Que la preparación de los cortes de tejido no requiere el uso de enzimas proteolíticas, que además de alterar las interacciones célula-célula, pueden ser perjudiciales para las mismas.
- 2) Las condiciones de preparación o el aislamiento varían entre una y otra especie, por lo que es posible preparar e incubar los cortes de tejido de varios órganos de diversas especies, incluyendo los seres humanos, haciendo a este modelo particularmente conveniente para realizar estudios inter-órgano e inter-especie.
- 3) El mantenimiento de la heterogeneidad de la célula y las interacciones célula-célula dentro de la matriz original del tejido refleja mejor el alto nivel de la organización biológica del órgano.

El uso de los cortes de hígado en las investigaciones *in vitro* fue divulgado primeramente por Otto Warburg en 1923, pero las dificultades en cuanto al número, la calidad de los cortes y las condiciones no fisiológicas, permitían la obtención de un número limitado, hasta que la producción de varias mejoras técnicas en los años 80, renovó el interés en el modelo de los cortes de hígado. Del mismo modo, el desarrollo de medios de cultivo apropiados y sistemas dinámicos de incubación que mejoraban el aporte de oxígeno a los cortes, prolongó su viabilidad hasta 5 días, provocando un aumento en el número de los estudios publicados hasta cerca de 500 publicaciones entre 1990 y 1999. (Lerche-Langrand y Toutain, 2000)

La integridad morfológica es uno de los indicadores más importantes de la viabilidad, que además de permitir la detección de las lesiones en la célula blanco, permite determinar la síntesis no programada del ADN. Los exámenes histopatológicos de los cortes de hígado de rata inmediatamente después de la preparación revelan una arquitectura lobulada normal.

Los cambios en las concentraciones de los iones K^+ , Na^+ , Ca^{2+} en los cortes de hígado se utilizan comúnmente como índices generales de la viabilidad; puesto que la mayoría de las células mantienen un alto contenido intracelular de K^+ , la pérdida de K^+ puede reflejar la lesión de la membrana o una disminución de la actividad de la bomba ATPasa para Na^+ y K^+ .

Otros parámetros bioquímicos que permiten determinar la viabilidad de los cortes de hígado son la cuantificación del ATP intracelular, de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), que reflejan un equilibrio entre los procesos de sustrato-rendimiento y sustrato que consumen.

El sistema de cultivo de cortes de hígado ha sido de gran utilidad en los campos de la toxicología y la farmacología; más de 200 laboratorios han utilizado los cortes de tejido para evaluar el metabolismo y desarrollar estudios de toxicidad (Gandolfi y cols., 1995), y actualmente éste número va en aumento.

Su uso ha permitido la investigación del metabolismo de los xenobioticos, siendo particularmente útil porque además de preservar cada vía metabólica y reflejar la situación in vivo, permite la identificación de varias vías metabólicas en una amplia gama de compuestos químicos. Varios estudios en cortes de hígado muestran que es posible obtener buenas correlaciones in vivo (reportadas en cortes de varias especies como ratas, perros, monos y seres humanos), en donde todas las vías del metabolismo xenobiotico de las fases I y II se encuentran activas.

Es importante señalar que el grosor de los cortes es un factor crítico en los estudios del metabolismo xenobiotico; así, cortes muy gruesos pueden generar la necrosis de tejido por hipoxia, además de dificultar la distribución y penetración del agente de estudio. (Lerche-Langrand y Toutain, 2000)

Tomando en cuenta la gran cantidad de compuestos químicos que son estudiados para evaluar sus efectos tóxicos, el costo de las pruebas en animales puede exceder una enorme cantidad de dinero, por lo que el uso de los cortes de hígado obtenidos de un mismo animal son de gran ayuda en la disminución del costo de las investigaciones, y a que además de reducir tanto el número como el sufrimiento de los animales usados, presentan las siguientes ventajas: (1) reducen la variabilidad individual, (2) requieren bajas cantidades de los productos químicos analizados para generar relaciones dosis-respuesta completas, (3) se pueden utilizar para mejorar el diseño de los compuestos terapéuticos, (4) ayudan a identificar la especie animal más apropiada para las pruebas toxicológicas, y (5) facilitan la interpretación de resultados de toxicidad en los modelos animales y su extrapolación en los seres humanos para los propósitos del gravamen de riesgo.

Por todo lo anterior, el sistema de cultivo de cortes de hígado se ha convertido en un modelo in vitro confiable y de gran alcance para los estudios toxicológicos, farmacológicos, y metabólicos. (Lerche-Langrand y Toutain, 2000)

5.1.-Biomarcadores

Puesto que la base de este trabajo radica en el estudio de la capacidad de As y F, para inducir un tipo de daño al ADN conocido como entrecruzamientos ADN-proteínas ó DPC; es importante mencionar que estos DPC son un biomarcador que se ha propuesto como un indicador de exposición temprana a múltiples agentes tóxicos. (Costa y cols., 1993; Ramírez y cols., 2000). No obstante es importante especificar que es un BIOMARCADOR, así como los tipos y utilidad de cada uno de ellos en los estudios toxicológicos.

Los biomarcadores son cambios biológicos medibles en los organismos vivos (ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos), que se presentan después de la exposición a un agente (que puede ser tóxico).

Generalmente se emplean para 1) detectar la presencia de una exposición a algún agente tóxico, 2) determinar las consecuencias biológicas de la exposición al mismo, 3) detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, 4) identificar a los individuos sensibles de una población, ó 4) fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Para poder estudiar un biomarcador, es necesario considerar la especificidad y sensibilidad del biomarcador, la dificultad de muestreo, la cinética de la formación del biomarcador, y su estabilidad.

En la actualidad existen tres tipos de biomarcadores: 1) biomarcadores de efecto, 2) biomarcadores de exposición y 3) biomarcadores de susceptibilidad. (<http://superfund.pharmacy...>)

5.1.1.-Biomarcadores de exposición

Los *biomarcadores de exposición* miden la exposición a un compuesto particular, detectando la presencia del compuesto o de sus metabolitos en fluidos corporales; poniendo de manifiesto la presencia y el grado de exposición al tóxico por el organismo. Un ejemplo de estos, son los aductos de proteínas y ADN, que pueden ser detectados en sangre, tejidos, células sanguíneas. (<http://www.rio10...>)

5.1.2.-Biomarcadores de efecto

Los *biomarcadores de efecto* incluyen medidas de sustancias endógenas o parámetros indicativos de cambios biológicos en respuesta a sustancias químicas, que pueden ser medidos en diferentes fluidos corporales y tejidos, con diferentes niveles de sensibilidad y especificidad.

Estos biomarcadores varían, desde medidas muy sencillas como la medición del peso corporal hasta la utilización de técnicas más sensibles como las inmunoquímicas para la determinación de isoenzimas específicas, ó respuestas moleculares que van desde daños al material genético (ADN), inducciones enzimáticas ó inmunosupresión causada por los compuestos, entre otros.

(<http://www.rio10...>)

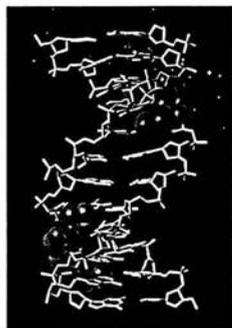
5.1.3.-Biomarcadores de susceptibilidad

Los biomarcadores de *susceptibilidad* o *sensibilidad* se emplean para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población. Entre ellos, se incluyen factores genéticos y cambios en los receptores, los cuales alteran la susceptibilidad de un organismo a la exposición de una sustancia química. La variabilidad genética juega un papel dominante dado que existen una amplia gama de respuestas en cuanto a la susceptibilidad y al tipo de respuesta tóxica que puede dar un organismo. Así, algunos individuos tienen probabilidades más altas que otros de recorrer completo el camino exposición-enfermedad, debido a que tienen más activos sus procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, de excretar o de reparar daños.

(<http://superfund.pharmacy...>; <http://www.rio10...>)

5.2.-Estudio de los aductos ADN-proteínas

Las interacciones entre el ADN y las proteínas están implicadas en la expresión de genes, y la interrupción en el balance que guardan las proteínas junto con la cromatina y/o el ADN puede tener serias consecuencias genéticas; ya que solas o unidas con otras, interactúan con secuencias específicas del ADN para encender y apagar genes, mediante interacciones reversibles y no covalentes. Al mismo tiempo, el ADN contiene proteínas y péptidos covalentemente unidos, que son muy importantes en el mantenimiento de la estructura de la cromatina o como importantes enzimas funcionales.



Algunas veces, la acción de algún agente químico ocasiona que las proteínas reguladoras que normalmente no están covalentemente unidas al ADN generen entrecruzamientos covalentes entre el ADN y las proteínas estructurales, las cuales dejan de funcionar al unirse al ADN, generando entrecruzamientos con el mismo (Costa y cols., 1993). Los entrecruzamientos ADN-proteína (DPC) son una forma relativamente abundante de daño al ADN; se ha reportado que el nivel de DPC en glóbulos blancos humanos está en un rango de 0.5 a 4.5×10^7 bases. Al parecer, existe una relación entre la edad y la acumulación de DPC, observada en órganos de ratón, lo que ha generado la hipótesis de que los mecanismos oxidativos contribuyen a la formación de estos daños al ADN. Existen una gran variedad de agentes tóxicos, cuya exposición *in vivo* e *in vitro* incrementa de forma alarmante los niveles de DPC, entre los que se encuentran: luz UV, radiación ionizante, β -propiolactona, aldehídos, arsenito, nitrilotriacetato férrico, cromato níquel, cis-platina, cisplatino y neocarcinostatina. Es por ello que, estos aductos ADN-proteína han sido propuestos como biomarcadores de exposición temprana a estos agentes (Minko y cols., 2002).

En el caso del cromo, se han reportado entrecruzamientos de actina aductada al ADN después de su tratamiento con este agente (donde el cromo trivalente se une al fosfato del ADN y a su vez con las proteínas, como la actina, grupos reactivos de aminoácidos como el nitrógeno imidazol de la histidina o el grupo hidroxilo de la tirosina).

El níquel también produce entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC), pero a diferencia del cromato, el níquel puede oxidarse y formar radicales de oxígeno solo después de unirse a ciertos ligandos, como el nitrógeno imidazol de la histidina. Además, muchas proteínas que se unen al ADN requieren Mg^{2+} y el Ni^{2+} es un excelente antagonista del Mg^{2+} , que se une en los sitios de unión del magnesio afectando la unión normal de proteínas al ADN o causando entrecruzamientos de las proteínas con el mismo.

De esta manera, la formación de entrecruzamientos covalentes ADN-proteínas puede irrumpir la expresión de genes, la estructura de la cromatina o generar deleciones en secuencias del ADN durante la replicación del ADN, si estas lesiones no son correctamente reparadas. (Costa y cols., 1993)

Respecto a estos entrecruzamientos ADN-proteínas, como una de las primeras lesiones inducidas en células expuestas a compuestos de níquel y cromo, podemos citar un estudio en soldadores de rieles, ocupacionalmente expuestos a pequeñas cantidades de cromo y níquel a partir de la inhalación del humo de soldadura (la exposición a estos humos se ha reportado que puede ser carcinogénica en los humanos), en el cual se detectaron elevadas concentraciones de cromo y níquel en la sangre y orina de estos individuos, que habían estado expuestos de tiempo completo a los humos de soldadura por 6 meses o más; y pese a que hubo una ligera elevación de cromo en la sangre de éstos comparada con los controles (no estadísticamente significativa), sus niveles de entrecruzamientos ADN-proteínas fueron más elevados que en personas no expuestas, mismos que no variaban con la edad, hábitos de fumar, peso corporal o raza. (Costa y cols., 1993)

En un estudio realizado por Ramírez y colaboradores (2000) empleando la línea celular hepática humana WRL-68, se observó un incremento en la inducción de DPC después de la exposición a arsenito (el cual permanece en el tejido dependiendo del grado de metilación del organismo) con una relación lineal dependiente de la dosis de As. Al parecer, las especies de arsénico trivalente tienden a acumularse en tejidos con un alto contenido en keratina debido a su afinidad por los grupos tiol; por ello, varias citoqueratinas (ricas en estos grupos) han sido identificadas entre las proteínas entrecruzadas con el ADN, como la citoqueratina 18 (CK18), que es un filamento intermedio específico, que debido a su presencia en el citoplasma, alrededor de la envoltura nuclear y dentro del núcleo, es capaz de interactuar con el ADN, originando DPC, los cuales se incrementan respecto a la dosis de As. También se ha observado la disrupción en la

polimerización de los microtúbulos del citoesqueleto en linfocitos humanos tratados con arsenito de sodio (rico en grupos tioles); así la irrupción en los microtúbulos y filamentos intermedios es capaz de generar pérdida o ganancia de cromosomas (efecto aneugénico), así como un incremento en la frecuencia de micronúcleos observado en células bucales y pulmonares de humanos expuestos al As en el agua potable. (Ramírez y cols., 2000)

Al parecer, el nivel de DPC parece estar directamente relacionado a la carcinogenicidad del formaldehído en los tejidos blanco como son células nasales de rata, que son el sitio primario de los efectos genotóxicos. Otros estudios también han relacionado un incremento en la formación de DPC con otros cánceres. (Ramírez y cols., 2000)

Las consecuencias genéticas de la pérdida del ADN (por deleciones de secuencias u otros mecanismos como mutaciones puntuales o la presencia de proteínas covalentemente unidas al ADN), si no son reparadas, pueden generar la inactivación de diferentes genes supresores de tumores, como *RB*, *p53* y otros genes que mantienen la normalidad de las células. (Weinberg, 1991)

Un modelo para este tipo de consecuencias fue observado en el cromosoma X de hámster Chino donde el brazo largo del cromosoma X, enteramente heterocromatizado, exhibía interacciones selectivas de entrecruzamientos ADN-proteína con iones de Ni^{2+} en células masculinas transformadas, mostrando una deleción del brazo largo del cromosoma X que involucraba al brazo q. Al parecer, el níquel catalizaba los entrecruzamientos DNA-proteína por oxidaciones oxido-reducción, o quizá interactuando con la cromatina unida a proteínas, o en factores de transcripción, uniéndose en los sitios de unión del Mg^{2+} .

Se ha planteado que éstos entrecruzamientos DNA-proteína, contribuyen a la immortalización por deleción o senescencia de genes en esta región enteramente heterocromática del brazo q de los cromosomas X en los hámster Chinos machos. (Sen y col., 1985; Weinberg y col., 1990; Costa y cols., 1993)

Algunos trabajos han asociado a los DPC como mediadores entre los afectos genotóxicos y la aparición de carcinogenicidad; como es el caso del formaldehído. (Minko y cols., 2002, Costa y cols., 1993, Ramírez y cols., 2000). En el 2000, Quievryn y Zhitkovich en un estudio sobre la formación de DPC post-exposición al formaldehído, encontraron que la exposición de las células a este agente conduce a la formación de entrecruzamientos ADN-histonas como la mayor forma de daño al ADN; y que éstos se encuentran fuertemente correlacionados con la incidencia

de tumores en sitios blanco, además de ser consideradas un gran responsable para la carcinogenicidad del formaldehído. (Quievryn y Zhitkovich, 2000)

Puesto que el significado biológico de los DPC no ha sido bien establecido (dadas las dificultades para conocer los sitios de especificidad de los DPC), los datos concernientes a la reparación de estas lesiones son muy limitados. Algunos datos generados en cultivos celulares revelan que en los mecanismos de remoción para estos DPC se encuentran involucradas más de una vía de reparación para estas lesiones, entre las que se figuran la reparación por escisión de nucleótidos (NER) como el principal responsable, además de la degradación proteolítica del sistema ubiquitina-proteosoma, en donde ésta última parece no ser un pre-requisito indispensable la acción de NER. (Minko y cols., 2002)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta los hallazgos relacionados con el amplio espectro de efectos tóxicos reportados para estos agentes, entre los que destacan los citotóxicos y genotóxicos, existe una gran posibilidad de que en exposiciones humanas en áreas de contaminación natural endémica (para arsénico y flúor) se puedan presentar efectos combinados por la acción de estos elementos. Es importante señalar que la exposición a múltiples agentes tóxicos se da en el ambiente de forma simultánea, por lo que es muy difícil establecer los efectos ocasionados por la acción conjunta de un gran número de agentes tóxicos, y más aún el conocimiento de sus mecanismos de toxicidad.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el arsénico, por si solo, es capaz de inducir DPC, por lo que es de particular interés conocer si en forma conjunta arsénico y flúor son capaces de inducir significativamente este tipo de daño. Más aún conocer si la capacidad inductora del arsénico se modifica en presencia del flúor.

Por todas las evidencias anteriores, y con objeto de generar conocimiento sobre la acción conjunta del arsénico y el flúor, nos hemos enfocado al estudio de los entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC), que son un biomarcador que ha sido propuesto como un indicador temprano de exposición a reconocidos agentes tóxicos (Costa y cols., 1993; Ramírez y cols., 2000). En este estudio se empleará el sistema de cultivo de cortes de hígado de ratones Balb/c, los cuáles serán expuestos a concentraciones variables de los agentes.

Para este efecto, en este trabajo nos propusimos conocer la capacidad conjunta de los agentes arsénico y flúor, para inducir la interacción entre el ADN y proteínas, considerando, que ambos pueden poseer esta capacidad, ya que durante su biotransformación se generan especies reactivas que favorezcan el proceso.

Con estos resultados podremos sentar las bases para el estudio de las características moleculares y bioquímicas de los entrecruzamientos ADN-proteínas, así como el establecimiento de su relación en la aparición de patologías. Así mismo podremos conocer los mecanismos mediante los cuales se genera su formación y los patrones de especificidad para cada genotóxico, entre

otras características. Finalmente, el conocimiento de todos estos aspectos nos permitirá determinar la posibilidad, de proponer a los DPC como biomarcadores de exposición natural.

HIPÓTESIS

Considerando la capacidad inductora temprana de DPC por el Arsénico en cultivos de cortes de hígado de ratones machos Balb/c y el potencial tóxico del Flúor, en exposiciones conjuntas, el Flúor tendrá la capacidad de incrementar la proporción total de estas lesiones.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la capacidad inductora de arsénico y flúor, sobre la formación de aductos ADN-proteína en un sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón de la cepa Balb/c.

Objetivos específicos

Estudiar la capacidad inductora del flúor y de su combinación con As sobre la formación temprana *in vitro* en el hígado de ratones de la cepa Balb/c de aductos ADN-proteína.

Determinar si la inducción *in vitro* de los aductos ADN-proteína por flúor y su combinación con As en el hígado de ratones de la cepa Balb/c, está relacionada con la concentración de exposición a los agentes.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cultivos de cortes de hígado

Se realiza el sacrificio por dislocación cervical de un ratón macho de la cepa Balb/c; y, dentro de un área estéril; se realiza una incisión para extraer el hígado, que se coloca en una caja Petri estéril que contiene medio Dulbecco modificado (D-MEM: suplementado con 8% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomomicina) a 37°C.

Se realizan los cortes con un bisturí, cuidando que no excedan 4 mm de espesor, y posteriormente se pesan hasta obtener entre 0.08 y 0.1 g, los cuales se colocan en una charola de pozos de cultivo que contienen el mismo medio de cultivo a 37°C, para incubarlos durante 2 a 3 horas a 37°C, en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂, para que el tejido se adecue al sistema.

Transcurrida la primera incubación, a cada grupo de 3-4 pozos (con cortes) se le agrega el siguiente tratamiento en un área estéril, utilizando los compuestos de arsenito de sodio (As^{III}) y fluoruro de sodio (F):

<u>Tratamiento</u>	<u>Abreviatura</u>
Control negativo (sin tratamiento)	(C-)
Arsénico 1 x10 ⁻⁹ M	(As-9)
Arsénico 1 x10 ⁻⁷ M	(As-7)
Arsénico 1 x10 ⁻⁵ M	(As-5)
Arsénico 1 x10 ⁻⁹ M + Flúor 1 x10 ⁻² M	(As-9 + F1)
Arsénico 1 x10 ⁻⁹ M + Flúor 2 x10 ⁻² M	(As-9 + F2)
Arsénico 1 x10 ⁻⁹ M + Flúor 4 x10 ⁻² M	(As-9 + F4)
Arsénico 1 x10 ⁻⁵ M + Flúor 1 x10 ⁻² M	(As-5 + F1)
Arsénico 1 x10 ⁻⁵ M + Flúor 2 x10 ⁻² M	(As-5 + F2)
Arsénico 1 x10 ⁻⁵ M + Flúor 4 x10 ⁻² M	(As-5 + F4)
Flúor 1 x10 ⁻² M	(F1)
Flúor 2 x10 ⁻² M	(F2)
Flúor 4 x10 ⁻² M	(F4).

Posteriormente, los pozos se vuelven a incubar durante 3 horas. Transcurrida la segunda incubación, los cortes se colocan en tubos Eppendorf etiquetados para cada muestra, con aproximadamente 0.8-1.0 ml de PBS pH 7.2 con inhibidores de proteasas; posteriormente se homogenan y se guardan a -20°C para la realización de pruebas posteriores.

Determinación de K^+ intracelular (viabilidad)

Existen diversos criterios para evaluar la viabilidad de los cortes obtenidos (previa a la realización del tratamiento). Entre los más usados destacan la detección de cambios en las concentraciones de los iones K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . Dado que las células mantienen una alta concentración de K^+ intracelular, la pérdida de este catión (K^+) puede reflejar un daño en la membrana o decaimiento en la actividad de la bomba Na^+-K^+ ATPasa. Se ha observado que los cortes frescos, obtenidos de ratas y humanos, pierden entre 50 y 80% de potasio durante la preparación; pero más tarde, durante el cultivo, los niveles se reestablecen. En cortes frescos de rata, se han estimado diversos rangos de viabilidad, que van desde 10–20 $\mu\text{mol/g}$, 32 $\mu\text{mol/g}$, hasta 40–50 $\mu\text{mol/g}$ de muestra, dependiendo de la metodología empleada para la obtención. (Lerche-Langrand y Toutain, 2000)

Para realizar la determinación, se toman entre 0.4-0.5 ml del homogenado y se sonica durante 5 minutos, para liberar el potasio. Se agregan 0.8-1.0 ml de ácido sulfosalicílico y se dejan reposar durante 3 hrs para precipitar las proteínas. Se centrifuga esta mezcla a 3000 rpm/10 min, y se recoge el sobrenadante, el cual se afora con agua destilada a 10 o 25 ml, según sea el caso, para posteriormente determinar el contenido de potasio intracelular (mínimo 25 μmoles de K^+) por espectrofotometría de absorción atómica, usando una curva con 5 estándares de potasio, a una longitud de onda de 766.5 nm.

Precipitación de los aductos ADN-proteínas

La presente técnica es un ensayo modificado de potasio-SDS originalmente desarrollado para detectar complejos de topoisomerasa-DNA como una vía para poder detectar entrecruzamientos DNA-proteínas en células intactas. (Costa y cols., 1993)

El ensayo esta basado en la unión del SDS a las proteínas que están unidas al ADN (complejos formados por entrecruzamientos ADN-proteínas). La adición de cloruro de potasio a la solución de SDS forma un precipitado de potasio-SDS-proteínas-ADN, que es recuperado por centrifugación a baja velocidad, permitiendo la precipitación selectiva del ADN que contiene los entrecruzamientos proteicos.

Así, tanto las proteínas libres (del ADN) como las aductadas al ADN (aductos ADN-proteínas ó DPC), precipitan unidas al SDS al cambiar el sodio por potasio (Costa y cols., 1993). Finalmente, ambas son separadas del ADN libre, el cual queda en el sobrenadante.

Técnica para el aislamiento y precipitación de DPC (complejos ADN-Proteínas)

La rebanada de hígado tratada se homogeniza en 1ml de PBS con inhibidores de proteasas.

1 Colectar 500 µl del homogenado y mezclar con 500 µl de soln LISIS A. (Los 500 µl restantes se guardan para otras determinaciones).

2 Tomar una alícuota de 10-20 µl para DETERMINACIÓN DE ADN TOTAL, y congelar ambas muestras a -20°C (1 día).

3 Descongelar las muestras a 37°C y expeler los lisados en un tubo, usando una jeringa con aguja de calibre 21 (verde), 3 veces.

4 Una vez lisadas las células, agregar 500 µl de SOLN B (100mM KI, 20mM tris-HCl; pH 7.5).

5 Incubar 10 min/65°C.

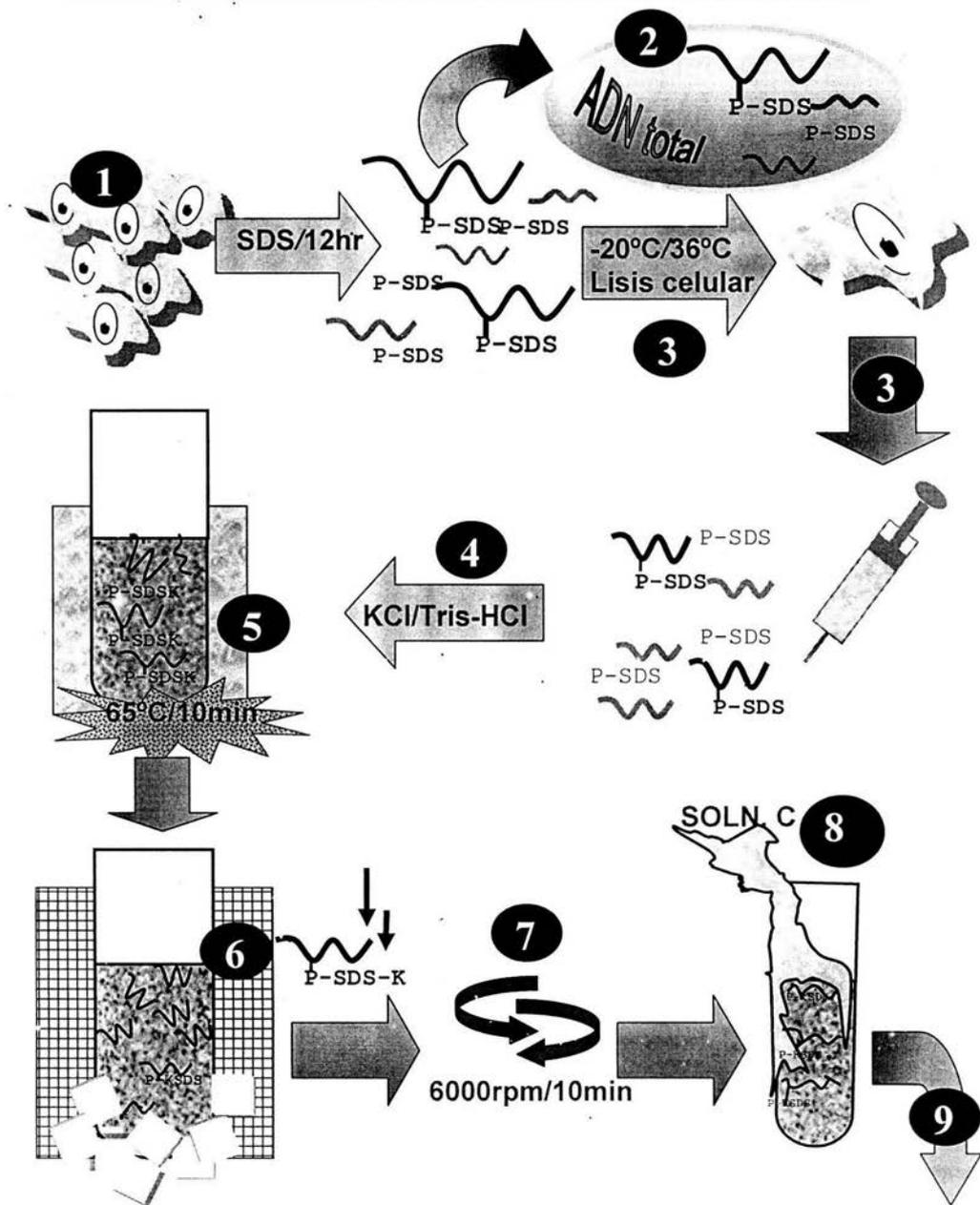
6 Transcurrido el tiempo, los tubos se invierten 3 veces y se colocan en hielo 5 min para que precipiten los complejos.

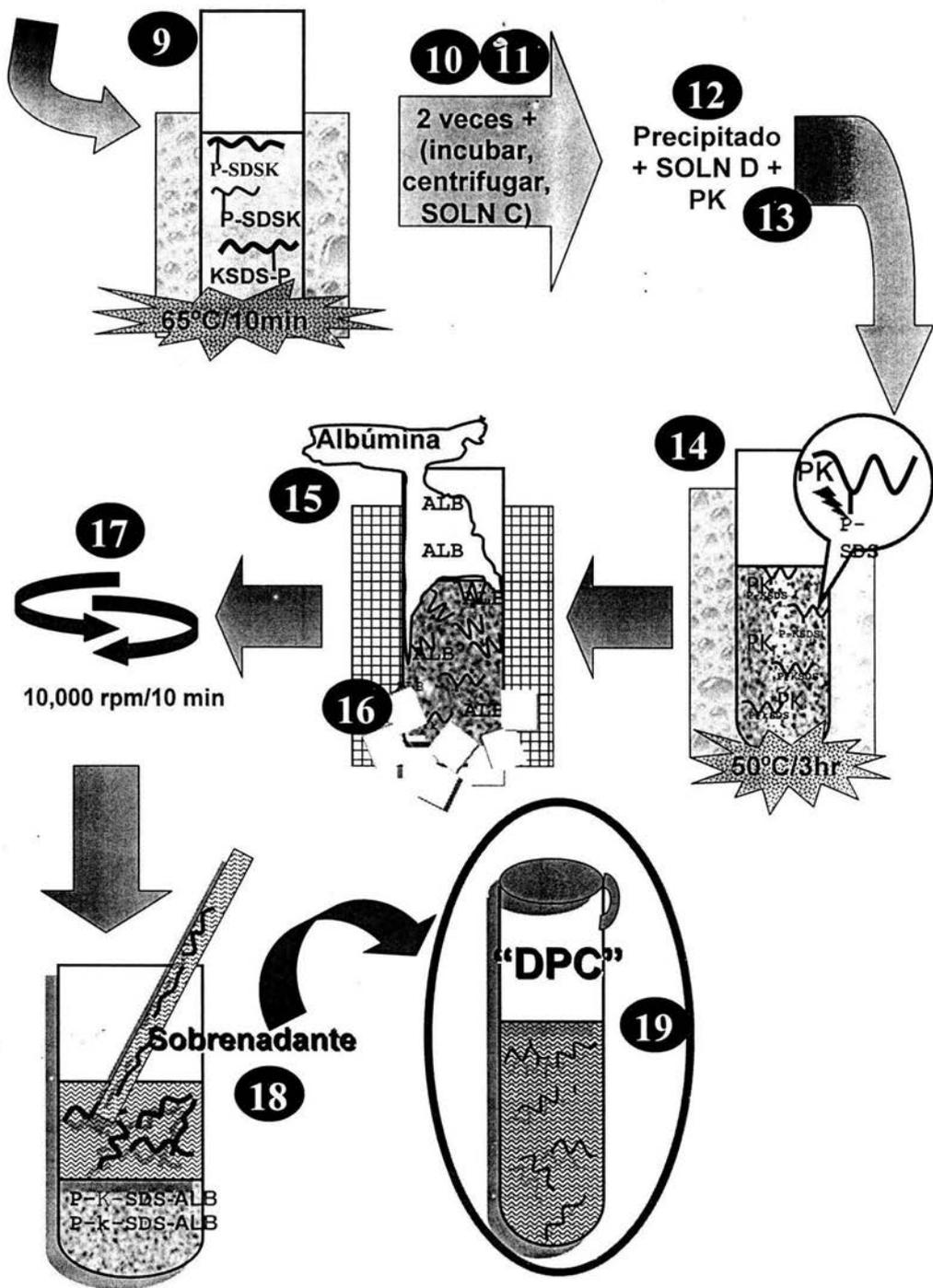
- 7** Los precipitados se centrifugan a 6 000 g/5 min a 4°C.
- 8** Remover el sobrenadante y lavar el precipitado con 1ml de SOLN C. Agitar.
- 9** Incubar nuevamente a 65°C/10 min.
- 10** Repetir los pasos 6 a 10 una vez más.
- 11** Centrifugar a 6 000 g /5 min a 4°C.
- 12** Remover el sobrenadante y agregar al precipitado 250 µl de SOLN D.

Tomar una alícuota de 50 µl para electroforesis (opcional).
- 13** A los 200 µl restantes se agrega PK hasta obtener una concentración final de 0.2 mg/ml de PK.
- 14** Incubar 50°C/3hrs.
- 15** Agregar a cada tubo ALBÚMINA hasta obtener una concentración final de 100mcg albúmina/tubo.
- 16** Incubar en hielo 10 min.
- 17** Centrifugar los tubos a 10 000 g (o 3000 rpm)/10 min a 4°C.
- 18** Recuperar el SOBRENADANTE (ADN que se compleja)
- 19** Guardar el sobrenadante (DPC) en un tubo Eppendorf y congelarlo a -20°C.

FIGURA 6. "Precipitación de Complejos ADN-Proteas"

Modificado de Costa y cols., 1993

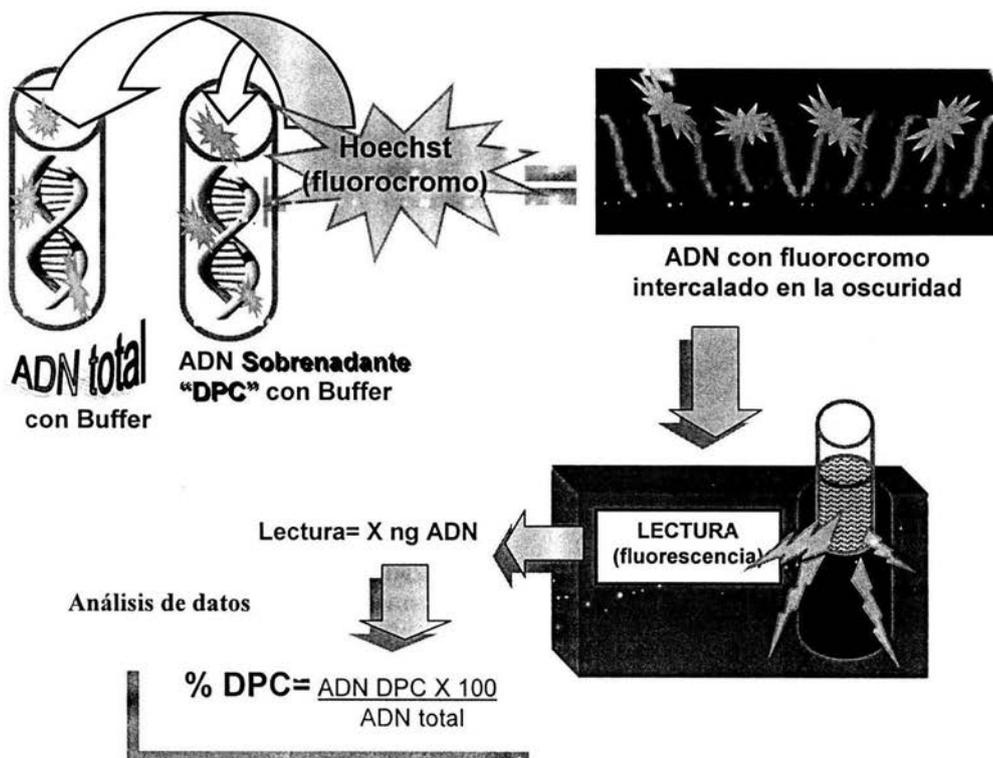




Determinación de los aductos ADN-proteínas por fluorescencia

La determinación de los aductos ADN-proteínas se realiza indirectamente a través de la lectura de una muestra de ADN total (recolectada antes de la precipitación de los aductos) y otra del ADN que queda en el sobrenadante después de la precipitación de los aductos. El procedimiento consiste en tomar 10 μ L de ADN total y 100 μ L de ADN que estuvo complejado (DPC), por separado, a los cuales se le agrega una solución que contiene KCl 10 mM, Tris-HCl 20 mM y EDT 10 mM, para realizar el aforo. Finalmente se añade una solución de Hoechst, que es un fluorocromo análogo de la timina que se intercala entre el ADN. Se incuba en la oscuridad y finalmente se leen las muestras en un fluorómetro. Las lecturas obtenidas se interpolan en una curva previamente elaborada y bien estandarizada, para obtener la relación % del ADN que formó parte de los DPC.

FIGURA 7: Determinación indirecta de DPC por fluorescencia.



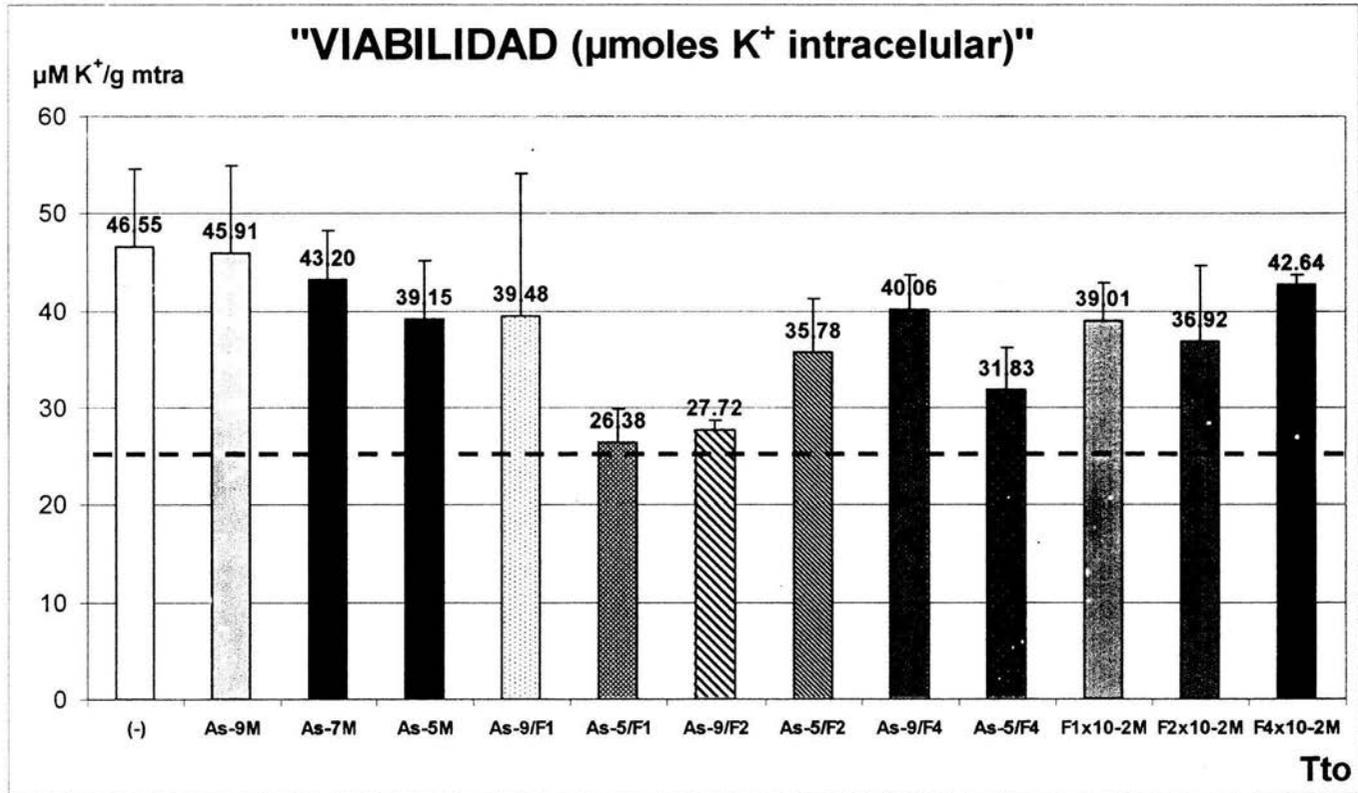
RESULTADOS

Cuantificación de K^+ intracelular a las tres horas de tratamiento

Para tener la seguridad de que los cortes de hígado, obtenidos y cultivados, se encontraban funcionales (viables), se realizó la determinación de potasio intracelular, después de 2 hrs de acondicionamiento (post-obtención), y después de los correspondientes tratamientos.

En la GRÁFICA 1 se muestran los resultados de viabilidad (en micromoles de potasio intracelular por gramo de muestra) de los cortes de hígado, y se puede observar que todas las muestras tratadas y no tratadas se encuentran por arriba del límite de viabilidad que es de 25 micromoles K^+ /g (Lerche C. y cols., 2000; Lerche-Langrand y Toutain, 2000). Sin embargo, conforme aumenta la concentración de As la viabilidad disminuye. En el caso del F parece ocurrir lo contrario, ya que a la concentración de F $1 \times 10^{-2}M$ la viabilidad disminuye, y en el caso de la más elevada (F $4 \times 10^{-2}M$) se presenta un aumento en la viabilidad.

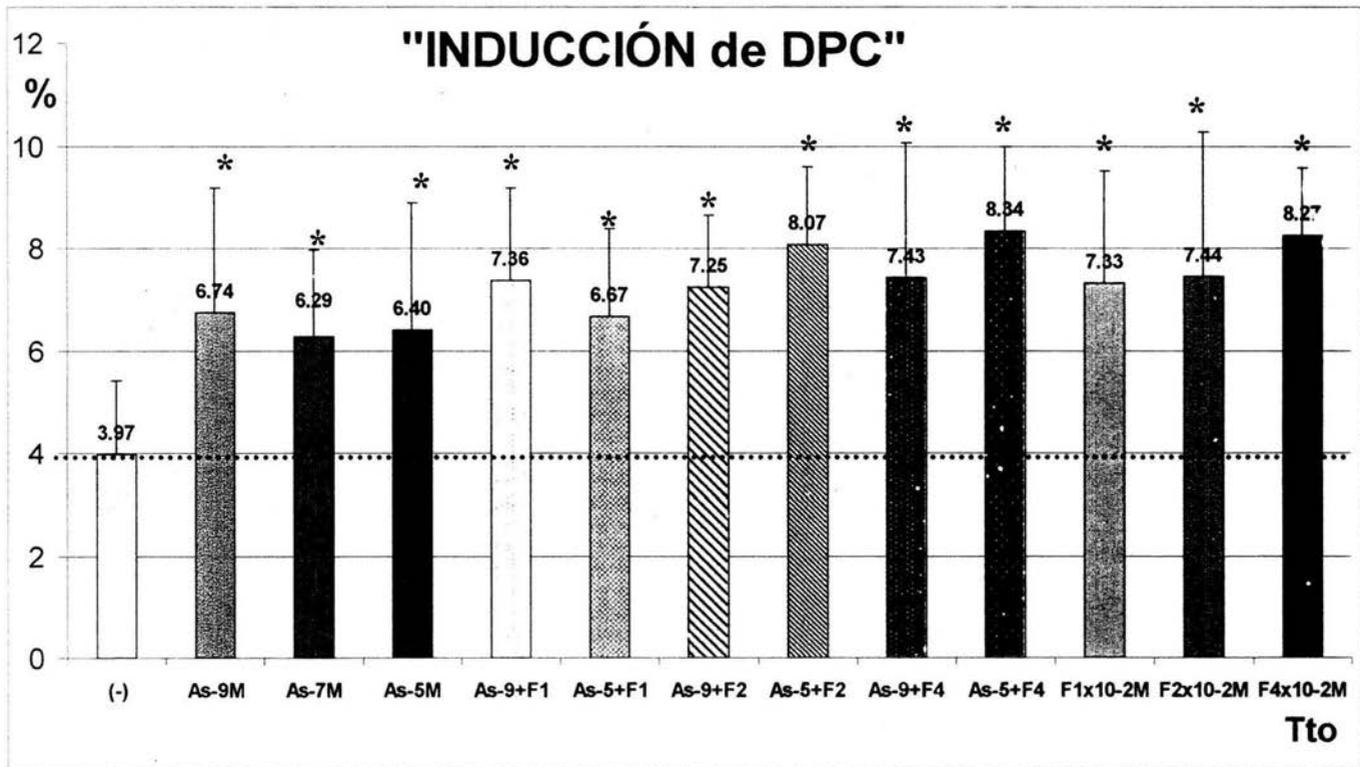
En general, se puede observar que la administración simultánea de As y F compromete la viabilidad de las cortes, la cual disminuye más que cuando éstas son expuestas solamente a As ó a F. Bajo el mismo tenor, podemos observar que a las concentraciones de As $1 \times 10^{-5}M/F 1 \times 10^{-2}M$ y As $1 \times 10^{-9}M/F 2 \times 10^{-2}M$ son aquellas que generan un mayor descenso en la viabilidad, en comparación con el control (-) y el resto de las concentraciones empleadas.



GRÁFICA 1: Viabilidad de los cortes de hígado. En esta gráfica se muestra la viabilidad de los cortes de hígado en 6 experimentos ($\mu\text{moles de Potasio intracelular/g muestra}$), después de la exposición a Arsénico (1×10^{-9} , 1×10^{-7} y $1 \times 10^{-5}\text{M}$) y Flúor (1×10^{-2} , 2×10^{-2} y $4 \times 10^{-2}\text{M}$), por separado, y sus respectivas exposiciones en conjunto: (As $1 \times 10^{-9}/\text{F}1 \times 10^{-2}\text{M}$ y As $1 \times 10^{-5}/\text{F}1 \times 10^{-2}\text{M}$), (As $1 \times 10^{-9}/\text{F}2 \times 10^{-2}$ y As $1 \times 10^{-5}/\text{F}2 \times 10^{-2}\text{M}$) y (As $1 \times 10^{-9}/\text{F}4 \times 10^{-2}\text{M}$ y As $1 \times 10^{-5}/\text{F}4 \times 10^{-2}\text{M}$).

Falta página

N° 87

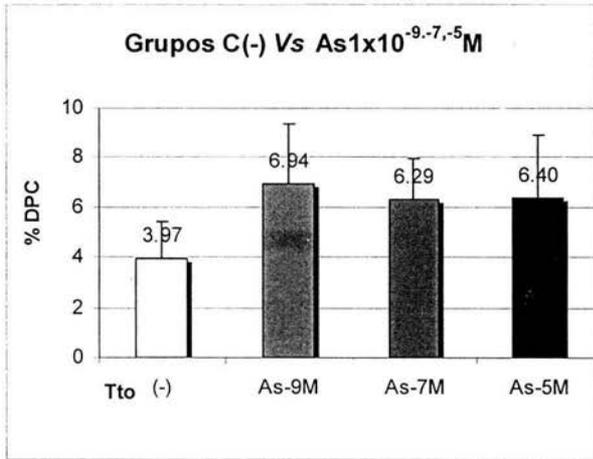


GRÁFICA 2: Inducción de DPC. En ésta gráfica se muestra la inducción % de DPC en los cortes de hígado de 6 experimentos, después de la exposición a Arsénico (1×10^{-9} , 1×10^{-7} y 1×10^{-5} M) y Flúor (1×10^{-2} , 2×10^{-2} y 4×10^{-2} M), por separado, y sus respectivas exposiciones en conjunto: (As 1×10^{-9} /F 1×10^{-2} M y As 1×10^{-5} /F 1×10^{-2} M), (As 1×10^{-9} M/F 2×10^{-2} y As 1×10^{-5} /F 2×10^{-2} M) y (As 1×10^{-9} /F 4×10^{-2} M y As 1×10^{-5} /F 4×10^{-2} M).

*ANOVA, $p = 0.0059$. Significativamente diferentes respecto al control. Prueba de Kruskal Wallis (comparación múltiple de medias)

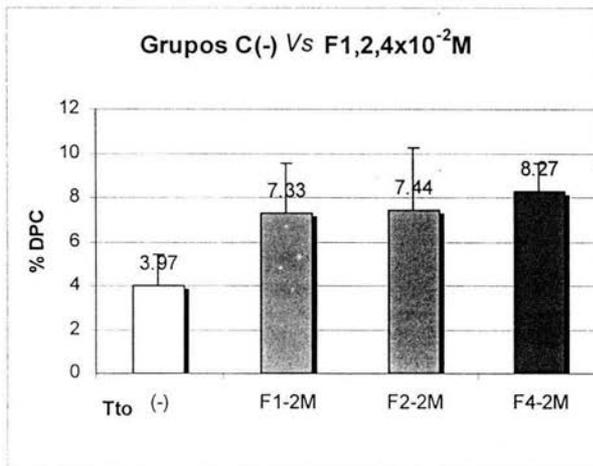
Para conocer la existencia de alguna relación entre la concentración de los analitos en estudio y la inducción de DPC, se efectuó un análisis de regresión lineal entre el control negativo y las exposiciones a arsénico ó flúor., Y con las correspondientes exposiciones simultáneas. Las gráficas se muestran a continuación ilustran las regresiones efectuadas.

Inducción de DPC entre el control y los grupos expuestos a As $1 \times 10^{-9} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-5} \text{M}$



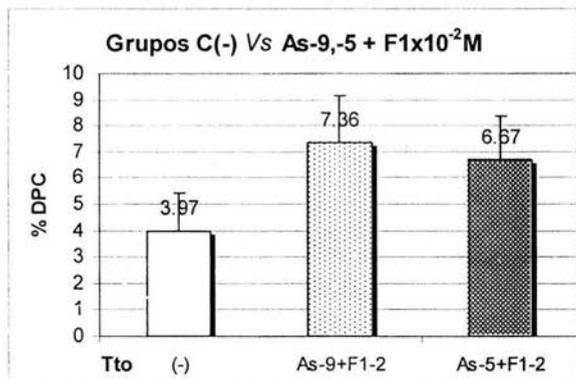
GRÁFICA 3: Inducción de DPC por arsénico. En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos expuestos a As. $r=0.2561$.

Inducción de DPC entre el control y los grupos expuestos a F $1 \times 10^{-2} \text{M}$, $2 \times 10^{-2} \text{M}$ y $4 \times 10^{-2} \text{M}$



GRÁFICA 4: Inducción de DPC por flúor. En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos expuestos a F. $r=0.8241$.

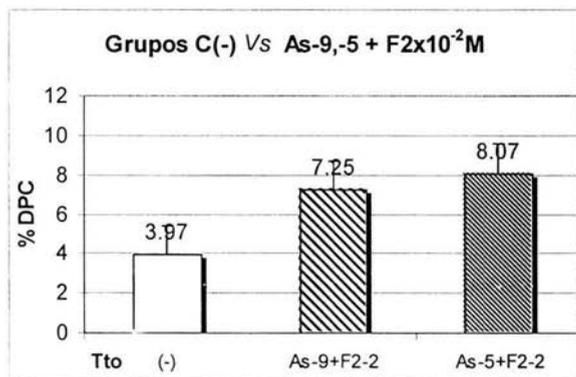
Inducción de DPC entre el control y los grupos expuestos simultáneamente a $As\ 1 \times 10^{-9}M$ ó $1 \times 10^{-5}M$; con sus respectivas concentraciones de F.



GRÁFICA 5: Inducción simultánea de DPC por As y F $1 \times 10^{-2}M$.

En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos simultáneamente expuestos a $As-9$ ó -5 y F $1 \times 10^{-2}M$.

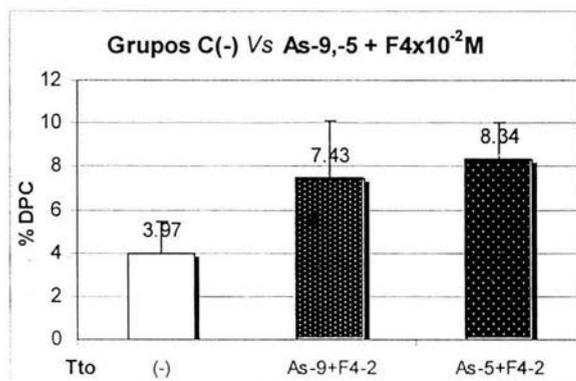
$r=0.3223$



GRÁFICA 6: Inducción simultánea de DPC por As y F $2 \times 10^{-2}M$.

En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos simultáneamente expuestos a $As-9$ ó -5 y F $2 \times 10^{-2}M$.

$r=0.6543$

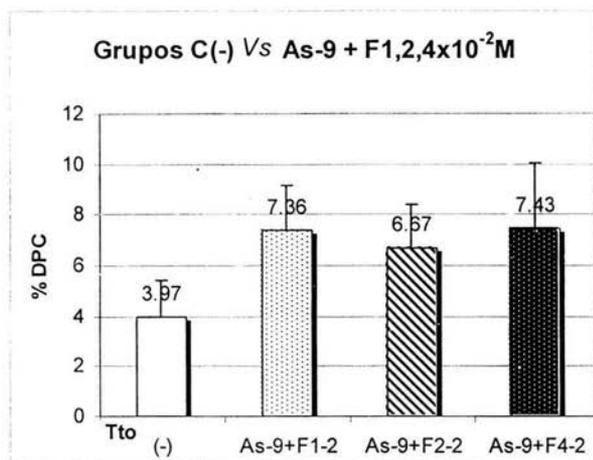


GRÁFICA 7: Inducción simultánea de DPC por As y F $4 \times 10^{-2}M$.

En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos simultáneamente expuestos a $As-9$ ó -5 y F $4 \times 10^{-2}M$.

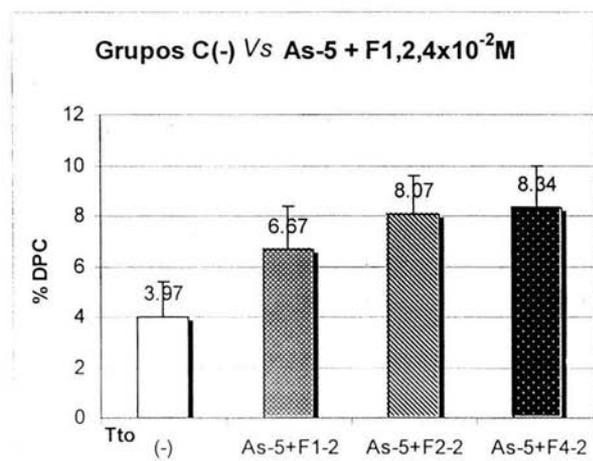
$r=0.3223$

Inducción de DPC entre el control y los grupos expuestos simultáneamente a F $1 \times 10^{-2}M$, $2 \times 10^{-2}M$ ó $4 \times 10^{-2}M$; y As $1 \times 10^{-9}M$



GRÁFICA 8: Inducción simultánea de DPC por As-9 y F. En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos simultáneamente expuestos a As-9 y F 1, 2 ó $4 \times 10^{-2}M$. $r=0.7091$

Inducción de DPC entre el control y los grupos expuestos simultáneamente a F $1 \times 10^{-2}M$, $2 \times 10^{-2}M$ ó $4 \times 10^{-2}M$; y As $1 \times 10^{-5}M$



GRÁFICA 9: Inducción simultánea de DPC por As-5 y F. En esta gráfica se muestra la regresión lineal entre la inducción de DPC y los grupos simultáneamente expuestos a As-5 y F 1, 2 ó $4 \times 10^{-2}M$. $r=0.8622$

TABLA 10: Análisis de la inducción de DPC por flúor y arsénico en diferentes exposiciones (regresiones lineales en orden descendente)

<i>Tratamientos</i>	<i>Regresión lineal (r)</i>	<i>Ubicación</i>
As-5+F 1, 2 y 4x10 ⁻²	0.8622	Gráfica 5
F 1, 2 y 4x10 ⁻²	0.8241	Gráfica 6
As-9 + F 1, 2 y 4x10 ⁻²	0.7091	Gráfica 7
F 4x10 ⁻² + As -9 y -5	0.661	Gráfica 4
F 2x10 ⁻² + As -9 y -5	0.654	Gráfica 9
F 1x10 ⁻² + As -9 y -5	0.322	Gráfica 8
As -9, -7 y -5	0.2561	Gráfica 3

La Tabla 10 muestra las regresiones lineales, entre inducción de DPC y los diferentes grupos expuestos a los agentes de estudio. En ella se observa que existe una mayor regresión entre las concentraciones de exposición y la inducción de DPC cuando los cortes de hígado son expuestos simultáneamente a As-5 y F (todas las concentraciones). En segundo lugar se encuentra la regresión correspondiente a los cortes expuestos exclusivamente a F. En tercer lugar se encuentra la regresión correspondiente a la mezcla de As-9 con cada una de las concentraciones de F. En cuarto, quinto y sexto lugar, se encuentran las exposiciones simultáneas de F4, F2 y F1 con As (-9,-5); en ellas se observa que la regresión disminuye conforme la concentración de F es menor. Finalmente, se observa que la menor regresión corresponde a las diversas concentraciones de As solo.

Análisis estadístico

En la prueba de ANOVA (intervalo de confianza del 95%), el valor de “p” para las diferencias entre los grupos es de 0.0059, siendo todas las inducciones significativamente diferentes respecto al control.

Para evaluar las diferencias en la inducción de DPC, entre cada grupo de exposición, se realizó la prueba de Kruskal Wallis (comparación múltiple de medias); la cual muestra diferencias estadísticamente significativas entre:

As-7 y As-5/F2

F2 y As-9

F2 y As-5

F4 y As-7

F1 y As-7

F2 y As-7

F4 y As-9

Estas diferencias indican que, por si solo, el F a concentraciones media y alta, tiene una mayor capacidad de producir DPC, en comparación con la del As solo, que es menor.

DISCUSIÓN

VIABILIDAD DE LOS CORTES DE HÍGADO

Efectos de la metodología sobre la Viabilidad

En lo que respecta al control negativo, los resultados obtenidos para la viabilidad, nos indican que la metodología empleada en la realización de los cortes y las condiciones de incubación no comprometen la viabilidad de los cortes de hígado, por lo que podemos asegurar que la metodología empleada es confiable para la evaluación de los posibles efectos de arsénico y flúor; y que los cambios generados en el sistema de estudio son ocasionados por estos dos agentes.

Disminución de la Viabilidad por efecto del As

Respecto al efecto en la disminución de la viabilidad al aumentar las concentraciones de As, probablemente éste puede ser ocasionado **1)** por la capacidad *in vitro* de los arsenicales trivalentes para unirse a los sulfhidrilos de varias enzimas, receptores y coenzimas (como GSH), conduciendo a la alteración de varios importantes eventos bioquímicos; que conforme aumenta la concertación de As, incrementan la toxicidad. **2)** Otra posible causa puede ser la capacidad inhibitoria del arsenito sobre el cofactor (ditiol) de la enzima piruvato deshidrogenasa, generando un decremento en la producción de ATP, con la consecuente disminución de la capacidad energética de las células para mantener la homeostasis (Hughes, 2002). **3)** Otra posibilidad, puede ser el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical peroxi dimetilarsínico vía dimetilarsina y las generadas a partir del hierro liberado de la ferritina (Hughes, 2002), originados por el mismo As^{III} y su posterior biotransformación a especies metiladas (más tóxicas). **4)** Además de generar estrés proteico (“heat shock”) (Hamadeh y cols., 2002), los metilados generados pudieran estar ocasionando un decremento en la habilidad celular para protegerse contra los antioxidantes, inhibiendo a enzimas como la GSH reductasa o a la tioredoxin reductasa, **5)** además de afectar la expresión génica por decremento en los niveles de tioredoxina (que regula la unión de los factores de transcripción al ADN), que probablemente pudieran dificultar la expresión de genes relacionados con la reparación de ADN o el mantenimiento celular, evidenciado en la disminución de la viabilidad. (Hughes, 2002)

Disminución inicial y Aumento relativo de la Viabilidad por efecto del F

El efecto observado en la disminución de la viabilidad (respecto al control y las exposiciones a As) ocasionado por el F a las concentraciones de F $1 \times 10^{-2} \text{M}$ y $2 \times 10^{-2} \text{M}$, pudo haber sido ocasionado por: 1) la capacidad de éste para generar radicales superóxido (Rzeuski y cols., 1998), y los efectos dependientes de las concentraciones de flúor para producir los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$ a la concentración de F 1×10^{-2} , mismos que prevalecen a concentraciones mayores de flúor (Guan y cols., 1998; Rzeuski y cols., 1998), que son observables al disminuir aún más la viabilidad a la concentración de F $2 \times 10^{-2} \text{M}$.

2) Otro factor que pudiera alterar la viabilidad es la capacidad del flúor para inducir la peroxidación de los lípidos de las membranas (Guan y cols., 1998), alterando la integridad de éstas; y que 3) junto con la disminución de la ubiquinona (lípidos antioxidantes de tejidos y membranas), indispensable en la respiración y la fosforilación oxidativa (reportado en estudios efectuados principalmente en cerebro), puede generar la disminución en la producción de ATP, (que al igual que el As) altera la homeostasis celular.

Puesto que la ubiquinona es un antioxidante preventivo de los efectos de los radicales libres, es posible que conforme aumenta la concentración de flúor, se genere estrés oxidativo, ocasionando la disminución paulatina de la ubiquinona. No obstante, se ha reportado un incremento tardío de la ubiquinona, como reacción compensatoria de las células para auto-protegerse contra los radicales libres (Guan y cols., 1998), lo cual quizá pudiera explicar el incremento relativo en la viabilidad observada a la concentración de F $4 \times 10^{-2} \text{M}$.

4) Diversos estudios muestran que el flúor tiene una capacidad inhibitoria sobre la actividad de varias enzimas antioxidantes, como es el caso de la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la glutatión peroxidasa. (Rzeuski y cols., 1998; Guan y cols., 1998.)

5) También se ha reportado (Rzeuski y cols., 1998) su capacidad para desequilibrar la producción de antioxidantes como son el ácido ascórbico y el glutatión.

En síntesis, las células expuestas exclusivamente a las diversas concentraciones de flúor, probablemente pudieron haber sufrido una acción altamente tóxica de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por éste (y que el parecer ejerce un efecto más tóxico que el mismo As, ya

que también disminuye la viabilidad en comparación con los cortes expuestos a éste), que a la par con la disminución de la actividad de enzimas y sustancias que se encargan de contrarrestar éstos efectos, pudieron haber ocasionado el efecto observado en la disminución de la viabilidad, respecto del control (-).

Disminución de la Viabilidad por efecto de la administración conjunta de As y F

Cuando los cortes de hígado son simultáneamente expuestos a As y F, se observa que en la mitad de los grupos (excepto las mezclas de As 1×10^{-9} /F 1×10^{-2} y As 1×10^{-9} /F 4×10^{-2}), la viabilidad disminuye respecto al control, siendo incluso mas baja que cuando son expuestos a un solo agente (As ó F).

Este comportamiento indica que (en la mayoría de los casos), la administración conjunta de As y F resulta más tóxica para las células, afectando su homeostasis y quizá conduciéndolas a un nivel de daño con el que la célula pudiera ser incapaz de controlar, conllevando a varias de ellas a la muerte. Lo anterior pudiera explicarse a través de los mecanismos de toxicidad para cada uno de los agentes. En el caso del As, por sí solo es capaz de alterar la actividad de las enzimas que poseen grupos tiol, además de disminuir la expresión de genes relacionados con los mecanismos de reparación al ADN; y que, al biotransformarse en metilados^{III}, estos pueden presentar una más alta toxicidad y acción genotóxica directa sobre el ADN (Hughes, 2002, Styblo et al., 1995). Aunado a esto, los efectos tóxicos propios del F (principalmente en el aumento de ROS y la disminución de enzimas y sustancias antioxidantes), podrían haber acrecentado la acción tóxica de ambos agentes, ocasionando la disminución en la viabilidad.

En las exposiciones conjuntas de As a la más baja concentración (1×10^{-9} M), y F a las concentraciones baja (1×10^{-2} M) y alta (4×10^{-2} M), se observa un efecto contrario; ya que se presentan las viabilidades más altas, en comparación con el resto de los cortes expuestos simultáneamente a ambos agentes.

Probablemente este efecto pueda deberse a que el arsénico, a bajas concentraciones, induce estrés oxidativo (mayor a altas concentraciones), promoviendo el aumento en la expresión de genes específicos para el estrés oxidativo (como la *superóxido dismutasa 1 (SOD)*, la *NADPH quinona oxidorreductasa* y en la *serinil treoninacinas 25*), los cuales, probablemente puedan estar ayudando a que las células se protejan contra la acción de los ROS generados por sí mismo

(Hamadeh y cols., 2002) (As a bajas concentraciones) y por el F. Además, este aumento puede ayudar a compensar el efecto inhibitorio que ejerce el flúor sobre algunas de éstas enzimas.

Por otro lado, el flúor, al desequilibrar la producción de glutatión (Rzeuski y cols., 1998), pudiera disminuir la biotransformación del arsénico a sus metabolitos metilados que son más tóxicos, disminuyendo el daño que éstos podrían haber ocasionado sobre la viabilidad celular. Otra posible causa pudiera ser un incremento en la producción de ubiquinona a la concentración de F más alta ($4 \times 10^{-2} \text{M}$), que pudiera ayudar a contrarrestar el efecto de los ROS producidos por el mismo F; y que en el As a bajas concentraciones, pudieran no ser tan grandes.

CAPACIDAD INDUCTORA DE DPC

Inducción de DPC por Arsénico

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la capacidad inductora del arsénico en la formación de DPC, que hemos venido observando en otros trabajos realizados en este laboratorio; que es mayor que el control negativo. Probablemente ésta capacidad de inducir DPC pueda estar relacionada, primeramente, con el efecto en la alteración de la homeostasis. En segundo lugar, al alterarse ésta homeostasis, la maquinaria celular puede inducir una mayor expresión de genes, resultando en una mayor cantidad de proteínas disponibles (adicionales a las producidas de manera normal). Algunas de estas proteínas contienen en sus moléculas grupos sulfhidrilo, que son blanco de unión en particular, para los arsenicales trivalentes. En el caso particular de las proteínas que interactúan con el ADN, éstas se encuentran cercanas a él, haciendo factible que éstas se unan fuertemente por la acción del tóxico, generando los aductos DPC. Los mecanismos a través de los cuales el As induce estos DPC se tratarán mas adelante.

Respecto al comportamiento en la inducción de DPC, se observa que es mayor en el grupo expuesto a $As\ 1 \times 10^{-9}$, seguido del 1×10^{-5} y finalmente en el de $1 \times 10^{-7}M$.

En el caso del As_9 , la mayor inducción pudo haberse ocasionado por que, 1) el As al estar a más baja concentración, permite que una mayor cantidad de enzimas estén disponibles (que posean tioles) para interactuar con el y con el ADN. Así, al aumentar la concentración de As (como es el caso de la concentración 1×10^{-7}), se puede estar generando una saturación en la unión del As a las enzimas, habiendo menos enzimas disponibles para interactuar con el ADN, disminuyendo la formación de éstos aductos; tal como se observa en la concentración intermedia.

2) Otra posible causa, radica en la capacidad del arsénico para incrementar la producción de las enzimas superóxido dismutasa 1 (SOD) y al aumento en la expresión del gen de la NADPH quinona oxidorreductasa que protege a las células contra los radicales libres generados vía dimetilarsina (Hamadeh y cols., 2002) evidenciada en la disminución de los DPC.

3) Finalmente, podemos mencionar, que los mecanismos de reparación del ADN (Ramírez y cols., 2000) pudieran haberse inducido más eficientemente a ésta concentración, removiendo los aductos y originando esta disminución.

Para el caso de la concentración más alta de As ($1 \times 10^{-5} \text{M}$), se observa que la inducción de DPC se reestablece, siendo mayor que en la concentración intermedia, pero menor que a la concentración más baja (1×10^{-7} y 1×10^{-9} , respectivamente). Probablemente este reestablecimiento en la formación de DPC pudiera deberse a las siguientes causas. Frente al aumento del daño (DPC), los mecanismos de reparación al ADN (Ramírez y cols., 2000) o el incremento de las enzimas SOD y NADPH oxidoreductasa (Hamadeh y cols., 2002), que pudieron haberse inducido, podrían estar actuando con menor eficiencia; ya sea, por el aumento en la cantidad del daño ó por la saturación en los sistemas de reparación al ADN. En lo que respecta al aumento del daño, éste podría ser factible; ya que estudios recientes en nuestro laboratorio (resultados inéditos), han demostrado que las cortes de hígado metabolizan el As^{III} a especies metiladas más tóxicas (citotóxicas y genotóxicas), que dañan directamente al ADN. De esta manera, la acción directa de estos arsenicales metilados aunada a la generación de ROS, pudieran aumentar el daño al ADN, por lo que los genes encargados de la reparación (y otros como los antioxidantes), podrían verse afectados.

Inducción de DPC por Flúor

En el caso del flúor, observamos que no es el agente inocuo que años atrás se pensaba, ya que es capaz de interactuar con las proteínas (a través de un mecanismo desconocido), formando entrecruzamientos de éstas con el ADN (un efecto que jamás se había reportado).

Se observa “claramente” que el efecto en la inducción de DPC es dependiente de la dosis, y que todas las concentraciones de flúor, son capaces de inducir DPC en mayores proporciones que cuando se administra arsénico solo (como lo muestran las diferencias entre las exposiciones separadas a As y F, para los grupos: F1 y As-7, F2 y As-9, F2 y As-7, F2 y As-5, F4 y As-9, F4 y As-7, en la prueba de Kruskall Wallis) y en proporciones similares que cuando se administra a la par con arsénico; los cuales pueden causar daño genético alterando las funciones metabólicas del ADN.

Probablemente, ésta superioridad en la inducción de DPC, pudo haber sido ocasionada porque, quizá el flúor a las concentraciones probadas, es capaz de generar una mayor inhibición de enzimas antioxidantes a la par de una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno, en comparación con las concentraciones de As probadas (ver Análisis estadístico: “...F a concentraciones media y alta, tiene una mayor capacidad de producir DPC, en comparación con la del As solo...”). Cabe señalar que éstas últimas (ROS), pudieran ser las principales responsables del aumento en la inducción; ya

que, además de alterar la homeostasis celular podrían haber dañado al ADN, afectando así diversos sistemas, entre ellos a los sistemas de reparación. Puesto que el efecto dosis-dependiente no nos permitió observar la inducción eficiente de los mecanismos de reparación al ADN, suponemos que estos debieron haber actuado en algún momento (por la existencia de esta lesión sobre el ADN), pero que el aumento en la generación del daño (DPC, a través de un mecanismo desconocido), pudo haber sobrepasado la capacidad de remover éstos aductos, ocasionando la saturación del sistema.

Inducción de DPC por la exposición conjunta

Al exponer simultáneamente las cortes a As y F, se observa que la inducción aumenta (sinergismo, dependiente de la dosis) más que cuando éstas se exponen por separado a As, en la mayoría de los casos (excepto para As-5/F2).

En comparación con las exposiciones exclusivas a flúor, se observa que solo cuando las concentraciones de As son altas (As-5) y suministradas a la par con las concentraciones intermedia (F2) y alta (F4), se presenta la mayor inducción a exposiciones simultáneas; siendo las mayores concentraciones de ambos elementos (As-5/F4) aquellas que generan la más alta cantidad de DPC en el experimento.

Respecto al comportamiento en la inducción conjunta, éste se presenta de forma sinérgica respecto a la inducción con As solo, pero de forma antagónica respecto al F solo. Es decir, el F aumenta la capacidad tóxica del As; pero al mismo tiempo el As parece contrarrestar la acción tóxica que el F ejerce por si solo a la misma concentración (excepto en As-5/F2 y As-5/F4).

Este *sinergismo (respecto al As)* podría deberse a la capacidad *per se* del As para unirse a los tioles de proteínas y formar los DPC, y a la formación de ROS que dañan directamente al ADN. Por otro lado, los radicales formados por la acción del F (y los DPC producidos por éste), podrían sumarse a los generados por el As y aumentar el daño sobre el ADN; pudiendo afectarse varios genes como los encargados de la reparación. O bien, que este sistema se sature por el aumento en la generación del daño. Así, estos efectos tóxicos se presentan en aumento conforme la concentración de ambos elementos los hace.

En el caso de la acción *antagónica respecto al comportamiento del F solo*, el As al generar ROS también aumenta la expresión de genes antioxidantes, algunos de los cuales son inhibidos por el F (como SOD), aumentando la capacidad de la célula para luchar contra los ROS. Otra posibilidad podría ser que el As a concentraciones bajas e intermedias (As-9 y -7), estimule más eficientemente que el F a los mecanismos de reparación del ADN (puesto que en ninguna de las concentraciones de F probadas se observa el descenso de DPC); haciendo que los DPC disminuyan respecto al F solo. No obstante (como se mencionó), a pesar del aumento en SOD (estimulado por As) los radicales superóxido prevalecen a altas concentraciones de flúor (Rzeuski y cols., 1998), lo cual pudiera generar la persistencia y aumento de los DPC generados por el F a altas concentraciones (y por el As, que a altas concentraciones reestablece la inducción de DPC).

En el caso particular de la exposición conjunta a bajas concentraciones (As-9/F1) de ambos se observa un sinergismo (aumento de DPC) respecto a sus respectivas concentraciones por separado. Esto puede deberse a que las acciones tóxicas *per se* del As se ven incrementadas por el F solo cuando éstos se encuentra en su concentración más baja, siendo esta concentración de As incapaz de estimular con eficiencia a los mecanismos de reparación (como se propone para As-9 solo). Así, probablemente la generación de ROS (por F a ésta concentración) que dañan al ADN y alteran la homeostasis celular se suma a las acciones tóxicas del As; aumentando principalmente los DPC respecto al As 1×10^{-9} solo, y ligeramente respecto a F 1×10^{-2} solo.

Finalmente, podemos decir que, puesto que As y F son capaces de incrementar el estrés oxidativo acentuando el daño al ADN, éste puede verse reflejado en la inducción de los DPC, que es mayor para el F que para el As.

Regresión Lineal

En el análisis de regresión lineal se observó la relación que existe entre las diversas concentraciones de estudio y la inducción de DPC (efecto).

En ellas se observa que existe una mayor relación entre la concentración y el efecto, es decir una mayor inducción de DPC, cuando los cortes son expuestos simultáneamente a As y F, posteriormente a F y finalmente a As.

En las exposiciones simultáneas, también se observa que la inducción conjunta de DPC, está más relacionada (en orden de importancia) con:

1. Primeramente, con las concentraciones de As en la mezcla, ya que conforme ésta aumenta, la inducción de DPC también aumenta (ver Tabla 10 de Regresiones lineales).
2. En segundo lugar, que el aumento en la inducción de DPC para las exposiciones simultáneas, está relacionado con el incremento del F; ya que la regresión aumenta conforme lo hace la concentración de F en la mezcla (ver Tabla 10).

MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE DPC POR ARSÉNICO Y FLÚOR

Respecto a los mecanismos por los cuales estos agentes son capaces de inducir estos aductos, en el caso del arsénico no han sido bien esclarecidos. Se ha propuesto que su capacidad de interactuar específicamente con las proteínas que presentan grupos tioles, con especial preferencia por los ditiolos, pudiera estar implicada de la siguiente manera: 1) en la unión del As a las proteínas y su posterior unión al ADN, 2) en la unión As-DNA, o bien 3) promoviendo la unión DNA-proteínas. Es importante mencionar que otro de los mecanismos propuestos involucra la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como es el caso de la producción del radical peroxi dimetilarsínico vía dimetilarsina que participa directamente en el daño al ADN (Hamadeh y cols., 2002). Por otro lado, la generación de especies metiladas trivalentes (implícita en el metabolismo del As), que inhiben a la GSH reductasa y a la tiorredoxina, pueden disminuir la habilidad de la célula para protegerse contra los ROS y generar la formación de estos aductos. (Hughes, 2002).

En el caso del flúor, el único mecanismo de daño al ADN que se ha propuesto y que tampoco resulta del todo claro, es a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (cuya participación ha sido propuesta en los mecanismos patológicos de la fluorosis) (Guan y cols, 1998), que también dañan directamente al ADN. El flúor, al estimular el estallido respiratorio genera la producción de radicales superóxido (Rzeuski y cols., 1998), además de ocasionar la inhibición de la SOD (a altas concentraciones), generando un decremento en la protección celular contra los ROS, que pudieran estar implicados en el incremento de la formación de DPC observado al administrar diversas concentraciones de F.

Otra posibilidad relacionada con el efecto del F sobre la generación de radicales libres es el decremento en la actividad de la antes mencionada SOD y de la enzima glutatión peroxidasa (que ocurre en personas que viven en áreas endémicas de fluorosis), el cual genera la peroxidación de los lípidos de la membrana (Guan y cols, 1998; Rzeuski y cols., 1998), misma que puede contribuir con el daño al ADN, en relación con el aumento de los DPC después de la exposición a F y As-F.

No obstante, la relación del flúor en reacciones de los ROS no es clara, por lo que los mecanismos a través de los cuales puede generarse el daño al ADN y la formación de DPC, ya sea por el flúor y/o su administración conjunta con As, amerita ser objeto de estudios posteriores.

CONSECUENCIAS GENÉTICAS

En relación con las consecuencias genéticas que pueden tener lugar por la formación de DPC, podemos señalar que la presencia anormal de una proteína covalentemente unida al ADN puede impedir la replicación del ADN, su recombinación y/o su traducción; y si estos aductos no son reparados (correctamente), pueden generar deleciones. Que se han asociado con la aparición de diferentes tipos de tumores como resultado las modificaciones a los genes reguladores de los relacionados con la supresión de tumores, como RB, p53 y otros que mantienen la homeostasis celular. (Costa y cols., 1993)

Relacionando el hallazgo de la capacidad del flúor para producir DPC, con otros estudios, se ha propuesto que la inducción de DPC por arsenito puede alterar la replicación del ADN, permitiendo que segmentos no replicados puedan derivar en la formación de aberraciones cromosómicas y en la generación de células aneuploides a través de la disrupción de proteínas del citoesqueleto, observada a las altas concentraciones como lo indican Ramírez y colaboradores (2000). En el caso del flúor, en un estudio realizado por, Meng y Zhang (1997) sobre trabajadores de una fábrica de fertilizantes crónicamente expuestos a HF y SiF₄ a bajas concentraciones en el aire, se encontraron incrementos en las aberraciones cromosómicas (anillos, translocaciones y cromosomas dicéntricos) y en los micronúcleos de linfocitos de sangre periférica, en los cuales probablemente pudieron estar implicados estos DPC. Otra observación en la misma investigación, es la disminución del daño cromosómico en trabajadores que habían laborado por más de 10 años en la

fábrica, en la que ellos atribuyen este decremento al probable inicio de mecanismos de adaptación a los contaminantes químicos y/o a la reparación del daño al ADN por los mecanismos de reparación (Meng y Zhang, 1997), y que muy probablemente pueda ser un efecto de la remoción eficiente de estos DPC por parte de la maquinaria reparadora del ADN, que pudiera resultar más eficiente cuando es estimulada por el flúor a bajas y continuas exposiciones; la cual no se puede corroborar en este trabajo debido a que las concentraciones y fuentes de exposición son diferentes, además de que el tiempo de exposición fue muy corto.

Respecto a algunas enfermedades neurodegenerativas que han sido asociadas con la acumulación de F en el cerebro, es importante mencionar que varios estudios han demostrado el papel de la ubiquinona (antioxidante presente en todas las membranas celulares) y su contenido en el cerebro como una de las medidas preventivas antioxidantes contra los efectos de los radicales libres, misma que muestra un decremento inicial en la intoxicación con flúor, y que posteriormente se incrementa de forma tardía para ayudar a que las células se auto-protejan contra los ROS (Rzeuski y cols., 1998). Pese a que en este trabajo no se estudió la capacidad inductora de DPC cerebrales por acción de F y As, quizá pudiera existir alguna relación entre éstos y la aparición de patologías neurodegenerativas, en lo que a flúor se refiere.

MECANISMOS DE REPARACIÓN

Respecto a los mecanismos de reparación del ADN que pueden estar involucrados con la remoción de los DPC, podemos señalar a 3 sistemas, en los cuales se ha investigado su capacidad reparadora y de remoción para los aductos ADN-proteína. Es importante señalar que en cada uno de los estudios citados a continuación, los agentes inductores de DPC son diferentes, por lo que los mecanismos de formación, los sitios de especificidad y las interacciones xenobiótico-proteína correspondiente-ADN son específicas para cada agente. Por ello, estos sistemas solo nos dan un antecedente que pudiera ayudarnos a comprender más fácilmente los mecanismos a través de los cuales la célula se ayuda para eliminar estas lesiones (DPC) ocasionadas por arsénico y flúor, y que no necesariamente se llevan a cabo de la misma manera dadas las implicaciones antes mencionadas.

Entre estos mecanismos podemos mencionar a la **1) Reparación por Escisión de Nucleótidos**, en donde la nucleasa UvrABC (obtenida de *Escherichia coli*, solo en presencia de sus tres subunidades in vitro) de este sistema es capaz de escindir el ADN dañado (solo en la cadena dañada y dejando intacta a la complementaria) en el octavo fosfato 5' y en los quinto y sexto fosfatos 3' de la proteína aductada al sitio, generando un fragmento de 12-mer de ADN entrecruzado con la proteína. Al parecer, la nucleasa UvrABC es capaz de remover los DPC con moderada eficiencia, sin una degradación proteolítica previa. (Minko y cols., 2002)

Al parecer la β -harpina, una proteína de la subunidad UvrB, esta directamente implicada en el reconocimiento de los aductos ADN-proteína; en *E. coli*, los residuos Tyr-95 y Tyr-96 de la base de la harpina son cruciales en la unión específica del daño. (Minko y cols., 2002)

El siguiente mecanismo es la **2) Hidrólisis Espontánea**, que se presenta cuando los DPC son hidrolíticamente inestables, como es el caso de los inducidos por formaldehído (tiempo promedio de 18.3 hr a 37°C); en donde aproximadamente el 30% de las rupturas espontáneas de los DPC (ADN-histonas) se reestablecen bajo condiciones fisiológicas (vida media DPC=26.3hr). (Quievryn y Zhitkovich, 2000)

En el caso del formaldehído, el fin de la hidrólisis espontánea da lugar al inicio de la **reparación activa**, que es efectuada por el **3) Sistema Ubiquitina-Proteosoma**, que es independiente de la excisión de nucleótidos; tal como lo indican experimentos en la reparación de DPC sobre fibroblastos mutantes para los genes XP-A y XP-F, que es muy similar a la de células normales. (Quievryn y Zhitkovich, 2000)

Las ubiquitinas son proteínas de 76 aminoácidos altamente conservadas, que modifican los residuos de lisina dentro de las proteínas blanco, atacándolas covalente. Posteriormente se da la poli-ubiquitinación por las acciones cooperativas de tres enzimas ubiquitinas: E1, E2 y E3, donde la especificidad en la conjugación y la consecuente degradación proteica es controlada por la familia de enzimas ubiquitinas conjugantes E3. (Kirkpatrick y cols., 2003)

En este sistema, la célula elimina las proteínas innecesarias (después de que éstas han actuado, como es el caso de las ciclinas del ciclo celular; BAX y Bid en la apoptosis; p53 e κ B que responden al estrés; c-Jun, c-myc, HIF-1 α en la transcripción; al igual que las proteínas cinasa C y β -catenina involucradas en la señalización) ó dañadas, que primeramente son ubiquitinadas. Posteriormente se da la poli-ubiquitinación que es la señal encargada del reclutamiento y anclaje del proteosoma 26S,

una proteasa de alto peso molecular que a través de sus actividades de caspasa, quimi tripsina y tripsina se encarga de degradar a la proteína blanco (previamente ubiquitinada). A este respecto, se ha observado que al incubar células normales con un inhibidor específico de proteosomas (lactacistina), la reparación de los DPC se ve inhibida. (Quievryn y Zhitkovich, 2000; Kirkpatrick y cols., 2003)

Por otro lado, se ha observado que la exposición a bajos niveles de As^{III} (0.5-10 μ M) causa la acumulación de conjugados de proteínas ubiquitinadas de alto peso molecular, tanto en cortes de corteza renal de conejos como en la línea celular humana de riñones embrionarios HEK293; además, a dosis de As^{III} 10 μ M la actividad celular de la subunidad 20S del proteosoma decrece 40% y 15%, respectivamente. Puesto que la ubiquitinación juega un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis celular, la alteración de los niveles y patrones de ubiquitinación por el As^{III}, puede afectar numerosas vías de señalización y procesos regulatorios críticos al interior de las células, desencadenando una multitud de señales que pueden contribuir a la patogénesis de la exposición a bajos niveles de As^{III}. Recientes descubrimientos en este campo han implicado a las modificaciones en las ubiquitinas en una variedad de funciones regulatorias independientes del proteosoma, entre las que se incluyen la reparación, activación de cinasas, e internalización de receptores membranales (Kirkpatrick y cols., 2003). Por todo lo anterior, es muy probable que la exposición de las cortes a las concentraciones de As^{III} solo y a la par con el flúor, usadas en este trabajo, pudieran ocasionar perturbaciones en esta vía con profundos efectos en la homeostasis celular.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y al análisis efectuado, concluimos lo siguiente:

1. El AsIII (a concentraciones de 1×10^{-9} , 1×10^{-7} y 1×10^{-5} M) tiene la capacidad de inducir la formación de aductos ADN-proteínas, en un sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón, de forma no lineal; siendo la concentración de As 1×10^{-9} M la que presenta una mayor capacidad inductora.
2. El flúor (a concentraciones de 1×10^{-2} , 2×10^{-2} y 4×10^{-2} M) tiene la capacidad de inducir la formación de aductos ADN-proteínas, en un sistema de cultivo de cortes de hígado de ratón, de manera dosis-dependiente; siendo la concentración 4×10^{-2} M la que presenta una mayor capacidad inductora.
3. El flúor presenta una mayor capacidad inductora de aductos ADN-proteínas, en comparación con la del arsénico, a todas las concentraciones probadas.
4. La administración conjunta de arsénico y flúor a todas las concentraciones (excepto en As 1×10^{-5} M/F 1×10^{-2} M), presenta un efecto sinérgico en la formación de DPC, en comparación con los controles y respecto de la capacidad de inducción presentada por el As solo.
5. La administración conjunta de arsénico a bajas concentraciones (1×10^{-9} M) y flúor, genera un efecto antagónico en la formación de DPC (excepto en As 1×10^{-9} M/F 1×10^{-2} M), respecto a la capacidad inductora del F.
6. Las regresiones lineales muestran una mayor relación entre las diversas concentraciones de estudio y la inducción de DPC (efecto) en exposiciones conjuntas a As y F, posteriormente a F y finalmente a As.
7. La regresión para las diferentes exposiciones conjuntas de As y F muestra que la inducción de DPC se encuentra influenciada primeramente por el aumento en la concentración de As, y en menor grado por el aumento en la concentración de F.

PERSPECTIVAS

Puesto que el uso de los cortes de hígado obtenidos de un mismo animal, además de disminuir el costo en la investigación, nos ha brindado grandes ventajas (como la reducción de la variabilidad individual, el uso de bajas cantidades de las sustancias analizadas, la obtención de relaciones dosis-respuesta, y la factibilidad de interpretación y extrapolación de resultados en los seres humanos para evaluación del riesgo), éste modelo nos resulta de particular importancia para poder continuar estudiando los efectos ocasionados por la exposición a diversos tóxicos.

El uso de este modelo en el presente trabajo, nos permitió corroborar la capacidad que posee el arsénico trivalente para formar aductos ADN-proteínas. De la misma forma, podimos detectar un efecto que nunca se había reportado, y que es la capacidad del flúor para formar estos aductos, mismos que también se presentan (en aumento) con la exposición conjunta de ambos elementos.

No obstante, aún nos falta mucho por conocer, por lo que podemos plantearnos las siguientes cuestiones:

¿De que manera la exposición conjunta a estos agentes altera las vías metabólicas propias para cada uno?

Puesto que el As requiere de ciertas enzimas para efectuar su biotransformación, y el F es capaz de disminuir la actividad de éstas (a través de un mecanismo desconocido), la exposición conjunta podría evitar que el As se biotoxicara a especies más reactivas (Thomas y cols., 2001; Hughes, 2002; Styblo y cols., 1995; Rzeuski y cols., 1998; Guan y cols, 1998)

Por otro lado, en cuanto a la capacidad de ambos agentes para incrementar la producción de ROS (capaces de alterar el estado redox intracelular), sería interesante conocer cuales son las vías relacionadas con la homeostasis celular que pudieran verse comprometidas (expresión génica, apoptosis celular, transformación celular, ciclo celular, estado redox; etc...) y así mismo, las medidas efectuadas por las células para tratar de reestablecer la homeostasis.

Por ejemplo, dado que el ATP es una especie indispensable para proveer la energía necesaria para efectuar múltiples reacciones (glucólisis, gluconeogénesis, cadena respiratoria; etc.), la capacidad del As^V para desplazar a los grupos fosfato del ATP y el ADN, podría ser un fenómeno que tal vez repercute en la viabilidad celular; ya sea alterando la homeostasis celular, o bien, participando en la generación de lesiones al ADN.

En el caso del F, al ser el elemento más electronegativo de la naturaleza, existe la posibilidad de que éste reemplace al oxígeno en varias reacciones metabólicas o proteínas funcionales (alterando su conformación especial y su actividad); o bien, funcionar como aceptor de hidrogeniones en la cadena respiratoria (con la consecuente disminución de ATP). Es importante señalar que diversos estudios en cerebro de ratas evidencian su capacidad para peroxidar los lípidos membranales, y disminuir el contenido de lípidos, por lo que prácticamente cualquier célula podía ser susceptible a sufrir daños en la integridad de su membrana, produciendo desde estrés intracelular hasta la muerte (Rzeuski y cols., 1998; Guan y cols., 1998).

✎ *¿Cuáles son los sitios específicos, el tipo de enlace, las proteínas involucradas y los mecanismos a través de los cuales se forman los aductos sobre el ADN, ya sea cuando las células están expuestas a cada agente o cuando la exposición se presenta en forma conjunta?*

En el caso de las proteínas involucradas en la formación de DPC por As, creemos que aquellas que contengan residuos sulfhidrilo en su estructura pueden verse comprometidas, formando los DPC, ya que son susceptibles a reducir u oxidar los SH dependiendo de las condiciones REDOX en el ambiente intracelular (Vather, 1988).

Varias proteínas, entre ellas destacan las del citoesqueleto, tubulina y citoqueratinas (ricas en sulfhidrilos), han sido identificadas como blancos celulares de los efectos tóxicos del arsénico (Goyer, 1986; Valle y cols., 1960).

Específicamente, la citoqueratina 18 (CK18) se le ha encontrado unida al ADN en células hepáticas, donde es específica su expresión, generando DPC (Ramírez y cols., 2000). Actualmente nuestro laboratorio está tratando de dilucidar las interacciones a este respecto.

Para el caso del F, las evidencias más importantes apuntan hacia los ROS como principales responsables de la formación de estos aductos. De momento, no se conocen las proteínas que pudieran estar involucradas.

☞ *¿Cuáles son los mecanismos de reparación al ADN involucrados en la remoción y reparación de estas lesiones, para cada uno de los agentes?*

Respecto a los mecanismos de reparación involucrados en la remoción de DPC, los principales responsables de reparar estas lesiones, cuyo funcionamiento puede coexistir de manera independiente son, 1) el Sistema de reparación por Escisión de nucleótidos (UvrABC), en donde la β -harpina de la subunidad UvrB parece ser la encargada del reconocimiento de éstos aductos (Minko y cols., 2002).

Recientemente, nuestro laboratorio se ha involucrado en el estudio de la degradación no enzimática de los DPC, desarrollando el estudio de los efectos inducidos por el As sobre el 2) Sistema ubiquitina-proteosoma, quien pudiera estar relacionado con la reparación de este daño. Creemos que este sistema puede ser alterado por el As (disminuyendo la remoción), ya que éste elemento puede alterar la degradación proteolítica no lisosomal de la citoqueratina 18 (Kirkpatrick y cols., 2003), alterando la estructura y organización de las citoqueratinas. Este mecanismo puede coexistir con el NER según los reportes recientes de Minko y cols., 2002.

Por otro lado, la exposición a bajos niveles de As^{III} , además de ocasionar la acumulación de conjugados ubiquitinados que disminuyen la actividad del proteosoma, ocasiona la alteración de los niveles y patrones de ubiquitinación, pudiendo afectar vías de señalización y procesos regulatorios intracelulares independientes del proteosoma (como reparación, activación de cinasas, e internalización de receptores membranales [Kirkpatrick y cols., 2003]), desencadenando una multitud de señales; que son particularmente interesantes, ya que podrían contribuir a la patogénesis de la exposición a éste elemento.

☞ *¿Cómo y de que manera estas lesiones afectan la regulación y expresión génica?*

La interacción irreversible entre las proteínas y secuencias específicas del ADN podría originar el aumento o disminución en la expresión de genes (involucrados en la aparición de diversas patologías*); además de alterar tanto la estructura de la cromatina (generando deleciones de secuencias importantes que inactivan diferentes genes supresores de tumores y otros que mantienen la normalidad celular, como *RB* y **p53* [Weinberg, 1991]) como la funcionalidad de enzimas importantes involucradas en la expresión génica (Costa y cols., 1993).

La presencia de estos entrecruzamientos puede generar heterocromatización en ciertas regiones, que ha sido relacionada con deleciones contribuyentes a la inmortalización o senescencia de genes (Sen y col., 1985; Weinberg y col., 1990; Costa y cols., 1993).

✎ *¿Cuáles son los tipos celulares más susceptibles a la formación de DPC?*

Al parecer, las células hepáticas humanas (particularmente WP-L-68) son susceptibles a la inducción de DPC después de la exposición a arsenito (y también a flúor, como lo hemos comprobado), al igual que aquellas con un alto contenido en keratina en donde las especies de arsénico trivalente tienden a acumularse en los tejidos debido a su afinidad por los grupos tiol. De igual manera, las citoqueratinas ricas en tioles, por su amplia distribución intracelular, podrían hacer susceptible a prácticamente cualquier célula para la formación de DCP (Ramírez y cols., 2000).

Otros tipos celulares que parecen ser susceptibles a los efectos inductores de DPC por As son los linfocitos humanos *in vitro*, así como células bucales y pulmonares de humanos expuestos al As en el agua potable. (Ramírez y cols., 2000)

✎ *¿En qué patologías podían estar involucradas estas lesiones?*

Algunos trabajos han asociado a los DPC con el desarrollo de genotoxicidad, además de estar fuertemente correlacionados con la incidencia de tumores en sitios blanco, y ser considerados un gran responsable en la aparición de carcinogenicidad (Minko y cols., 2002, Costa y cols., 1993, Ramírez y cols., 2000, Quievryn y Zhitkovich, 2000). Un ejemplo de ello es el hallazgo en un hospital de China (Taiwan), donde los niveles de DPC en linfocitos de pacientes con cáncer de mama excedían significativamente a los del grupo control. Además de relacionar los DPC con la aparición de este tipo de cáncer, es la primera investigación en donde se describe el uso de estos DPC como un biomarcador para medir el nivel de daño al ADN, en pacientes con este padecimiento (Fang-Yang y cols. 2002).

Es por ello, que resulta de gran importancia ahondar en lo que a cáncer se refiere.

✎ *¿Cuál es la distribución de estas lesiones entre las poblaciones afectadas y no afectadas?*

Se sabe que los DPC son relativamente abundantes, y su acumulación está muy relacionada con la edad y los mecanismos oxidativos (Costa y cols., 1993). En glóbulos blancos humanos (normales), su presencia se estima entre 0.5 a 4.5×10^7 bases; por lo que las poblaciones más frecuentemente expuestas al estrés oxidativo ó agentes tóxicos (luz UV, radiación ionizante, β -propiolactona, aldehídos, arsenito, nitrilotriacetato férrico, cromato níquel, cis-platina, cisplatino y neocarcinostatina [Minko y cols., 2002]), son más propensas a incrementar la formación de estas lesiones; por lo que es sumamente importante identificar, monitorear y estudiar los grupos expuestos a éstos agentes.

Por todo lo anterior, es de particular interés ampliar las investigaciones a este respecto, para poder comprender mejor la forma en la cual estos agentes ejercen sus efectos tóxicos; particularmente en la formación de estos aductos (DPC). De esta manera podremos establecer medidas pertinentes que nos ayuden a controlar las fuentes de exposición en las poblaciones, con miras a disminuir los efectos adversos ocasionados por estos agentes; y quizá en un futuro establecer medidas preventivas, que puedan mejorar nuestra calidad de vida.



Glosario

Aberraciones cromosómicas: son cambios estructurales fácilmente observables en la metafase del ciclo celular y que tienen su origen en rupturas (procesos clastogénicos) de las cadenas de ADN no reparadas o mal reparadas.

Adueto covalente: Es un complejo formado entre la molécula de ADN y un compuesto químico ajeno a la estructura polinucleotídica de la doble hélice, a través de un enlace covalente, causando distorsiones genéticas.

Agente xenobiótico: Compuesto externo a un organismo vivo que interactúa con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.

Bioactivación: Activación de un agente xenobiótico a través de transformaciones metabólicas que sufre dentro del organismo, generalmente de naturaleza enzimática.

Biotransformación: Es la transformación metabólica que los agentes xenobióticos sufren en el organismo, la cual es catalizada principalmente por enzimas del retículo endoplásmico de las células parenquimatosas hepáticas (microsomas hepáticos).

Cáncer: Crecimiento anormal, desordenado y potencialmente ilimitado, de las células de un tejido o un órgano. También se llama neoplasma maligno.

Ciclina: Clase de proteínas que se encuentran en las células eucariotas, que se sintetizan y degradan en sincronía con el ciclo celular y regulan el paso a través de las fases del ciclo.

Ciclo celular: Suma de las fases de crecimiento de un tipo celular completo. Se divide en G₁, S (síntesis del ADN), G₂ y M (mitosis).

Citotoxicidad: Actividad que produce daño a nivel celular; cuyos efectos pueden ser evaluados a través de técnicas citogenéticas.

Daño genético: Pérdida, ganancia o reordenación de material hereditario ocasionado por la interacción de un agente genotóxico con el material hereditario.

Entrecruzamiento: Proceso de recombinación que implica la rotura de la doble hélice de ADN de dos cromátidas no hermanas (por ejemplo, una cromátida de origen paterno y una de origen materno) y el intercambio recíproco de los fragmentos. Los entrecruzamientos entre cadenas de ADN son las lesiones citotóxicas más relevantes producidas por muchos agentes quimioterapéuticos.

Estadio G₀: Estado de reposo proliferativo y de diferenciación que se presenta después de la mitosis dentro del ciclo proliferativo celular.

Fase G₁: Tiempo que transcurre entre la mitosis y el inicio de la fase S del ciclo celular. En G₁ tienen lugar diversas actividades metabólicas como la reagrupación de los polisomas, la síntesis de ARN y de proteínas. Las células que no se encuentran en división permanecen en G₁. La fase G₁ de una célula que está en ciclo activo interviene en el crecimiento y hacia el final de la fase G₁, con el incremento de las enzimas ADN polimerasas, hace posible que la célula entre en S.

Fase S (fase de síntesis): Periodo de replicación del ADN durante la interfase del ciclo celular. Es la fase más larga del ciclo celular y una vez realizada la replicación de ADN, la célula pasa al último estado interfásico, G₂, en el que los cromosomas ya están constituidos por dos dobles hélices de ADN análogas, denominadas cromátides hermanas.

Gen: Unidad física fundamental de la herencia cuya existencia se puede confirmar por variantes alélicas y que ocupa un locus cromosómico concreto. Secuencia de ADN que codifica para un polipéptido.

Genética toxicológica: Es una rama de la Genética y/o de la Toxicología que identifica y analiza la acción de aquellos agentes que producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados. Tiene dos funciones: por una parte, la implantación de métodos para evaluar el riesgo de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente y cuya interacción con el material genético puede alterar la integridad del genoma humano y, por otra, la aplicación de estas

metodologías para la detección y el conocimiento de los mecanismos de actuación de los genotóxicos.

Gen supresor de tumores: Gen que codifica un producto que normalmente suprime la división celular. Las mutaciones en los genes supresores de tumores dan lugar a la activación de la división celular y a la formación del tumor.

Genoma: Conjunto de genes que lleva un individuo. La totalidad del material genético de una célula u organismo.

Mecanismo de reparación por excisión: Mecanismo a través del cual se elimina un fragmento del ADN lesionado por un corte realizado por la enzima endonucleasa U.V., seguido de la reconstrucción exacta de dicho fragmento, pero con normalidad complementaria, realizado por la ADN polimerasa I, y la posterior acción de la ADN ligasa que hace la soldadura de los fragmentos nuevos y antiguos.

Mutación: Las mutaciones son alteraciones hereditarias en la información del material genético o en su distribución; los agentes que pueden reaccionar con el ADN, o interferir con las enzimas necesarias para su replicación, o con macromoléculas implicadas en la segregación cromosómica se denominan mutágenos.

Oncogén: Gen cuya actividad promueve la proliferación de células eucariotas. Gen asociado al cáncer. Los oncogenes se derivan por mutación de genes celulares normales que promueven el crecimiento celular, los protooncogenes.

Promotor: Agente que aumenta la producción de tumores asociados a la exposición a una sustancia, cuando dicho agente se aplica después de la exposición a ella.

Toxicidad: Capacidad de una sustancia de producir efectos adversos, con base en datos científicamente verificables a partir de pruebas en animales o estudios epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albores A., Cebrian M.E., Tellez, I., Valdez B. (1979) Boletín Sanitario Panamericano 86, p.196.
2. Aswathanarayana U. (2000). "Concurrent Endemicity of Fluorosis and Arseniasis in the Kilimanjaro region of Northern Tanzania" Society of Geochemistry & Health - Fourth Annual Conference on Arsenic Exposure and Health, San Diego, June 18-22nd.
3. Cebrian M, Albores E. A., Aguilar M., Blakely E. (1983). Human Toxicology 2, p. 121.
4. Cebrian M.E., Albores A., Aguilar M., Blakely E. (1983). Human Toxicology 23, p. 121.
5. Conway K., and Costa M. (1990). "Nonrandom Chromosomal Alteration in Niquel-Transformed Chinese Hamster Embryo Cells". Cancer Research. 49; pp. 6032-6038.
6. Costa Max, Zhitkovich Anatoly, and Toniolo Paolo (1993). "DNA-Protein Cross-Links in Welders: Molecular Implications". Research. No. 653. pags 460-463.
7. Diazbarriga F, Navarroquezada A, Grijalva ML, Grimaldo M, Loyola Rodriguez JP, Ortiz MD. (1997). "Endemic fluorosis in Mexico [Review]." Fluoride 30 (4), pp. 233-39.
8. Del Razo L.M., Arellano M.A., Cebrián M.E. (1990). "The Oxidation states of Arsenico in Well-water from a Chronic arsenicism area of Northern Mexico". Environmental Pollution 64, p. 143.
9. Del Razo L.M, Corona J.C., Garcia V.G., Albores A., Cebrian M.E. (1993). "Fluoride levels in Well-water from Chronic arsenicism area of Northern Mexico". Environment Pollution 80,p. 91.
10. Errol Zeiger, Michael D. Shelby, and Kristine L. Witt. (1993). "Genetic Toxicity of Fluoride". Environmental and Molecular Mutagenesis 21: 309-318.
11. Fang-Yang Wu, Yi-Ju Lee, Dar-Ren Chen, Hsien-Wen Kuo. (2002). "Association of DNA-protein crosslinks and Breast Cancer". Mutation Research 501: 69-78.

Falta página

N° 117

20. Huang Y.Z., Qian X.C., Wang G.Q., Gu Y.L., Wang S.Z., Cheng Z.H., Xiao B.Y., Gang J.M., Wu J.Y., Kan M.Y. (1992) "Syndrome of Endemic Arsenism and Fluorosis. A Clinical Study" *Chinese Medical Journal (English)* 105 (7), pp. 586-90.
21. Hughes Michael F. (2002) "Arsenic Toxicity and Potential Mechanisms of Action". *Toxicology Letters* 133, pp.1-16
22. Kirkpatrick D.S., Dale K.V., Catania J.M., and Gandolfi A.J. (2003) "Low-level Arsenite Causes Accumulation of Ubiquitinated Proteins in Rabbit Renal Cortical Slices and HEK293 Cells". *Toxicology and Applied Pharmacology* 186, pp. 101-109.
23. Lerche C., Le Jossic C., Fautrel A., De waziers I., Ballet F., Guillouzo A., Corcos, L. (2000) "Rat liver Epitelial cells Express functional Cytochrome P450 2E1". *Carcinogenesis*.
24. Lerche-Langrand Carole and Toutain Herve J. (2000) "Precision-cut Liver Slices: Characteristics and Use for in vitro Pharmaco-Toxicology". *Toxicology* 153, pp. 221-253.
25. Li D., Cutress T.W., Li X. (1996) "An Experimental Study on Effects of Arsenic on Dental Fluorosis in Rats" *Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih* 30 (6), pp. 354-6.
26. López, Ambar Macay. (2004) Tesis: "Inducción de Aductos ADN-Proteínas por Monometil Arsénico (MMA) en Cultivos de Cortes de Hígado". UNAM, México.
27. Loyola Juan Pablo R., Pozos, Amaury de Jesús G., Hernández, Juan Carlos G. (1998) "Bebidas Embotelladas como Fuentes Adicionales de Exposición a Flúor". *Salud Pública de México*. Vol. 40 No. 5, septiembre-octubre.
28. Mandal Badal Kumar and Suzuki Kazuo T. (2002) "Arsenic Round the World: A Review". *Talanta* 58, pp. 201-235.
29. Martínez J. Román Álvarez. (2002) "El Problema del Flúor en Bélgica: ¿Una Nueva Alarma Alimentaria en Europa?". *Nutrición Hospitalaria*. XVII (6) 259-261.

30. McDonagh Marian S., Whiting Penny F., Wilson Paul M., Sutton Alex, Chestnutt Ivor, Cooper Jan, Misso Kate, Bradley Matthew, Treasure Elizabeth, Kleijnen Jos. (2000). "Systematic Review of Water Fluoridation". *British Medical Journal* 321, pp. 855-859. www.york.ac.uk/inst/crd/fluorid.htm
31. Meng Ziqiang and Zhang Bo. (1997) "Chromosomal Aberrations and Micronuclei in Lymphocytes of Workers at Phosphate Fertilizer Factory". *Mutation Research* 393, pp. 283-288.
32. Minko Irina G., Zou Yue, and Lloyd Stephen R. (2002) "Incision of DNA-Protein Crosslinks by UvrABC Nucleases Suggest a Potential Repair Pathway Involving Nucleotide Excision Repair". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.99, no. 4, pp.1905-1909.
33. Ortiz Deogracias, Castro Lorena, Turrubiarres Francisco, Milan Joel and Díaz-Barriga Fernando. (1998) "Assessment of the Exposure to Fluoride From Drinking Water in Durango, Mexico, Using Geographic Information System". *Fluoride* 31 (4), pp. 183-187
34. Pinkham, J. R. (1996) "Odontología Pediátrica". 2ª ed. Interamericana McGraw-Hill. México. p. 202.
35. Quievryn George and Zhitkovich. (2000) "Loss of DNA-protein Crosslinks from Formaldehyde-exposed Cells Occurs through Spontaneous Hydrolysis and an Active Repair Process Linked to Proteasome Function". *Carcinogenesis* Vol. 21 no. 8, pp. 1573-1580.
36. Ramírez P., Del Razo L.M., Gutierrez-Ruiz M.C., and Gonshebbat M.E. (2000) "Arsenite Induces DNA-protein Crosslinks and Cytokeratin Expression in the WRL-68 Human Hepatic Cell Line". *Carcinogenesis* Vol.21 no.4, pp. 701-706.
37. Rzeuski R.D., Chlubek and Machoy Z. (1998) "Interactions Between Fluoride and Biological Free Radical Reactions". *Fluoride* 31 (1), pp. 43-45
38. Ruiz Patricio Ortiz. (1997) "Efectos Deleterios de la Administración Oral de Fluor".

39. Sen P., and Costa M. (1985) "Induction in Chromosomal damage in Chinese Hamster Ovary Cells by Soluble and Particulate Niquel Compounds: Preferential Fragmentation of the Heterochromatic Long Arm of the X-Chromosome by Carcinogenic Crystalline NiS Particles". *Cancer Research* 45, pp. 2320-2325.
40. Thomas David J., Styblo Miroslav, Lin Shan. (2001) "The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic". *Toxicology and Applied Pharmacology* 176, pp. 127-144.
41. Valle B, Ulmer D, Wacker W. (1960). "Arsenic Toxicology and Biochemistry". *AMA Arch. Ind. Health* 21: 131-151.
42. Vather M E. (1988). Arsenic. In: *Biological monitoring of toxic metals*. Clarkson T W, Friberg L, Nordberg G F, Sager P R. (Eds.). Plenum Press. New York. pp. 303-321.
43. Weinberg R. A. (1991) "Tumor Supresor Genes". *Science (Washington DC)* 254, pp. 1138-1146.
44. Wyatt C. J., Fimbres C., Romo L., Mendez R. O., Grijalva M. (1998) "Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico." *Environment Research*. 76, ISS 2, pp. 114-119.
45. Yujian Zheng, Jiyao Wu, Jack C. Ng, Guoquan Wang, Wu Lian. (2002) "The Absortion and Excretion of Fluoride and Arsenic in Humans". *Toxicology Letters* (133), pp. 77-82.
46. Zhang C., Wang G.Q., Liu J.W., Ling B., Xiao B.Y. (2000) "The Effect of Fluoride-Arsenic Exposure on the Macroelements in Serum of Rats' offspring" *Chung-Kuo Kung Kung Wei Sheng (China Public Health)* 16 (9), pp.792-793.

47. Zhi-Zhong Guan, Ya-Nan Wang, Kai-Qi Xiao, Da-Ying Dai, Yuan-Hua Chen, Jia-Liu Liu, Pavel Sindelar and Gustav Dallner. (1998) " Influence of Chronic Fluorosis on Membrane Lipids in Rat Brain". Neurotoxicology and Teratology, Vol. 20, No. 5, pp. 537-542.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS:

48. "Arsenic's Fatal Legacy Grows Worldwide". FRED PEARCE / New Scientist 6 aug 03
<http://www.mindfully.org/Water/2003/Arsenic-Legacy-Worldwide6aug03.htm>
49. Carballo Marta. "¿Qué es la genética toxicológica?".
<http://www.kennedy.edu.ar/Givt/n200.htm>
50. "Case Study for the 4th Year Course in Ecosystem Health".
<http://www.med.uwo.ca/ecosystemhealth/education/casestudies/fluorosismed.htm>
51. Fuentes Morrison Mary, Pandolfi Burzio Ana María. Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción. <http://www.udec.cl/~digentox/index.html>
52. "UNICEF's. Position on Water Fluoridation".
<http://www.unicef.org/programme/wes/info/fluor.htm>
53. [http://phys4.harvard.edu/~wilson/SanDiego2000/Abstracts 10.html#30](http://phys4.harvard.edu/~wilson/SanDiego2000/Abstracts%2010.html#30)
54. <http://www.iespana.es/quimicaweb/tablaPeriodica/paginas/ARSENICO.HTM>
55. <http://mineral.galleries.com/minerals/elements/arsenic/arsenic.htm>
56. <http://www.gjne.com/fluoride/fluorideapathy.htm>
57. http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/hm/sec_7.htm

58. <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c2-2-2.html>

59. http://www.rio10.dk/index.php?a=show&doc_id=1599